

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Gabriel Mustafá Misirli

**PRODUÇÃO E CONTROLE SANITÁRIO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
(PRATA COLOIDAL)**

Rio de Janeiro  
2021

Gabriel Mustafá Misirli

PRODUÇÃO E CONTROLE SANITÁRIO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
(PRATA COLOIDAL)

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientador: Shirley de Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro

2021

## Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Misirli, Gabriel Mustafá

Produção e controle sanitário de nanopartículas de prata (prata coloidal). / Gabriel Mustafá Misirli. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.

197 f. : fig. ; graf. ; tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes.

1. Prata 2. Nanopartículas. 3. Nanoestruturas. 4. Técnicas de Química Sintética. 5. Controle Analítico de Qualidade. 6. Nanomedicina. I. Título.

Production and sanitary control of silver nanoparticles (colloidal silver).

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Gabriel Mustafá Misirli

PRODUÇÃO E CONTROLE SANITÁRIO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
(PRATA COLOIDAL)

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Helena Pereira da Silva Zamith

Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde

Dr. Bráulio Soares Archanjo

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

Dr. Daniel da Silva Guedes Junior

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos)

ORIENTADORA

Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes

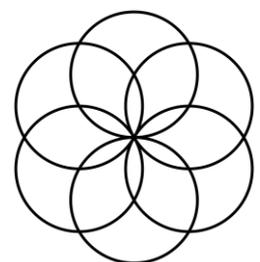
Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde

Para meu filho João  
Amo-te três vezes grande  
Você ainda é tão jovem, mas não imagina a força  
que me deu para concretizar este trabalho  
Juntos seremos gigantes

Para minha amada esposa Aline  
Por seu amor, carinho, compreensão e força  
Eu tive sorte de encontrar o amor  
Juntos seremos gigantes

Para Leona  
Por todo seu carinho, amor e proteção

Aos grandes mestres e mentores espirituais  
Que me inspiram, guiam e protegem  
Que este conhecimento cresça e prospere  
Que este conhecimento possa ajudar a humanidade  
Estou nos braços de gigantes



## AGRADECIMENTOS

Começo dizendo que os agradecimentos abaixo não estão em ordem de importância e que todos são um reconhecimento especial de minha gratidão.

À minha esposa, Aline, por todo o amor, carinho, apoio e dedicação. Obrigado pela compreensão, por todo suporte emocional e energético através de suas terapias integrativas: auriculoterapia, acupuntura, florais, homeopatia. Fizeram grande diferença neste processo. Feliz por nossa vida, e esta é mais uma conquista pra nós!

Aos membros da banca examinadora: Dra. Helena Zamith, Dr. Bráulio Archanjo, Dr. Daniel Guedes, Dr. Márcia Paes, e Dr. Ivano de Filippis por aceitarem o convite para fazerem parte da banca avaliadora. Suas sugestões e críticas serão essenciais para meu desenvolvimento e para a construção deste trabalho. Mestres com tamanha envergadura e experiência, que me trouxeram desde o início orientações preciosas.

Ao meu filho por sua força imensurável que emite pra mim! Falta muito pouco para poder lhe dar toda a atenção e carinho que desejo.

À minha gata Leona, por ficar horas sentada ao meu lado, e ronronando ainda por cima. E quando ficava muito tempo sentado escrevendo me chamava para jogar sua bolinha... até breve minha filha! Sua cabrochinha safadinha!

Profa. Shirley, agradeço você por ter aceitado este projeto e por toda sua orientação e carinho comigo. Você permite que o aluno desenvolva o seu máximo potencial criativo! Você não poda uma ideia, pelo contrário, você estimula, orienta e lapida. Está sempre acessível e pronta para ajudar! Obrigado pela contribuição na minha vida acadêmica e pela confiança neste trabalho. Ah, não podemos esquecer até os desafios do Inova labs Fiocruz que passamos juntos!

A minha mãe, Margarida. Obrigado por ter acreditado naquele menino com hiperatividade rs. Obrigado pelas orações nos momentos difíceis para que eu tivesse forças... Este trabalho, também, é fruto de seus ensinamentos, princípios, valores e dedicação.

Meu irmão Micael, pelos momentos de descontração, por sua amizade e companheirismo.

A minha irmã Suheyra, por todo seu amor, carinho, amizade e torcida!

Ao Daniel, meu chefe e amigo por ter acreditado na prata, em mim e no projeto. Pelas orientações e dicas preciosas e cruciais para o andamento e finalização das minhas milhões de ideias! Com certeza, suas palavras foram um norte para mim.

A minha sogra, Dona Maria, que me acolheu, rezou por mim, fez comida com sustância para eu ter força para concluir este trabalho. “Moela, com tutano é comida forte que dá sustância pro cérebro! Tem que comer comida antiga” rs... Obrigado por todo carinho, amizade e companheirismo.

Obrigado a toda equipe da pós do INCQS, da secretaria: Gisele, Jéssica, Márcia, Samela vocês foram incríveis e sempre muito amáveis! Profa Katia obrigado por toda dedicação, carinho e confiança em mim! A todos os amigos da pós em VISA 2019! Festa junina, quando será a próxima hein? Vem da caravana de onde? Curicica! Momentos inesquecíveis! Saudades de vocês! Das nossas aulas presenciais! De nosso café feito na cafeteira branca guerreira. Saudade das nossas festas! Agradeço também a todos os professores que muito contribuíram para nossa formação.

A meus amigos do SEAPQ, Ana, Alan, Gisele, Ingrid, Karolyne, pelo apoio, colaboração, amizade e pelos momentos de descontração. Especialmente, a Ana Cláudia, que me apresentou a prof. Shirley, que me ajudou muito na eletroforese capilar e em tantas outras situações! Obrigado!

Ao amigo Wendell Dias (IOC/Fiocruz) por todo conhecimento e participação no preparo dos grids com Formvar, leitura das amostras no Microscópio Eletrônico e auxílio para tentarmos resolver diversos problemas com equipamento, reagentes, sempre atuante e proativo.

Prof. Sérgio, obrigado pelos vários momentos explicando sobre a estatística, estabilidade, aceita  $H_1$ , rejeita  $H_0$ . Esse conhecimento foi imprescindível tanto para este trabalho acadêmico quanto para vida profissional.

A todos os amigos que torcem por mim, por seu companheirismo e força. Um agradecimento especial para Daniconá, Marcelão, Lauro (Major) e Joyce.

Ao prof. Kishore Sridharan da University of Calicut (India), que surgiu num momento crucial fazendo uma parceria impensada por mim: um review internacional falando sobre as nanopartículas de prata. Mesmo sabendo que eu era um aluno, ainda inexperiente na área, e com o desafio do inglês, acreditou em meu potencial e muito contribuiu para meu conhecimento.

Ao Edmilson (LATED, Bio-manguinhos, FIOCRUZ) obrigado pela parceria, confiança e pela oportunidade de testar a prata nos desenvolvimentos do LATED!

Ao Luiz Felipe de Melo Azevedo (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ) por sua amizade, e auxílio na revisão do texto em inglês, tradução do artigo e, inclusive, por me ajudar na tradução de reuniões internacionais com prof. Kishore. Além das diversas fotos que muito contribuíram para este trabalho. Ô meu amigo, valeu mesmo...

Ao amigo Alexandre Figueiredo pela parceria na análise de citotoxicidade. Conseguimos em tempo relâmpago terminar estes ensaios que foram cruciais para fechamento deste trabalho.

A Angélica do RH de Bio-Manguinhos, muito obrigado por toda a sua dedicação ao meu processo de mestrado no RH, orientações e conselhos que muito me ajudaram em toda esta trajetória.

À Beatriz Patrício e Helvécio Rocha (LMN, Farmanguinhos, FIOCRUZ) pela parceria e pelos ensaios em DLS e PZ.

A Katarina de Sousa e Silva Aleixo (katarinaaleixo@gmail.com), que foi a revisora ortográfica deste trabalho. Aceitou o desafio de fazer a revisão com pouco tempo, pois foi tudo muito corrido, e olha que não eram poucas páginas rs. Trabalhou inclusive final de semana e feriado para me entregar em tempo hábil. Já sou seu cliente e te recomendo por seu profissionalismo.

“Todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja um veneno. A dose certa diferencia um veneno e um remédio.”

“A medicina se fundamenta na natureza, a natureza é a medicina, e somente nela devem os homens buscá-la. A natureza é o mestre do médico, já que ela é mais antiga do que ele e ela existe dentro e fora do homem.”

Paracelso

## RESUMO

Desde 3500 anos a.C. se usa a prata como agente antimicrobiano. As nanopartículas de prata (AgNPs) se referem à prata metálica com tamanhos entre 1 a 100 nm. A história das AgNPs como um agente bactericida e virucida de amplo espectro, colocadas como futuras candidatas a antibióticos no campo da nanomedicina para o combate a bactérias e vírus, especialmente multi-resistentes. Discutimos a importância da quantificação das AgNPs e do conteúdo de íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) e seus diferentes mecanismos em nível químico, biológico, farmacológico e toxicológico, bem como, análises de controle de qualidade. O mecanismo de ação das AgNPs contra várias bactérias e vírus, incluindo o Sars-Cov-2, foi analisado para a compreensão de sua eficácia como agente antimicrobiano com eficácia terapêutica e baixa toxicidade. Foram produzidas soluções coloidais de AgNPs, por métodos *bottom-up*, como eletroquímico, redução pelo  $\text{BH}_4$ , redução por matéria orgânica natural, síntese de partículas bi-metálicas (nanocamada), síntese nanopratos plasmônicas, redução pelo íon citrato e o método de redução por borohidreto com borax e BSA como estabilizantes (AgNPs-B-BSA). Com relação ao controle de qualidade as principais técnicas foram abordadas e um protocolo de análise de prata (AgNP e  $\text{Ag}^+$ ) foi proposto e validado. Algumas amostras de mercado comercializadas como prata coloidal foram adquiridas, analisadas e o resultado final foi de grande risco para o consumidor de algumas amostras, chamando a atenção máxima para o controle sanitário deste tipo de produto. Ensaio de viabilidade celular por [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo] (MTT) em células CHO foram realizados para avaliar a citotoxicidade das amostras de  $\text{Ag}^+$ , AgNP-B-BSA e Sn@Ag (core-shell). A síntese com o borohidreto, tendo o borax e BSA (AgNPs-B-BSA), como agentes estabilizantes, mostrou-se ser a indicada, devido a sua facilidade de fabricação, reprodutibilidade e o atendimento dos requisitos proposto no objetivo.

Palavras-Chave: Nanopartículas prata. Nanoestruturas. Síntese. Controle Analítico de Qualidade. Nanomedicina. Toxicidade.

## ABSTRACT

Since 3500 b.C. silver has been used as an antimicrobial agent. Silver nanoparticles (AgNPs) refer to the metallic silver with sizes varying from 1 to 100 nm. The history of the AgNPs as a broad spectrum antibactericidal and virucidal places them as future candidates for antibiotics in the field of nanomedicine for the fight against bacteria and viruses, especially multi-resistant ones. We have discussed the importance of quantification of AgNPs and silver ion ( $\text{Ag}^+$ ) content and their different mechanisms at the chemical, biological, pharmacological and toxicological level, as well as quality control analyses. The mechanism of action of AgNPs against various bacteria and viruses, including Sars-Cov-2, was analyzed to understand its effectiveness as an antimicrobial agent with therapeutic efficacy and low toxicity. Colloidal solutions of AgNPs were produced by *bottom-up* methods, such as electrochemical, reduction by  $\text{BH}_4$ , reduction by natural organic matter, synthesis of bi-metallic particles (nanolayer), plasmonic nanoplate synthesis, reduction by citrate ion and the borohydride reduction method with borax and BSA as stabilizers (AgNPs-B-BSA). Regarding quality control, the main techniques were addressed and a silver analysis protocol (AgNP and  $\text{Ag}^+$ ) was proposed and validated. Some market samples sold as colloidal silver were acquired, analyzed and the final result was of great risk to the consumer of some samples, calling maximum attention to the sanitary control of this type of product. Cell viability assay by [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) in CHO cells were performed to evaluate the cytotoxicity of  $\text{Ag}^+$ , AgNP-B-BSA and Sn@Ag (core-shell) samples. The synthesis with borohydride, having borax and BSA (AgNPs-B-BSA) as stabilizing agents, was shown to be the indicated, due to its ease of manufacture, reproducibility and compliance with the requirements proposed in the objective.

Keywords: Silver nanoparticles. Nanostructures. Synthesis. Analytical quality control. Nanomedicine. Toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Morfologia das nanocristais com suas faces predominantes em cada orientação e a razão (R) na proporção das faces {111} em relação as {100} .....	27
Figura 2 – Representa um cristal cúbico de face centrada e suas células unitárias .	29
Figura 3 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) de AgNPs ...	30
Figura 4 – Mecanismo de ação das nanopartículas de prata (AgNPs) na célula bacteriana.....	35
Figura 5 - Mecanismo de ação dos AgNPs em células virais.....	37
Figura 6 - Representação proteína corona com nanopartículas de prata (AgNPs) ...	40
Figura 7 – Imagens de nanopartículas de prata (AgNPs) por Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da captura de AgNPs por macrófagos .....	41
Figura 8 - Foto-oxidação das nanopartículas de prata (AgNPs).....	46
Figura 9 – Curva de dissolução de $Ag^+$ em função da presença do pH na presença ou ausência de oxigênio e curvas de especiação de óxidos e hidróxidos de prata em função do pH.....	48
Figura 10 - Tempo de sedimentação de 1 cm das AgNPs (em meses) de acordo com tamanho e viscosidade do meio .....	50
Figura 11 - Eletrólise com eletrodos de Prata em água com formação de nanopartículas de prata.....	52
Figura 12 - Corrente em mA do sistema versus tempo de processo para diferentes temperaturas, voltagem de 20 V constante .....	54
Figura 13 - Fotos de AgNPs plasmônicas com formato de nanopratos triangulares e hexagonais .....	59
Figura 14 - Etapas do processo de formação das nanopartículas de prata (AgNPs)	60
Figura 15 – Esquema com as etapas simplificadas para preparação de nano core-shell Sn@Ag.....	62

Figura 16 - Procedimento para separar AgNPs usando a técnica de Extração por Ponto de Névoa (EPN) .....	64
Figura 17 – Gráfico ilustra a linha de tendência com intervalo de confiança.....	70
Figura 18 - Investigação experimental sobre a estabilidade de AgNPs .....	72
Figura 19 - Diferenças entre o espalhamento de luz Rayleigh e Mie. ....	74
Figura 20 - Um feixe de laser passa através da amostra na célula capilar de PZ.....	75
Figura 21 - Representação de uma nanopartícula carregada eletricamente.....	76
Figura 22 - Reação do MTT com a enzima mitocondrial redutase .....	78
Figura 23 - Eletrodos de prata produzidos para a condução do estudo .....	85
Figura 24 – Fonte de alimentação fabricante BK PRECISION modelo 1785B.....	86
Figura 25 – Apresenta a tampa de resina acrílica de epóxi com detalhes .....	87
Figura 26 – Estação de trabalho eletroquímica .....	87
Figura 27 – Planilha de síntese das AgNPs com configurações de processo, tempo de eletrólise e outras informações (continua).....	91
Figura 28 - Estrutura do citrato tri-sódico .....	93
Figura 29 - Estrutura do Tetraborato de sódio.....	93
Figura 30 – Foto da árvore de Aroeira pimenteira rosa ( <i>Schinus terebinthifolius</i> ).....	96
Figura 31 – Coleta e lavagem das folhas de aroeira .....	97
Figura 32 – Secagem das folhas de aroeira.....	98
Figura 33 - Equipamento de DLS.....	108
Figura 34 – Bureta para preenchimento uniforme do Formvar na lâmina de vidro..	111
Figura 35 - Secagem do excesso de líquido na grade .....	112
Figura 36 – Grades de cobre após impregnação da amostra .....	113
Figura 37 - Microscópio Eletrônico JEOL JEM-1011.....	114
Figura 38 – Marcas de prata coloidal adquiridas para análise .....	117
Figura 39 – Desenho experimental do estudo de estabilidade da sedimentação das AgNPs .....	119

Figura 40 – Espectroscopia de UV-VIS das amostras produzidas pela síntese eletroquímica.....	120
Figura 41 – Espectros UV-VIS das sínteses de borohidreto com borax como agente protetor.....	122
Figura 42 – Espectros UV-VIS das sínteses de borohidreto com citrato como agente protetor.....	123
Figura 43 - Espectro UV-VIS da síntese de borohidreto com borax e aroeira.....	124
Figura 44 - Varredura de UV-VIS das amostras de prata plasmônicas.....	126
Figura 45 - Espectro UV-VIS da síntese core-shell de Sn@Ag.....	128
Figura 46 – Curva analítica da concentração de prata em ppb versus a intensidade (K) x 1000 .....	129
Figura 47 – Mostra os resíduos $e_i$ e $e_{i-1}$ obtidos no teste de Durbin-Watson.....	131
Figura 48 – Varredura UV-VIS de padrões de AgNPs .....	135
Figura 49 – Gráfico da função de correlação e gráfico da distribuição de tamanho por intensidade da amostra PD20 .....	139
Figura 50 – Resultados e gráfico da distribuição de tamanho por número da amostra PD20 .....	139
Figura 51 – Mostra a distribuição do PZ da amostra de padrão de AgNP 20 nm. A, amostra diluída 20X; B, amostra diluída 50X. O círculo azul pontilhado em A, mostra uma interferência no sinal .....	143
Figura 52 – Imagem por TEM da amostra de AgNP plasmônica .....	145
Figura 53 – Resultado obtido por TEM da amostra de AgNP.....	146
Figura 54 – Resultado DLS da amostra de AgNP, Lote: 190701AGE13. A Figura mostra a distribuição por número, com o PDI, intercept e gráfico de distribuição ...	147
Figura 55 – Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT em células CHO.....	149
Figura 56 – Ensaio de citotoxicidade MTT do íon $Ag^+$ em células CHO.....	150
Figura 57 - Ensaio de citotoxicidade MTT de nanopartículas de prata estabilizadas com boro e BSA (AgNPs-B-BSA) em células CHO.....	151

Figura 58 - Ensaio de citotoxicidade MTT de nanopartículas bi-metálica com núcleo (core-shell) de Sn e camada de Ag (AgNPs (Core-Shell) Sn@Ag em células CHO .....	152
Figura 59 - Observação experimental de congelamento de amostras de AgNPs ...	156
Figura 60 – Espectro UV-VIS dos padrões de AgNPs de 10, 20, 40, 60, 100 nm antes e após o congelamento a -80°C por 7 dias .....	157
Figura 61 - Espectro UV-VIS das amostras produzidas antes e após congelamento .....	158
Figura 62 - Observação experimental da sedimentação ao longo do tempo de AgNPs (20, 40, 60 nm) em água usando fotografia digital quantitativa .....	159
Figura 63 - Espectro de UV-VIS da AgNP-B-BSA produzida .....	170
Figura 64 - A) Propagação da ressonância plasmônica na superfície AgNPs de formato esférico e interação com a radiação eletromagnética. B) Variação da energia de propagação do plasma de superfície (PPS) C) Espectro de absorção UV-vis de padrões de AgNPs esféricas com tamanhos 10, 40, 60 e 100 nm respectivamente, concentração mássica de 0,02 mg/mL.....	191
Figura 65 – Mostra do lado esquerdo a prata 1000, e no lado direito a fundição em forno de resistência elétrica a 1000°C, com posterior moldagem em lingote .....	196

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos do Ag <sup>+</sup> e das AgNPs nas células bacterianas .....	33
Tabela 2 – Equações utilizadas na estimativa dos parâmetros da regressão .....	67
Tabela 3 – Observações encontradas em nosso estudo preliminar de síntese das AgNPs (continua) .....	81
Tabela 4 – Cálculos de constantes elétricas dos eletrodos de prata em função do diâmetro do eletrodo .....	83
Tabela 5 - Tabela de eletrodos de prata 1000, 900, 750 e Estanho 1000 para confecção por especialista em metais com o respectivo valor .....	84

Tabela 6 – Dados do processo referente aos lotes fabricados por síntese eletroquímica .....	89
Tabela 7 - Relação de sínteses de AgNPs com citrato e borax .....	95
Tabela 8- Síntese das AgNPs com extrato de aroeira e dados do processo com agentes protetores e respectivo lote .....	99
Tabela 9 – Preparo dos padrões para curva de calibração com alíquota e volume do balão volumétrico .....	101
Tabela 10 – Fator de diluição das amostras para análise de prata total e prata iônica .....	102
Tabela 11 – Identificação das amostras com respectivas alíquotas e preparo para ensaio de recuperação e seletividade .....	106
Tabela 12 – Amostras de Padrão AgNP para análise DLS .....	109
Tabela 13 – Identificação das amostras utilizadas no experimento de congelamento a -80 °C por 7 dias .....	118
Tabela 14 – Resultados físico-químicos das AgNPs com extrato de folhas de aroeira pimenteira rosa.....	124
Tabela 15 – Resultados físico-químicos das amostras de prata plasmônica .....	125
Tabela 16 – Resultados físico-químicos da AgNP bi-metálica de Sn@Ag.....	127
Tabela 17 – Resultados da homoscedasticidade dos resíduos da regressão pelo teste de Levene.....	130
Tabela 18 - Resultados do teste de Durbin-Watson.....	131
Tabela 19 - Resultados da Análise da regressão e desvio da linearidade (ANOVA) .....	132
Tabela 20 – Resultado das concentrações obtidas nas amostras fortificadas com sua respectiva recuperação .....	133
Tabela 21 - Resultados da regressão dos mínimos quadrados ponderados .....	134
Tabela 22 – Avaliação da repetibilidade.....	134
Tabela 23 –Resultados de espalhamento dinâmico de luz para os padrões de AgNPs .....	137

Tabela 24 – Resultados de PZ para os padrões de AgNPs de 10, 20, 40, 60 e 100 nm .....	142
Tabela 25 - Resultados da análise de PZ .....	144
Tabela 26 –Informações sobre concentração, modo de usar e informações adicionais sobre os produtos comerciais adquiridos a base de prata coloidal com as informações tal qual descritas nos rótulos (continua) .....	153
Tabela 27 – Resultados de controle da qualidade para as amostras de prata coloidal de mercado .....	155
Tabela 28 - Sequência de procedimentos operacionais para fabricação das AgNPs (continua) .....	167
Tabela 29 - Parâmetros críticos e recomendados de controle de qualidade para a formulação produzida.....	169
Tabela 30 - Tabela de conversão de concentração de massa (mg/L) para concentração de partícula em pM / mL dependendo do tamanho dos AgNPs de formato esférico.....	194
Tabela 31 - Tabela de conversão de concentração de massa (mg / L) para concentração em número de partículas por mL, dependendo do tamanho dos AgNPs de formato esférico.....	195

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Efeitos das nanopartículas de prata (AgNPs) nas células virais .....	38
Quadro 2 – Etapas da eletrólise de AgNPs.....	53
Quadro 3 – Etapas envolvidas na reação de obtenção das AgNPs pela redução do borohidreto .....	56
Quadro 4 – Exemplos do método Fievet para obtenção de nanofios, nanocubos e nanoesferas de prata. ....	61
Quadro 5 - Informações e propriedades do Triton X-100 (Sigma-Aldrich) .....	65
Quadro 6 – Sequência de procedimentos necessários durante todas as etapas da eletrólise até o acondicionamento final do produto .....	90
Quadro 7 –Acessórios do ICP-OES utilizados .....	102
Quadro 8 – Parâmetros de configuração do método no Winlab32.....	103
Quadro 9 – Constantes da água e da prata utilizadas na análise de DLS no equipamento Malvern.....	108
Quadro 10 - Soluções em concentrações típicas encontradas na matriz de fabricação das AgNPs para avaliação da seletividade de detecção pelo espalhamento dinâmico de luz (DLS) .....	110
Quadro 11 – Esquema de configuração do teste MTT em placa de 96 poços com amostras de prata em triplicata .....	116
Quadro 12 - Resultados da análise de DLS .....	141
Quadro 13 - Procedimento de preparo das soluções de processo para fabricação das AgNPs com prazo de validade (continua) .....	165

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ag+	Íon Prata
AgNPs	Nanopartículas de Prata (sintetizado por meio físico-químico)
AgNPs-Bio	Nanopartículas de Prata (sintetizados por via biológica)
AgNPs-B-BSA	Nanopartículas de Prata estabilizada com Borax e BSA
AgNPs-BSA	Nanopartículas de Prata estabilizada com BSA
AgNPs-Cit	Nanopartículas de Prata estabilizada com Citrato
AgNPs-PVP	Nanopartículas de Prata estabilizada com PVP
AQ	Arginina Quinase
BH4	Borohidreto de sódio
BSA	Albumina de Soro Bovino
CFC	Cúbica de Face Centrada
CMC	Concentração Micelar Crítica
CMC-r	Carboxi Metil Celulose
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DRX	Difratometria de raios X
EPN	Extração por Ponto de Névoa (com tensoativo não iônico)
FDA	Food and Drug Administration
HIV-1	Vírus de imunodeficiência humana
H1N1	Vírus da influenza
HPV	Papilomavírus humano
HSV-1	Vírus da herpes simples
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória para redução de 50%
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente
IFN	Interferon
ISGs	Genes estimuladores de Interferon ativados
ISO	International Organization for Standardization

LC	Leishmaniose Cutânea
MEKC	Cromatografia Eletrocinética Micelar
MR	Bactérias Multirresistentes
MRC	Material de referência certificado
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NICNAS	National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (Departamento de Saúde da Austrália)
NIST	National Institute of Standards and Technology
NPs	Nanopartículas
PC	Proteína Corona
PDI	Índice de Poldispersibilidade
PEDV	Vírus da diarreia epidêmica porcina
POP	Procedimento Operacional Padronizado
PVP	Polivinilpirrolidona
Qsp	Quantidade suficiente para
ROS	Espécies reativas de Oxigênio
RSV	Vírus sincicial respiratório
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TCRV	Tacaribe vírus
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
Triton X-100	(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenol etoxilado (9 a 10 Mols de óxido de eteno)
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>1.1 Nanopartículas e suas propriedades</b> .....	<b>26</b>
1.1.1 Influência da relação superfície volume.....	26
1.1.2 Morfologia das AgNPs e as faces {111}.....	26
<b>1.2 As características da prata e seus vários formatos</b> .....	<b>28</b>
<b>1.3 Aplicações biológicas das AgNPs</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4 Mecanismo de ação das AgNPs</b> .....	<b>31</b>
1.4.1 Efeito nas bactérias .....	31
1.4.2 Efeito sobre os vírus .....	36
<b>1.5 Interações biológicas das AgNPs</b> .....	<b>39</b>
<b>1.6 Toxicidade de AgNPs</b> .....	<b>42</b>
<b>1.7 Estabilidade físico-química das AgNPs</b> .....	<b>43</b>
1.7.1 Fatores Extrínsecos que afetam a estabilidade físico-química das AgNPs ..44	
1.7.1.1 <i>Estabilidade das AgNPs a temperatura</i> .....	44
1.7.1.2 <i>Estabilidade das AgNPs ao congelamento</i> .....	44
1.7.1.3 <i>Estabilidade das AgNPs a exposição à luz</i> .....	45
1.7.2 Fatores Intrínsecos que afetam a estabilidade físico-química das AgNPs ...46	
1.7.2.1 <i>Estabilidade das AgNPs ao pH</i> .....	47
1.7.2.2 <i>Estabilidade das AgNPs ao oxigênio dissolvido</i> .....	47
1.7.2.3 <i>Estabilidade das AgNPs e o potencial zeta (PZ)</i> .....	48
1.7.2.4 <i>Estabilidade das AgNPs a sedimentação</i> .....	49
<b>1.8 Síntese das AgNPs</b> .....	<b>51</b>
1.8.1 Método eletroquímico .....	51
1.8.2 Redução pelo borohidreto (BH <sub>4</sub> ).....	55
1.8.3 Redução pelo íon Citrato .....	57
1.8.4 Síntese verde de AgNPs com Matéria Orgânica Natural .....	57
1.8.5 Síntese de AgNPs plasmônicas (nanopartículas triangulares e hexagonais).....	58
1.8.6 Síntese com polióis e PVP.....	59
1.8.7 Síntese de nucleação <i>core-shell</i> Sn@Ag .....	62
<b>1.9 Caracterização e requisitos para controle da qualidade</b> .....	<b>62</b>
1.9.1 Quantificação por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).....	63

1.9.1.1	<i>Separação por ponto de névoa (EPN)</i> .....	63
1.9.1.2	<i>Quantificação das espécies AgNPs, Ag<sup>+</sup> e Ag Total</i> .....	65
1.9.1.3	<i>Validação da metodologia</i> .....	66
1.9.1.3.1	<u>Linearidade</u> .....	66
1.9.1.3.1.2	<u>Teste de normalidade</u> .....	67
1.9.1.3.1.3	<u>Teste de homoscedasticidade</u> .....	67
1.9.1.3.1.4	<u>Teste de autocorrelação dos resíduos (independência)</u> .....	68
1.9.1.3.1.5	<u>Teste de significância da regressão</u> .....	68
1.9.1.3.2	<u>Tendência</u> .....	68
1.9.1.3.3	<u>Limite de detecção e limite de quantificação</u> .....	69
1.9.1.3.4	<u>Repetibilidade</u> .....	70
1.9.1.3.5	<u>Seletividade</u> .....	71
1.9.2	<i>Espectroscopia de absorção UV-VIS</i> .....	71
1.9.3	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS)</i> .....	72
1.9.4	<i>Potencial Zeta (PZ)</i> .....	74
1.9.5	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)</i> .....	76
<b>1.10</b>	<b><i>Citotoxicidade das AgNPs</i></b> .....	<b>77</b>
<b>1.11</b>	<b><i>Controle Sanitário</i></b> .....	<b>78</b>
1.11.1	<i>Justificativa</i> .....	79
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>80</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>80</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>80</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>81</b>
<b>3.1</b>	<b>Síntese das nanopartículas de prata (AgNPs)</b> .....	<b>81</b>
3.1.1	<i>Síntese eletroquímica</i> .....	81
3.1.1.1	<i>Cálculo do diâmetro mínimo dos eletrodos</i> .....	82
3.1.1.2	<i>Obtenção dos eletrodos por fundição e moldagem</i> .....	84
3.1.1.3	<i>Obtenção dos eletrodos por fundição e trefilação</i> .....	84
3.1.1.4	<i>Fonte de alimentação e estação de trabalho eletroquímica</i> .....	85
3.1.1.5	<i>Princípios da eletrólise (Leis de Faraday)</i> .....	88
3.1.1.5.1	<u>Cálculo do tempo de eletrólise</u> .....	88
3.1.1.6	<i>Proposta simplificada da síntese eletroquímica</i> .....	89
3.1.2	<i>Síntese com BH<sub>4</sub></i> .....	92
3.1.2.1	<i>Precauções e soluções para trabalho com BH<sub>4</sub></i> .....	92

3.1.2.2	<i>Citrato versus Borax como agente de revestimento</i> .....	93
3.1.3	Síntese verde de AgNPs com NOM .....	95
3.1.3.1	<i>NOM escolhida: Schinus terebinthifolius</i> .....	95
3.1.3.2	<i>Preparo do Extrato de Folhas de Aroeira</i> .....	96
3.1.3.3	<i>Síntese de AgNPs com Aroeira</i> .....	99
3.1.4	Síntese de AgNPs Bi-metálicas (core-shell) .....	99
3.1.4.1	<i>Síntese de nanocamada de AgNPs com núcleo de estanho Sn@Ag</i> .....	99
<b>3.2</b>	<b>Controle da Qualidade das AgNPs</b> .....	<b>100</b>
3.2.1	Quantificação por ICP-OES .....	100
3.2.1.1	<i>Separação por ponto de névoa (EPN)</i> .....	100
3.2.1.2	<i>Preparo da curva de calibração</i> .....	100
3.2.1.3	101	
3.2.1.4	<i>Preparo das amostras</i> .....	101
3.2.1.5	<i>Parâmetros de análise e configuração do método no ICP-OES</i> .....	102
3.2.1.6	<i>Validação da metodologia</i> .....	103
3.2.1.6.1	<u>Linearidade</u> .....	104
3.2.1.6.1.1	<u>Tratamento de valores extremos (outliers)</u> .....	104
3.2.1.6.1.2	<u>Teste de normalidade</u> .....	104
3.2.1.6.1.3	<u>Teste de homoscedasticidade</u> .....	104
3.2.1.6.1.4	<u>Teste de autocorrelação dos resíduos (independência)</u> .....	105
3.2.1.6.1.5	<u>Teste de significância da regressão</u> .....	105
3.2.1.6.2	<u>Seletividade e tendência</u> .....	105
3.2.1.6.3	<u>Limite de detecção e limite de quantificação</u> .....	106
3.2.1.6.4	<u>Repetibilidade</u> .....	106
3.2.2	Espectroscopia UV-VIS .....	107
3.2.3	Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	107
3.2.3.1	<i>Seletividade de detecção do DLS</i> .....	109
3.2.4	Potencial Zeta (PZ).....	110
3.2.5	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) .....	110
3.2.5.1	<i>Preparo das grades de cobre (Cu) com revestimento de Formvar</i> .....	111
3.2.5.2	<i>Preparo da amostra</i> .....	112
3.2.5.3	<i>Observação das amostras no TEM JEOL JEM-1011</i> .....	113
<b>3.3</b>	<b>Citotoxicidade das AgNPs</b> .....	<b>114</b>
3.3.1	Ensaio MTT .....	114

<b>3.4 Controle Sanitário</b> .....	<b>117</b>
<b>3.5 Estabilidade das AgNPs</b> .....	<b>118</b>
3.5.1 Estabilidade ao congelamento.....	118
3.5.2 Estabilidade da sedimentação das AgNPs.....	119
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>120</b>
<b>4.1 Síntese das AgNPs</b> .....	<b>120</b>
4.1.1 Síntese eletroquímica.....	120
4.1.2 Síntese com Borohidreto e Borax.....	122
4.1.3 Síntese verde com Aroeira.....	124
4.1.4 Síntese de AgNPs plasmônicas.....	125
4.1.5 Síntese e AgNPs bi-metálicas Sn@Ag.....	127
<b>4.2 Caracterização das AgNPs</b> .....	<b>128</b>
4.2.1 Quantificação por ICP-OES.....	129
4.2.1.1 <i>Validação da metodologia</i> .....	129
4.2.1.1.1 <u>Linearidade</u> .....	129
4.2.1.1.1.1 <u>Tratamento de valores extremos (outliers)</u> .....	129
4.2.1.1.1.2 <u>Teste de normalidade</u> .....	129
4.2.1.1.1.3 <u>Teste de homoscedasticidade</u> .....	130
4.2.1.1.1.4 <u>Teste de Autocorrelação dos Resíduos (independência)</u> .....	130
4.2.1.1.1.5 <u>Teste de significância da regressão</u> .....	131
4.2.1.1.2 <u>Seletividade e Recuperação</u> .....	132
4.2.1.1.3 <u>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</u> .....	133
4.2.1.1.4 <u>Repetibilidade</u> .....	134
4.2.2 Espectrofotometria UV-vis.....	135
4.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	136
4.2.3.1 <i>Análise dos Padrões de AgNPs</i> .....	136
4.2.3.2 <i>Seletividade</i> .....	141
4.2.4 Potencial Zeta (PZ).....	142
4.2.4.1 <i>Análise dos Padrões de AgNPs</i> .....	142
4.2.4.2 <i>Influência das matérias-primas no PZ</i> .....	143
4.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	144
<b>4.3 Citotoxicidade das AgNPs</b> .....	<b>148</b>
4.3.1 Ensaio MTT em células CHO.....	148
<b>4.4 Controle Sanitário</b> .....	<b>152</b>

<b>4.5 Estabilidade das AgNPs</b> .....	<b>155</b>
4.5.1 Estabilidade ao Congelamento .....	155
4.5.2 Estabilidade a Sedimentação .....	158
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>160</b>
5.1 Perspectiva.....	161
<b>6 PRODUTO TECNOLÓGICO</b> .....	<b>163</b>
REFERÊNCIAS .....	171
ANEXO A – CERTIFICADO DO PADRÃO DE PRATA 1000 ppm MRC.....	187
ANEXO B – PLANILHA PARA AVALIAÇÃO DE PREMISSAS BAZILIO <i>ET AL</i> (2012).....	188
ANEXO C – RELATÓRIO DE DISTRIBUIÇÃO POR INTENSIDADE DA AMOSTRA PD10 .....	189
APENDICE A – EXPLICAÇÃO COMPLEMENTAR SOBRE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (RPS).....	190
APENDICE B – CÁLCULO DE PARTÍCULAS/ML PARA AGNPS.....	192
APENDICE C – TABELAS DE CONVERSÃO PARA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS .....	194
APENDICE D – OBTENÇÃO DOS ELETRODOS POR FUNDIÇÃO E MODALGEM	

## 1 INTRODUÇÃO

A prata é um dos agentes bactericidas mais antigos da história. Existem registros que datam de mais de 3.500 anos a.C., referindo-se ao seu uso medicinal no Egito pré-dinástico, na medicina tradicional chinesa e na Ayurvédica indiana (1000 a.C.) como um agente antiviral e bactericida de amplo espectro. Aristóteles, considerado o pai da ciência metódica e inventor da lógica, aconselhou Alexandre o Grande (335 a.C.) a adicionar prata à sua água (BARNES, 2000; RUSSELL; HUGO, 1994; SINGH *et al.*, 2008). Desde então, o efeito bactericida da prata e das nanopartículas de prata (AgNPs) tem sido estudado e diversas evidências experimentais de sua eficácia têm sido comprovadas tanto em estudos *in vitro*, como *in vivo*. (CHAMBERS; PROCTOR; KABLER, 1962; FOLDBJERG; DANG; AUTRUP, 2011; GORDON *et al.*, 2010; KLIPPSTEIN *et al.*, 2010; LEVARD *et al.*, 2012; MATSUMURA *et al.*, 2003; MEI *et al.*, 2013; MORONES, JOSÉ; GALLEGOS, 2014; MORONES *et al.*, 2005; MORONES, 2009; PARK *et al.*, 2010, 2009; WU, 2011).

Nos últimos anos, a resistência de bactérias e vírus aos antibióticos tem aumentado dramaticamente e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu essa preocupação como uma das maiores ameaças à saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017a). Os vírus são uma das principais causas de doenças e mortes no mundo. Porém, para alguns patógenos virais com alta variabilidade genética, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vacinas não puderam ser desenvolvidas. Os vírus têm a capacidade fascinante de se adaptar ao seu hospedeiro, passar para um novo hospedeiro e escapar das medidas antivirais e, da mesma forma, as bactérias são resistentes aos antibióticos principalmente devido à sua capacidade de criar biofilme (BARKER, 1999; LAXMINARAYAN *et al.*, 2013; STEWART; COSTERTON, 2001). Um cenário, desenvolvido pela OMS (2019), prevê que o aumento da resistência das bactérias e vírus aos antibióticos já causa pelo menos 700.000 mortes/ano e esse número pode aumentar para 10 milhões mortes/ano até 2050 se nenhuma ação for tomada para limitar a resistência antimicrobiana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a). Os efeitos antibacterianos, anti-incrustantes e antibiofilmes das AgNPs foram extensivamente estudados e revelam que eles são letais para as bactérias e previnem com eficácia a formação de biofilmes (MARKOWSKA; GRUDNIAK; WOLSKA, 1970). Isso sugere

que eles podem ser incorporados em matrizes ou materiais usados na fabricação de dispositivos médicos para prevenir a adesão, colonização e a formação de biofilmes microbianos nas superfícies desses dispositivos. Além disso, a história das AgNPs como um agente microbicida de amplo espectro, as coloca como uma candidata viável a ser um dos ingredientes básicos dos antibióticos do futuro, na luta contra o aumento de patógenos multirresistentes, cepas, doenças negligenciadas como Dengue, Leshimaniose, Malária, Esquistossomose, Tripanossomíase (doença de Chagas) e muitas outras aplicações (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013; MARTINEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2013; MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021).

O aumento sem precedentes de micro-organismos resistentes a múltiplas drogas, nos últimos anos, ressuscitou a atenção dos cientistas para a exploração da prata e suas nanopartículas como agentes antimicrobianos (PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018). Essas propriedades únicas das AgNPs apresentam uma alternativa razoável para o desenvolvimento de novos bactericidas, com atividade letal contra bactérias e vírus, e estudos indicam seu uso seguro no corpo humano (JAIN *et al.*, 2009; MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021; MORONES *et al.*, 2005). No campo dos micro-organismos multirresistentes, é relatado que as AgNPs têm um grande efeito bactericida sobre as bactérias multirresistentes (MATHUR *et al.*, 2018). Estudos têm verificado a atividade efetiva da AgNP em diferentes patógenos resistentes a fármacos de importância clínica, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *Escherichia coli* O157: H7 resistente à ampicilina e *Streptococcus pyogenes* resistente à eritromicina (LARA *et al.*, 2010).

As AgNPs atuam em grande variedade de alvos nos micro-organismos e tornam improvável que micróbios desenvolvam resistência contra ela, pois não seria possível desenvolver uma série de mutações simultaneamente, ao contrário dos antibióticos convencionais que são específicos para determinados alvos (PAL; TAK; SONG, 2007). Além disso, estudos indicam um efeito sinérgico de antibióticos convencionais (amoxicilina, gentamicina, ampicilina, estreptomicina) com AgNPs, que se mostraram altamente eficazes no tratamento de infecções bacterianas (GHOSH *et al.*, 2012; MARKOWSKA *et al.*, 2018).

Por outro lado, as propriedades físico-químicas das AgNPs produzidas, como o seu tamanho, forma, agente estabilizantes e outras características que serão detalhadas neste trabalho, podem afetar a eficácia e segurança do uso desse material.

A agregação e a dissolução oxidativa são pontos cruciais para evitar riscos à saúde decorrentes da exposição das AgNPs e liberação de íons  $\text{Ag}^+$  no meio (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021; RIAZ AHMED *et al.*, 2017). O desenvolvimento das AgNPs como agentes terapêuticos de alta eficácia e baixa toxicidade, avança para uma nova era da medicina e sua caracterização adequada é essencial para garantir sua eficácia e baixa toxicidade (HWANG *et al.*, 2012; MORONES, JOSÉ; GALLEGOS, 2014).

## 1.1 Nanopartículas e suas propriedades

São consideradas nanopartículas (NPs) partículas que têm sua dimensão em nanoescala (1–100 nanômetros, nm). Estas partículas exibem novas propriedades em comparação ao mesmo material ou substância, que não estejam na forma nanométrica (RIHN, 2018).

### 1.1.1 Influência da relação superfície volume

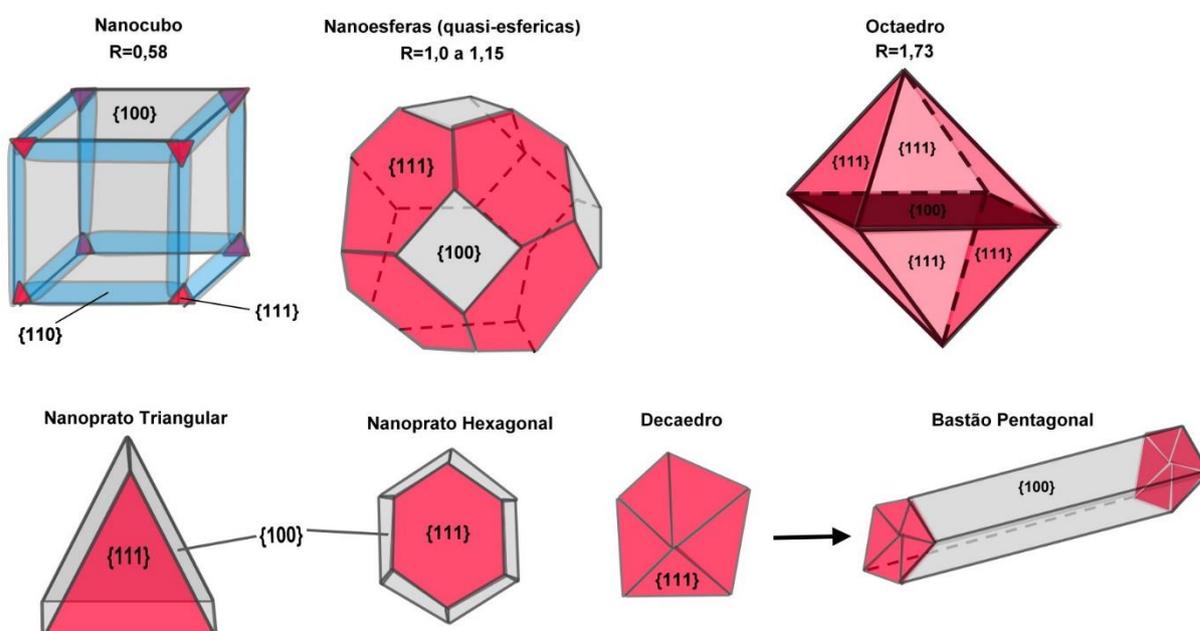
Uma das características únicas das NPs é a sua grande proporção superfície (S) / volume (V) dependente do seu tamanho, resultando em grandes frações de átomos de superfície. À medida que o tamanho de uma partícula aumenta, a fração de átomos na superfície, que é chamada de dispersão (F), cai drasticamente. A dispersão (F) é igual ao número de átomos na superfície ( $N_s$ ) dividido pelo número de átomos totais da nanopartícula (N). Este maior número de átomos na superfície das nanopartículas resulta em propriedades importantes para as NPs, que são totalmente diferentes das micropartículas do mesmo material (JORTNER, 1992; RODUNER, 2006). As nanopartículas são um elo entre materiais volumétricos e estruturas atômicas ou moleculares (THOMAS; TORRES TAPIA; RAMIREZ, 2015).

### 1.1.2 Morfologia das AgNPs e as faces {111}

As propriedades químicas e físicas únicas das nanopartículas são determinadas não apenas pela grande concentração dos átomos da superfície, mas também pelas orientações cristalográficas das partículas. O número de átomos na

superfície é influenciado pelo tamanho da nanopartícula e a orientação cristalográfica depende da morfologia das partículas, conforme Figura 1. As superfícies  $\{111\}$ ,  $\{100\}$  e, possivelmente,  $\{110\}$  de partículas de prata são diferentes, não apenas nas densidades dos átomos da superfície, mas também na densidade eletrônica, ligação, reatividade química (JORTNER, 1992; RODUNER, 2006; WANG, 2000) e na ressonância plasmônica de superfície (RPS) (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021). No apêndice A, são apresentadas informações complementares sobre a RPS.

Figura 1 - Morfologia das nanocristais com suas faces predominantes em cada orientação e a razão (R) na proporção das faces  $\{111\}$  em relação as  $\{100\}$



Fonte: (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021)

Agnihotri e colaboradores estudaram a atividade bactericida contra *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, de vários tamanhos de AgNPs, na morfologia esférica, e concluíram que sua eficácia aumentava com a diminuição do tamanho, independentemente das cepas bacterianas (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014). Por outro lado, estudos indicam que a reatividade das AgNPs é favorecida pela faceta  $\{111\}$ , que tem alta densidade atômica e atividade antibacteriana mais forte (AJAYAN; MARKS, 1988; PAL; TAK; SONG, 2007). Assim, nanoplacas triangulares truncadas têm maior poder bactericida em comparação a outras formas de AgNPs que contêm menos faces  $\{111\}$ , como nanoesferas, nanobastões e nanocubos. Pal; Tak; Song (2007) e Dong *et al.* compararam a atividade bactericida das morfologia

esféricas e em nanoplacas das AgNPs contra bactérias e concluíram que a forma triangular truncada das nanoplacas teve maior ação biocida, devido à faceta {111}, quando comparada às nanoesferas (PAL; TAK; SONG, 2007; VAN DONG *et al.*, 2012). Acharya e colaboradores avaliaram a eficiência de nanopartículas de prata de formato esférico (AgNP-sp) e em formato de bastões (AgNR), quanto à sua atividade antibacteriana contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A cinética de morte confirmou que a taxa de mortalidade de *Klebsiella pneumoniae* foi maior contra AgNP-sp (maior número de faces {111}) em comparação com AgNR. Concluiu-se que a faceta {111} é responsável pelo efeito antibacteriano, fato que foi confirmado por um estudo de cinética de morte e apoiado pelo arranjo de genes resistentes às AgNPs no genoma do organismo em teste (ACHARYA *et al.*, 2018).

Por outro lado, AgNPs com tamanhos diferentes exibem atividades antimicrobianas diferentes: partículas menores são mais eficientes em matar bactérias do que as maiores (MORONES *et al.*, 2005). Além dos diferentes tamanhos e formas que as AgNPs podem ter, outras camadas metálicas podem ser adicionadas às AgNPs, assim como novos recursos. Por exemplo, magnetismo com adição de níquel ou ferro na produção de nanopartículas bimetálicas de prata Ag@Ni ou Ag@Fe (SRIDHARAN *et al.*, 2013), com potenciais aplicações biomédicas em terapias por manipulação magnética com efeito fototérmico, atividade bactericida localizada, entre outras possibilidades (RIHN, 2018; SRIDHARAN *et al.*, 2013; THOMAS; TORRES TAPIA; RAMIREZ, 2015; WANG *et al.*, 2019).

## 1.2 As características da prata e seus vários formatos

As AgNPs são aglomerados de átomos de prata com diâmetro que varia de 1 a 100 nm, e de acordo com a Comunidade Europeia:

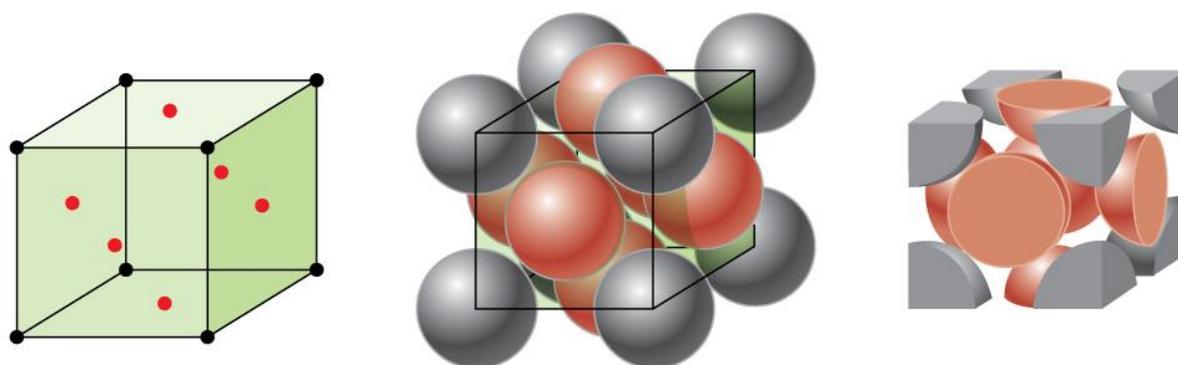
*“Um material natural, produzido acidentalmente ou fabricado que contém partículas soltas, agregadas ou aglomeradas, no qual 50% ou mais das partículas apresentam, na distribuição granulométrica, uma ou mais dimensões externas no intervalo 1 nm – 100 nm.”* (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

A prata localiza-se no bloco d da Tabela Periódica (metal de transição), grupo 11, período 5 ( $4d^{10}5s^1$ ). De cor prateada, brilhante, maleável, dúctil e com o mais alto

nível de condutividade elétrica e térmica de todos os metais (DUARTE DE SOUZA *et al.*, 2013; HAYNES, 2017). É um material de grande beleza, o que se atribui ao fato de ser o elemento com maior capacidade reflexiva na Tabela periódica, pois pode refletir cerca de 95% da luz visível, criando a aparência de um espelho (MORONES, JOSÉ; GALLEGOS, 2014). A prata não possui propriedades magnéticas na forma de macropartículas (bulk), porém, no tamanho nanométrico algumas orientações de AgNPs podem apresentar magnetismo devido a sua RPS, entre outras propriedades (AN *et al.*, 2016; CRESPO *et al.*, 2013; KALFAGIANNIS *et al.*, 2012; LUO; PENNYCOOK; PANTELIDES, 2007).

A maioria dos elementos metálicos, no estado sólido, possuem estrutura altamente densa, na qual suas células unitárias repetem padrões de seus componentes em três dimensões (uma estrutura de cristal). A prata possui uma estrutura Cúbica de Face Centrada (CFC) (DUARTE DE SOUZA *et al.*, 2013; HAYNES, 2017), cada átomo contata seis átomos em sua própria camada. Dessa forma, cada átomo se conecta com 12 átomos vizinhos ao seu redor e, portanto, tem um número de coordenação de 12. Cada unidade de célula da prata, possui 4 átomos de prata (TILLEY, 2006), conforme Figura 2.

Figura 2 – Representa um cristal cúbico de face centrada e suas células unitárias



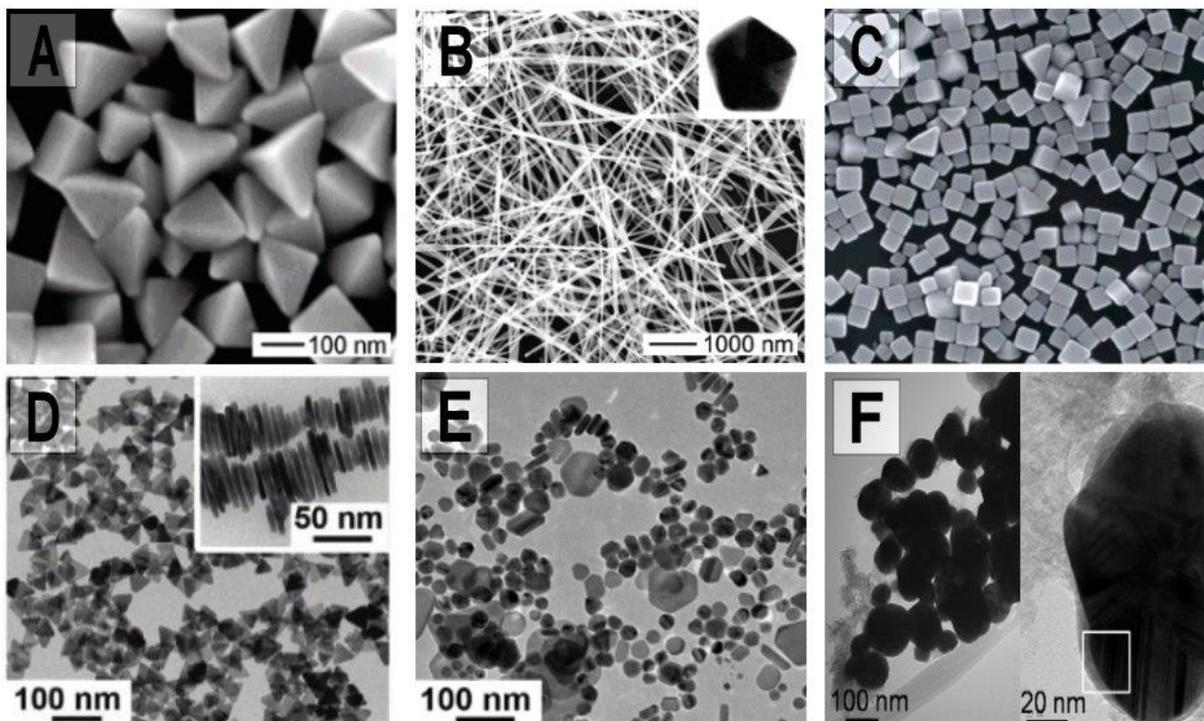
Legenda: As esferas de cor vermelha representam os átomos de prata cercando nas faces do cubo um átomo central localizado nos 6 lados. E as de coloração cinza representam átomos cercando o átomo central diagonalmente representados pelos vértices do cubo.

Fonte: (INDIANA UNIVERSITY, 2016).

Existem diversas formas de sintetizar as AgNPs e, dependendo do método de fabricação, as AgNPs finais podem apresentar morfologia esférica, em bastão, em fio, em placas triangulares, em placas hexagonais, em pirâmide, em cubo, em bimetálicas,

entre outras. A Figura 3 mostra alguns tipos de AgNPs e seus formatos (ZHANG *et al.*, 2016).

Figura 3 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) de AgNPs



Legenda: Com os seguintes formatos: A) bipiramidal; B) nanofios; C) nanocubos; D) nanoplacas triangulares; E) nanoplacas variados; F) esférica bimetálica Ag@Fe núcleo de Ag envolvida por uma camada de Ferro.

Fonte: Adaptado: A, B e C: de, (WILEY *et al.*, 2006); D e E de (ZHANG *et al.*, 2011a) e F de (SRIDHARAN *et al.*, 2013).

### 1.3 Aplicações biológicas das AgNPs

As AgNPs têm sido amplamente utilizadas em utensílios domésticos, no armazenamento de alimentos e em várias aplicações biológicas e biomédicas (ZHANG *et al.*, 2016). Diversos estudos apresentam suas propriedades antimicrobianas para bactérias, inclusive multirresistentes (MR) (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021), além de apresentar propriedades anti-inflamatórias (GURUNATHAN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2016), anticâncer (MATHUR *et al.*, 2018; SABARATNAM *et al.*, 2013) e antiangiogênicas (GURUNATHAN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2016). Devido a estas características antimicrobianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes, vários produtos, como bandagens e curativos com AgNPs, são direcionados para curar feridas ulcerativas e para tratar queimaduras (MARCATO *et al.*, 2015; MATHUR *et al.*, 2018).

Estudos indicam, também, que as AgNPs melhoram a eficácia dos tratamentos de câncer, produzindo efeitos antitumorais (MATHUR *et al.*, 2018; SABARATNAM *et al.*, 2013).

Além disso, as AgNPs têm um papel central no desenvolvimento de novos tratamentos para doenças negligenciadas, que são aquelas causadas por agentes infecciosos ou parasitas e são consideradas endêmicas em populações de baixa renda, além de receberem pouco investimento na pesquisa e desenvolvimento da indústria farmacêutica, por não serem comercialmente atrativas (RAO *et al.*, 2000; VALVERDE, 2013). Neste contexto, as AgNPs surgem como alternativa promissora e estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram sua eficácia para dengue, leishmaniose, malária, esquistossomose e tripanossomíase (doença de Chagas) (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021).

#### **1.4 Mecanismo de ação das AgNPs**

Vários estudos têm demonstrado que as AgNPs possuem atividade bactericida e viral em baixas concentrações e não causam efeitos tóxicos agudos nas células humanas (ASHARANI *et al.*, 2009; CARLSON *et al.*, 2008). Essas notáveis propriedades chamam a atenção para o desenvolvimento de novos produtos na área da saúde e o mecanismo de ação das AgNPs é fundamental para melhor compreensão de seus efeitos, potencialidades e toxicidade.

Um resumo do mecanismo de ação das AgNPs, identificado por vários pesquisadores, frente a bactérias e vírus, foi detalhado nas seções a seguir.

##### **1.4.1 Efeito nas bactérias**

Agnihotri e colaboradores (2014) estudaram o efeito bacteriostático e bactericida das AgNPs com formato esférico contra quatro cepas bacterianas. Foi verificado que a eficácia foi muito maior nas partículas menores que 10 nm, ou seja, 5 nm, apresentaram maior atividade bactericida contra todas as cepas testadas, em comparação com AgNPs de maior tamanho (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014). Essa pesquisa corrobora a hipótese de que quanto menor o tamanho das AgNPs, maior é a sua reatividade, pois existe uma maior fração de átomos na superfície.

Em relação ao desempenho do íon prata ( $\text{Ag}^+$ ) e das AgNPs, existem diferenças na forma como atuam, quanto à avaliação no teste de toxicidade. A Tabela 1, a seguir, mostra os principais estudos e conclusões de cada autor para melhor compreensão.

Tabela 1 - Efeitos do Ag<sup>+</sup> e das AgNPs nas células bacterianas

Efeitos	Ag <sup>+</sup>	AgNPs	Comentários	Ref.
Bloqueio de enzimas respiratórias e transferência de elétrons	sim	sim		(MATSUMURA <i>et al.</i> , 2003; MORONES <i>et al.</i> , 2005)
Interage com ADN	sim	sim		(MORONES <i>et al.</i> , 2005)
Interage com moléculas contendo enxofre e ferro	não	sim		(GORDON <i>et al.</i> , 2010)
Interage com grupos tióis	sim	não		(GORDON <i>et al.</i> , 2010)
Induz a produção de ROS (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , OH <sup>•</sup> )	sim	sim	Ocorre apenas se ferro intracelular livre estiver presente.	(GORDON <i>et al.</i> , 2010; MATSUMURA <i>et al.</i> , 2003)
Produz a formação de uma região de baixo peso molecular no centro da bactéria	sim	não		(MORONES <i>et al.</i> , 2005)
Carga eletrostática promove maior interação	não	sim		(MORONES <i>et al.</i> , 2005)
Passa por Biofilmes	sim	sim	AgNPs atuam principalmente na faixa de 1 a 10 nm fixadas à superfície da membrana celular.	(GORDON <i>et al.</i> , 2010; MORONES <i>et al.</i> , 2005)
Induz a reação de Fenton e apoptose	sim	sim	A oxidação subsequente do ferro por peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) gera o radical hidroxila, um poderoso oxidante que ataca o ADN adjacente.	(GORDON <i>et al.</i> , 2010; HWANG <i>et al.</i> , 2012; KEYER; IMLAY, 1996; KODURU <i>et al.</i> , 2018)
“Efeito zumbi”	sim	sim	Após a apoptose celular, as AgNPs e o Ag <sup>+</sup> interagem com os componentes celulares da bactéria morta (RNA, polissacarídeo, fosfolípido, proteína e ADN) criando novas nanopartículas de prata revestidas pelo próprio material genético da bactéria (AgNP-bac).	(WAKSHLAK; PEDAHZUR; AVNIR, 2015)

Fonte: (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021)

Foi demonstrado que as AgNPs não causam resistência bacteriana, pois, ao contrário dos antibióticos, as AgNPs não exercem seus efeitos antibacterianos em um

único sítio específico, mas em vários níveis, como: parede bacteriana, bloqueio de transferência de elétrons, respiração celular e replicação devido a danos a proteínas, RNA e ADN (GOGOI *et al.*, 2006; MORONES *et al.*, 2005). Além disso, há evidências substanciais de que AgNPs produzem espécies reativas de oxigênio (ROS). O acúmulo de ROS intracelulares é amplamente conhecido como um importante regulador da apoptose (HWANG *et al.*, 2012). A produção de espécies oxidativas pode ser devido aos elétrons envolvidos na cadeia respiratória. É improvável que as enzimas antioxidantes detoxifiquem as ROS, a partir da cadeia respiratória danificada, uma vez que dependem de grupos tiol, que foram ocupados por íons de prata. O aumento dos ânions superóxido e peróxido de hidrogênio na reação com o ferro (reação de Fenton), conforme equações 1 e 2 (KEYER; IMLAY, 1996) e Figura 4, causa destruição da estrutura interna da célula, proteínas, RNA, ADN e consequente dano celular por apoptose (GORDON *et al.*, 2010; MARKOWSKA; GRUDNIAK; WOLSKA, 1970; TODAR, 2020).

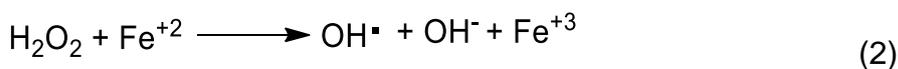
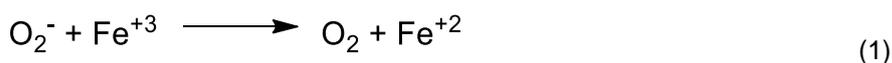
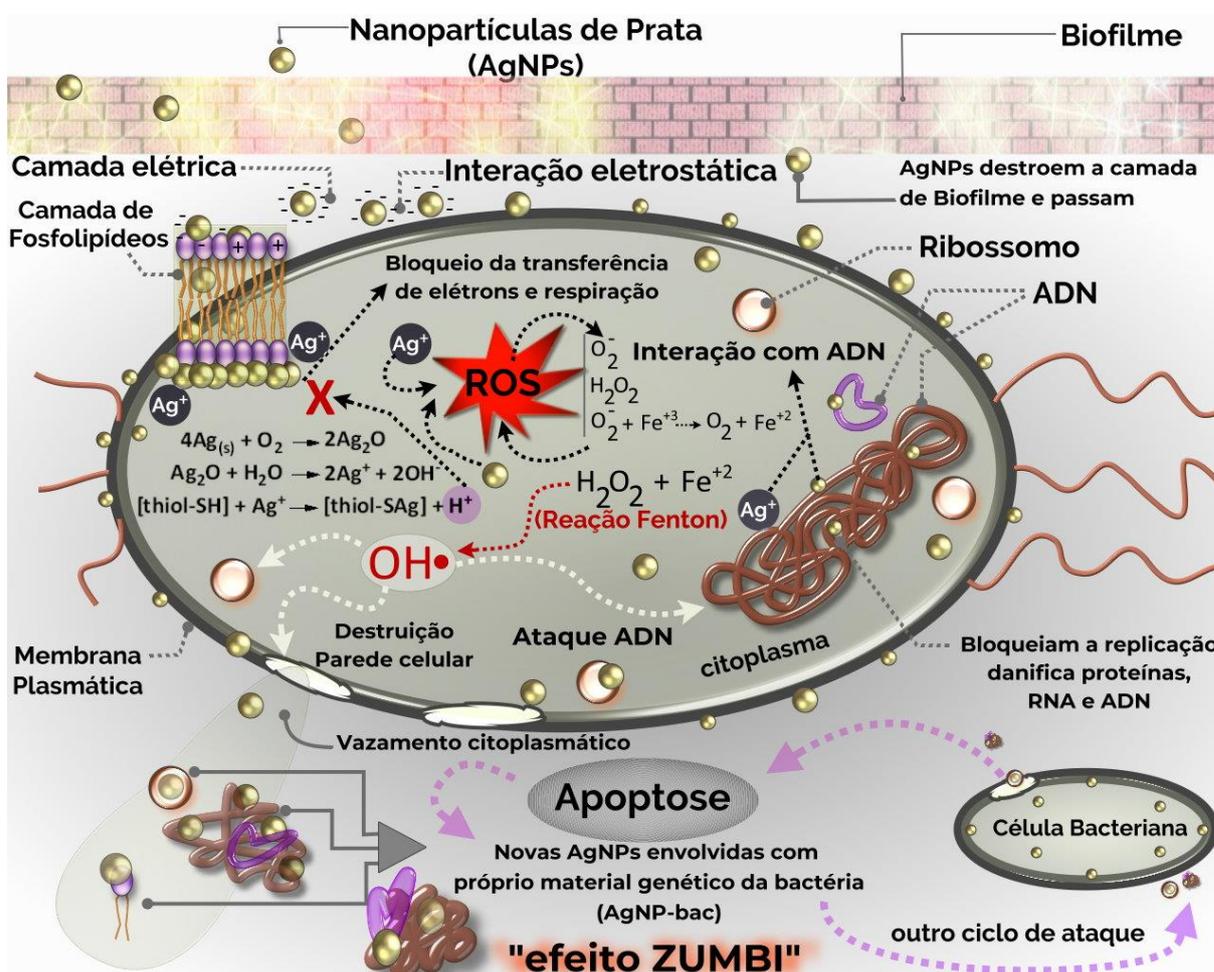


Figura 4 – Mecanismo de ação das nanopartículas de prata (AgNPs) na célula bacteriana



Fonte: (O autor, 2021).

As AgNPs destroem a camada de biofilme e passam através da mesma. Devido à grande densidade eletrônica as AgNPs interagem eletrostaticamente com a camada de fosfolípidos da membrana plasmática atravessando-a e internalizando-se no interior da célula, onde dependendo de seu tamanho e da química de superfície são translocadas para organelas alvo, como a mitocôndria e o núcleo. No interior da célula as AgNPs interagem com proteínas de membrana e provocam uma série de efeitos biológicos, incluindo alteração da morfologia celular, estresse oxidativo, dano ao ADN, genotoxicidade, disfunção mitocondrial e consequente morte celular por apoptose ou necrose (ASHARANI *et al.*, 2009). O íon prata liberado intracelularmente interagem com grupos tiol, como glutatona, superóxido dismutase e tioredoxina, levando ao aumento de peroxidação dos lipídios, estresse oxidativo, dano ao ADN e subsequente morte celular apoptótica.

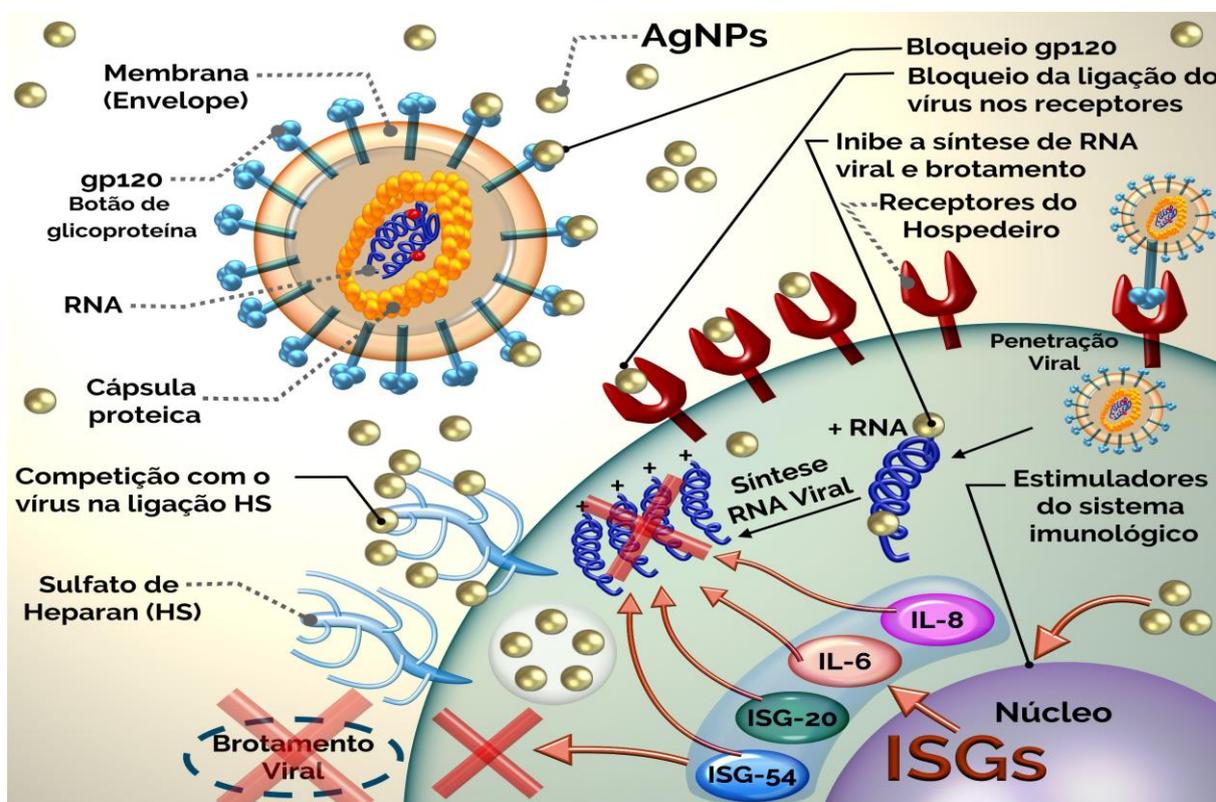
Um mecanismo recente, proposto por Wakshlak, Pedahzur e Avnir (2015) sugere que as AgNPs interagem com os componentes celulares da bactéria morta (RNA, polissacarídeo, fosfolípídeos, proteínas e ADN) e são estabilizadas e envolvidas pelo próprio material genético da bactéria (AgNP-bac). Este novo mecanismo para a ação da prata foi chamado de "efeito zumbi". Devido ao princípio Le-Chatelier, AgNPs são redirecionadas para bactérias vivas com um potencial ainda maior de letalidade de acordo com a Figura 4 (WAKSHLAK; PEDAHZUR; AVNIR, 2015). Este efeito também tem sido percebido em roupas e máscaras com AgNPs, principalmente, neste momento atual da pandemia por síndrome respiratória aguda grave pelo coronavírus 2 (Sar-Cov-2). Estudos mostram que os tecidos revestidos com as AgNPs impedem o crescimento bacteriano e viral mesmo após lavagem e uso constante (BALAGNA *et al.*, 2020).

#### 1.4.2 Efeito sobre os vírus

As AgNPs podem atuar em uma ampla gama de alvos no vírus e inibir a replicação do capsídeo viral. Além disso, há menos chance de desenvolver resistência em comparação aos antivirais convencionais. O surgimento de cepas virais resistentes e a falta de terapias antivirais eficazes torna as AgNPs atrativas para futuros medicamentos antivirais (GALDIERO *et al.*, 2011). O principal mecanismo antiviral das AgNPs é provavelmente a inibição física da ligação entre o vírus e a célula hospedeira (MORI *et al.*, 2013). A infecção viral começa com a adesão do vírus ou ligação aos receptores do hospedeiro, seguida de penetração, replicação e brotamento. As principais estratégias antivirais são bloquear efetivamente a fixação viral nos receptores do hospedeiro (efeito profilático) e inibir a replicação e brotamento viral (efeito terapêutico) (DU *et al.*, 2018; GALDIERO *et al.*, 2011; KHANDELWAL *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* revelam que as AgNPs podem atuar como inibidores da entrada viral, bloqueando a ligação viral aos receptores da célula do hospedeiro e também inibir a síntese de RNA viral de fita negativa e brotamento viral (DU *et al.*, 2018; SPESHOCK *et al.*, 2010). Estudos indicam que AgNPs não afetaram a viabilidade da célula em testes de citotoxicidade mitocondrial ou integridade da membrana plasmática e exibiram capacidade potente de ativar macrófagos para a produção de genes estimuladores de interferon (IFN) ativados (ISGs) e citocinas pró-

inflamatórias como interleucina (IL-6, IL-8 ) (CASTILLO *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2018; LUO; CHANG; LIN, 2015; MORRIS *et al.*, 2019), conforme Figura 5.

Figura 5 - Mecanismo de ação dos AgNPs em células virais



Fonte: (O autor, 2021).

Vários estudos demonstraram a eficácia das AgNPs frente aos vírus: da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), vírus da diarreia epidêmica suína (PEDV) – vírus da família dos Coronavírus, vírus Tacaribe (TCRV), além de vírus respiratórios, como adenovírus, parainfluenza e influenza (H1N1, H3N2), entre outros (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021). Morris e colaboradores (2019) usaram modelos *in vitro* e *in vivo*, em camundongos infectados experimentalmente, e concluíram que as AgNPs reduziram efetivamente a replicação do vírus sincicial respiratório (RSV), e a produção de citocinas pró-inflamatórias em linhagens de células epiteliais e nos pulmões dos camundongos (MORRIS *et al.*, 2019).

Várias teorias ainda são discutidas e podem variar de acordo com cada espécie de vírus e tipos de AgNPs avaliadas. O Quadro 1 organiza sistematicamente alguns estudos para melhor compreensão desse possível mecanismo.

Quadro 1 - Efeitos das nanopartículas de prata (AgNPs) nas células virais

Efeito	Nº	AgNPs (formato, tamanho, concentração)	Virus / Experimento	Ref.
Bloqueio do botão de glicoproteína	1	AgNPs revestidas com BSA e PVP Formato: diversos a maioria não é esférica. Tamanho: 6,53 nm (AgNP-PVP) e 2,08 nm (AgNP-BSA) Concentração: 25 µg/mL	HIV-1 <i>In Vitro</i>	(ELECHIGUERRA <i>et al.</i> , 2005)
	2	AgNPs revestidas com sulfonato de mercaptoetano (AgNPs-MES). Formato: Esférico moderadamente polidisperso Tamanho: 4 ± 1 nm Concentração: 400 µg/mL	HSV-1 <i>In Vitro</i>	(BARAM-PINTO <i>et al.</i> , 2009)
Inibição e bloqueio da ligação do vírus às células hospedeiras	3	idem Nº 1	HIV-1	(ELECHIGUERRA <i>et al.</i> , 2005)
	4	AgNPs com quitosana (Ch) Formato: esférica Tamanho: 3,5, 6,5, and 12,9 nm Concentração: 62 – 77 µg/mL	H1N1 <i>In Vitro</i>	(MORI <i>et al.</i> , 2013)
	5	AgNPs revestida com polissacarídeo Formato: não informado Tamanho: 10 – 80 nm Concentração: 12,5 µg/mL	MPV <i>In Vitro</i>	(ROGERS <i>et al.</i> , 2008)
	6	AgNP revestida com PVP Formato: esférica Tamanho: 8–12 nm Concentração: 50 µg/mL	RSV <i>In Vitro</i> <i>In Vivo</i>	(MORRIS <i>et al.</i> , 2019)
Inibição da síntese de RNA viral e o brotamento	7	Ag <sub>2</sub> S NPs revestidos com glutationa Formato: esférica Tamanho: 3,7 nm Concentração: 46 µg/mL	(PEDV) - Coronavirus Family <i>In Vitro</i>	(DU <i>et al.</i> , 2018)
	8	AgNPs and AgNPs revestidas com polissacarídeo (AgNPs-PS) Formato: esférica Tamanho: 10 and 25 nm Concentração: 25 µg/mL / 50 µg/ml	TCRV <i>In Vitro</i>	(SPESHOCK <i>et al.</i> , 2010)
Estimulação do sistema imunológico e da expressão de citocinas pró-inflamatórias	9	idem Nº 7	(PEDV) - Coronavirus Family <i>In Vitro</i>	(DU <i>et al.</i> , 2018)
	10	idem Nº 6	RSV <i>In Vitro</i> <i>In Vivo</i>	(MORRIS <i>et al.</i> , 2019)
Competição com o vírus para se ligar à célula de sulfato de heparan (HS)	11	idem Nº 2	HSV-1 <i>In Vitro</i>	(BARAM-PINTO <i>et al.</i> , 2009)
Impedimento do vírus revestir o endossomo.	12	idem Nº 8	TCRV <i>In Vitro</i>	(SPESHOCK <i>et al.</i> , 2010)

Legenda: HIV-1: vírus da imunodeficiência humana; H1N1: vírus da influenza; HPV: papilomavirus humano; HSV-1: vírus da herpes simples; PEDV: vírus da diarreia epidêmica porcina; RSV: vírus sincicial respiratória e TCRV: Tacaribe vírus.

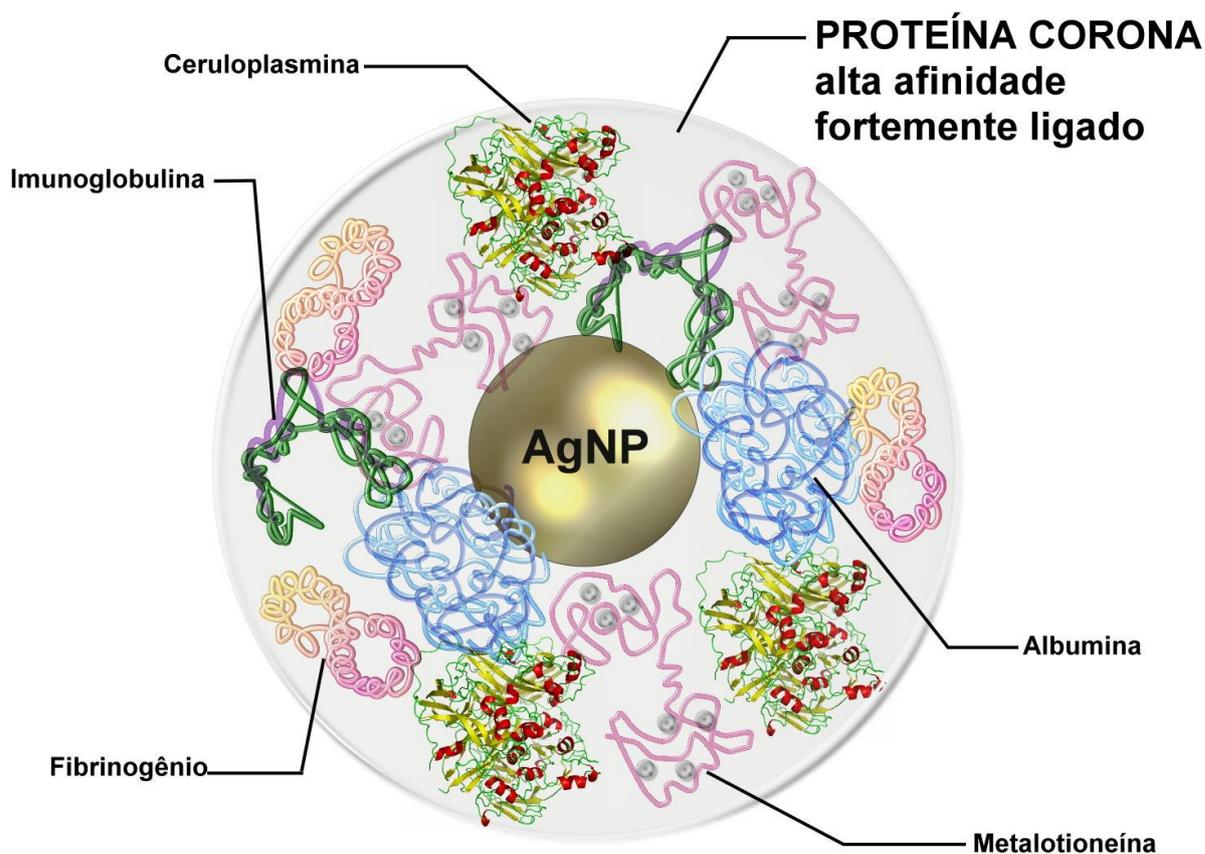
Fonte: (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021).

As doenças respiratórias têm sido cada vez mais comuns, desde a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) até a pandemia atual de COVID-19 causada por SARS-CoV-2 (BALAGNA *et al.*, 2020) . Nesse contexto, visto que as propriedades antivirais dos AgNPs já foram extensivamente testadas através de estudos *in vitro* e *in vivo*, conforme alguns estudos acima citados. E recentemente, foi constatado ser eficaz na inibição de SARS-CoV-2, em roupas e máscaras revestidas de AgNPs (BALAGNA *et al.*, 2020; JEREMIAH *et al.*, 2020), mostrando um potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos para anti-SARS-CoV-2 com AgNPs.

### **1.5 Interações biológicas das AgNPs**

As AgNPs, ao entrarem em contato com o plasma humano, inevitavelmente, em menos de 30 s, adsorvem biomoléculas, como albumina sérica humana (HSA), fibrinogênio, imunoglobulina (IgG), metalotioneína (MT) e ceruloplasmina (CP), formando uma proteína corona (PC) ao redor das AgNPs (CAI; CHEN, 2019; LIU *et al.*, 2017; NEAGU *et al.*, 2017). A PC é um sistema formado por biomoléculas que revestem as NPs e sua composição muda dinamicamente ao longo do tempo até que a composição do PC alcance equilíbrio (HUANG *et al.*, 2016). Esta “coroa biomolecular” (PC) interage em menos de 30 s com as NPs e confere uma nova identidade biológica (CAI; CHEN, 2019; CEDERVALL *et al.*, 2007), conforme Figura 6.

Figura 6 - Representação proteína corona com nanopartículas de prata (AgNPs)

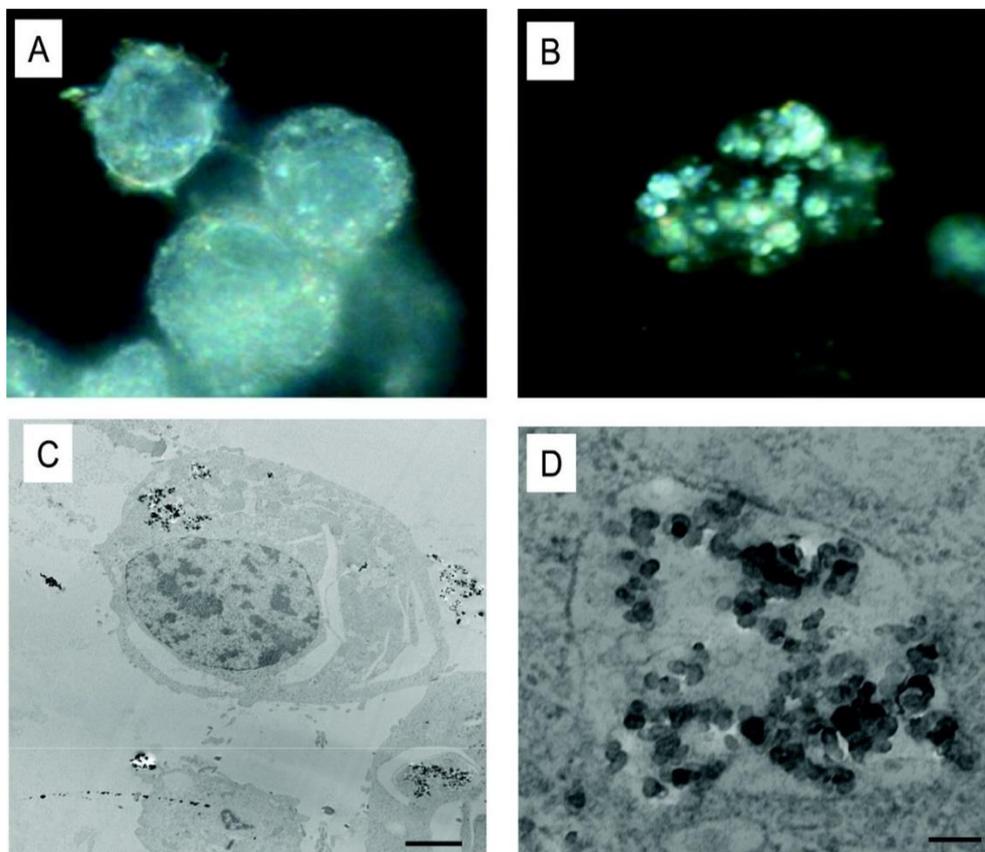


Fonte: (O autor, 2021).

É necessário avaliar a toxicidade das AgNPs quando usadas em aplicações biológicas para entender como a formação da PC pode influenciar as respostas biológicas e citotóxicas e avaliar seu impacto nas interações das células com AgNPs (SILVA *et al.*, 2017). Liu e colaboradores (2017) verificaram em testes experimentais a interação de AgNPs (20 nm) e duas metaloproteínas: metalotioneína (MT) e ceruloplasmina (CP), ambas envolvidas na homeostase de metais, e concluíram que estas proteínas estabilizam e controlam a dissolução e transporte das AgNPs. Carlson e colaboradores (2008) e Castillo e colaboradores (2008) verificaram que as AgNPs permaneceram intactas após interações com macrófagos, sem evidências de dissolução das AgNPs e citotoxicidade. Uma vez dentro das células, após 24 h de exposição, as nanopartículas permaneceram aproximadamente do mesmo tamanho, antes e após a incubação e captação pelas células, como mostrado na Figura 7

(CARLSON *et al.*, 2008). Além disso, demonstraram uma potente capacidade de ativar macrófagos para produzir ISGs e citocinas pró-inflamatórias (CASTILLO *et al.*, 2008).

Figura 7 – Imagens de nanopartículas de prata (AgNPs) por Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da captura de AgNPs por macrófagos



Legenda: (A) Células de controle sem tratamento (B) Células tratadas com 25 µg / mL de AgNPs 30 nm. (C) Células tratadas com 25 µg / mL de AgNP 55 nm após 24 h de incubação e (D) micrografia ampliada da células em (C) mostrando as AgNPs acumuladas.

Fonte: Reproduzido com permissão de (CARLSON *et al.*, 2008).

Mathur e colaboradores (2018), em estudo *in vivo* com ratos, verificaram que estes, após ingestão por via oral das AgNPs com 14 nm, excretaram na urina menos de 0,1% da dose administrada no período de 24 horas, porém nas fezes 63% da dose diária foi excretada (MATHUR *et al.*, 2018).

Compreender a interação de AgNPs com a formação da PC é essencial para estabelecer novos estudos *in vivo* e para serem usados em futuras aplicações biomédicas seguras e eficazes (LIU *et al.*, 2017), bem como os dados farmacocinéticos e de biodistribuição das AgNPs (MATHUR *et al.*, 2018).

## 1.6 Toxicidade de AgNPs

A prata tem sido usada como um agente antimicrobiano há muito tempo. O único efeito colateral relatado foi a argíria, que é uma condição caracterizada por alterações pigmentares de prata e acúmulo da mesma na pele e membranas mucosas. A toxicidade das AgNPs está intimamente relacionada à liberação de  $\text{Ag}^+$  (MOLLEMAN; HIEMSTRA, 2015). Estudos com células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) tratadas com diferentes concentrações de  $\text{Ag}^+$ , por 24 h, em condições de cultivo celular, indicam que uma concentração de 2,5 ppm diminuiu a viabilidade celular em 60% e 5,0 ppm em 100%, quando comparado ao controle. Por outro lado, as AgNPs, preparadas imediatamente antes dos testes biológicos e em processo sem oxigênio (para evitar a oxidação e liberação de íons de prata), na concentração de 30 ppm, não causou redução da viabilidade celular em comparação com o controle (GREULICH *et al.*, 2012).

As exposições humanas à prata ocorrem principalmente por meio de três vias diferentes de exposição, incluindo dérmica, oral e inalação e, depois disso, as AgNPs podem se acumular em órgãos secundários, incluindo fígado, baço e cérebro. Embora uma grande quantidade de dados esteja disponível sobre a aplicabilidade e toxicidade das AgNPs, não há procedimentos padrões para se preparar AgNPs ou para avaliar sua toxicidade (KORANI *et al.*, 2015). Munger e colaboradores (2014) realizaram estudo *in vivo* em 60 indivíduos saudáveis com ingestão oral de soluções comerciais de 10 e 32 ppm de AgNPs. Após exposição oral, nenhuma alteração clínica foi observada nos pulmões, coração ou órgãos abdominais. Além disso, nenhuma alteração morfológica nos referidos órgãos foi detectada e não foram observadas alterações significativas de ROS pulmonares ou no aumento das citocinas pró-inflamatórias (MUNGER *et al.*, 2014). A agência de saúde da Austrália informa sobre a toxicidade oral das AgNPs: 'Estudos relatam baixa toxicidade em ratos, camundongos e porquinhos-da-índia após ingestão (deglutição). Nestes estudos com roedores, o grau de toxicidade dependia do tamanho das partículas e da dose administrada.' (NICNAS, 2018a)

A toxicidade dos AgNPs foi avaliada em vários estudos, mas são poucos os pesquisadores que consideraram o teor de  $\text{Ag}^+$  que as soluções de AgNPs contêm (PIAO *et al.*, 2011). Para uma avaliação segura, incluindo todos os estudos envolvendo AgNPs, nos níveis químico, farmacológico, biológico e toxicológico, deve-

se considerar a identificação e quantificação das espécies de AgNPs e do teor de  $\text{Ag}^+$ , pois seus comportamentos e mecanismos são distintos (LIU et al., 2012b; MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021; SADEGHI et al., 2012). Embora o íon  $\text{Ag}^+$  em nosso organismo tenha propriedades antimicrobianas (como AgNPs), ele é classificado como um dos principais agentes responsáveis pela toxicidade da prata e argíria em nosso corpo. Quando o  $\text{Ag}^+$  entra na corrente sanguínea é transportado pelo sangue ligado às proteínas albumina através dos grupos tióis e, quando atinge uma região próxima à pele em áreas afetadas pela luz, pode ser facilmente fotorreduzido para AgNPs, que são imobilizados na epiderme. A imobilização é tanto física, devido à baixa difusividade das partículas, quanto química, uma vez que as reações de troca de tiol ocorrem com  $\text{Ag}^+$ , mas não com AgNPs. Isso traz novos esclarecimentos sobre o processo de formação da argíria, que está diretamente relacionada com o teor de  $\text{Ag}^+$  livre (GORDON *et al.*, 2010; RUSSELL; HUGO, 1994).

Com relação ao teor de prata na água permitido por agências de saúde regulatórias, temos, no Brasil, a Portaria 2914/2011, que dispõe sobre o padrão de potabilidade da água para consumo humano, mas que não apresenta nenhum tipo de referência ao teor de prata na água. No entanto, a *World Health Organization* (WHO) especifica um teor máximo de  $\text{Ag}^+$  de até 0,1 mg/L a ser tolerado na água potável sem que haja riscos para a saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017b).

Muitos dos artigos apresentados sobre a toxicidade das AgNPs não informam o teor de  $\text{Ag}^+$  encontrados nas soluções de AgNPs, no momento do teste, e alguns chegam a aplicar doses extremamente altas, e muito maiores do que a necessária para algumas das aplicações expostas aqui no presente trabalho.

## 1.7 Estabilidade físico-química das AgNPs

A estabilidade é a amplitude de tempo na qual um produto mantém, dentro de limites especificados e durante seu período de armazenamento e uso, as mesmas propriedades e características que possuía quando fabricado. Semelhante aos insumos farmacêuticos ativos convencionais, a estabilidade das AgNPs pode ser afetada por um ou mais fatores, como temperatura, pH, exposição à luz, teor de oxigênio dissolvido e até a presença de outros excipientes e impurezas (HALL *et al.*, 2007).

As propriedades físico-químicas das AgNPs dependem de parâmetros como tamanho de partícula, distribuição, superfície, carga superficial, funcionalidade da superfície, forma e estado de agregação. Além disso, como muitos conceitos de nanopartículas (NPs) são multifuncionais, a estabilidade e a distribuição desses componentes também podem ter efeitos muito intensos na atividade biológica e na toxicidade das NPs (TYNER; SADRIEH, 2011).

#### 1.7.1 Fatores Extrínsecos que afetam a estabilidade físico-química das AgNPs

São considerados fatores extrínsecos todos os fatores externos aos quais o produto está exposto (SONG; LEE; HAN, 2017). Para as AgNPs, a temperatura e a exposição à luz são fatores críticos fundamentais para garantir a estabilidade durante o transporte e armazenamento das AgNPs (GRILLET *et al.*, 2013; KITTLER *et al.*, 2010; LIU; HURT, 2010).

##### 1.7.1.1 Estabilidade das AgNPs a temperatura

A temperatura de armazenamento é um fator crítico que influencia a taxa de oxidação da prata, dissolução oxidativa das AgNPs. Quanto maior a temperatura, maior será a velocidade de dissolução oxidativa (KITTLER *et al.*, 2010; LIU; HURT, 2010). Kittler e colaboradores (2010) estudaram a dissolução de AgNPs com tamanho de 50 nm dispersas em água nas temperaturas de 5 °C, 25 °C e 37 °C durante 125 dias e observaram a liberação de Ag<sup>+</sup> de aproximadamente 5% a 5 °C para 50% a 25 °C e 90% a 37 °C (KITTLER *et al.*, 2010).

Liu e Hurt (2010) armazenaram AgNPs na temperatura de 4 °C por 5 meses e, por meio da espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-VIS), verificaram a estabilidade das AgNPs na temperatura de 5 °C, confirmando sua estabilidade nesta temperatura.

##### 1.7.1.2 Estabilidade das AgNPs ao congelamento

A água possui propriedades físico-químicas únicas e apresenta comportamentos anômalos conhecidos, como sua expansão de volume entre -4 a

0°C. À medida que a água congela, formam-se cristais hexagonais onde cada oxigênio é "ligado" por uma combinação de uma ligação covalente e uma ligação de hidrogênio a 4 outros oxigênios e, nesta forma, a água se expande. Os cristais formados pelo congelamento da água assumem formas variadas à medida que as temperaturas continuam a cair e afetam as pressões exercidas pelo gelo confinado (MANNI *et al.*, 2018).

Quando duas ou mais partículas, carregadas eletricamente com a mesma carga em suspensão em um meio polar (com dipolo permanente) ocorre a repulsão eletrostática e a força de interação entre estas partículas dipolo induzido (campo eletromagnético NP) e o dipolo permanente (água), conhecida como indução de Debye. No entanto, o congelamento do meio conduz as partículas a uma proximidade máxima e, neste caso, tanto as interações eletrostáticas quanto as forças de Van der Waals contribuem para a força de interação total entre as partículas, aglomerando e desestabilizando-as as AgNPs (MORGAN; GREEN, 2003).

A liofilização é um bom método de secagem de sistemas coloidais e aumenta suas estabilidades (GUPTA; KOMPELLA, 2006). Devido ao problema da dissolução oxidativa das AgNPs e agregação, poderiam ser uma forma de aumentar a validade e segurança deste produto.

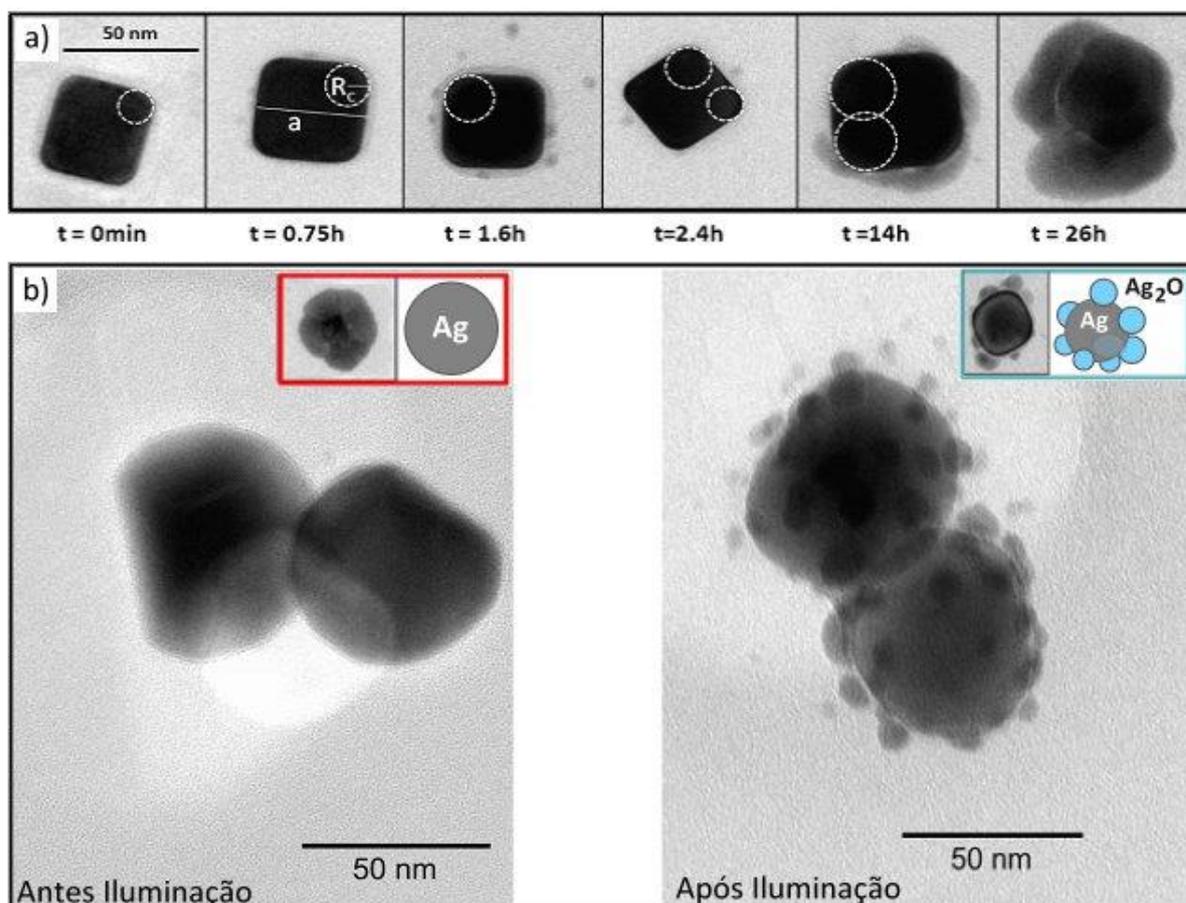
#### 1.7.1.3 Estabilidade das AgNPs a exposição à luz

Jin (2001) irradiou uma solução aquosa de AgNPs esféricas com luz fluorescente de 40 W durante 70 h, e observou a conversão de nanoesferas em nanoprismas, decorrente desta irradiação (JIN, 2001).

Grillet e colaboradores (2013) estudaram o efeito da irradiação de luz em Ag NPs com morfologia esférica e cúbica, em condições ambientais. Em ambos os casos, o efeito do fotoenvelhecimento foi estudado, avaliando o impacto da incidência de luz artificial (filamento de tungstênio, temperatura de luz de 3200k) com uma potência de 1  $\mu$ W focada em uma área de 1  $\mu$ m<sup>2</sup>. A formação perceptível de NPs ainda menores de Ag<sub>2</sub>O em torno das AgNPs esféricas, após a exposição à luz, observada na micrografia da microscopia eletrônica de transmissão (TEM), mostrada na Figura 8a, confirmou o rápido processo de foto-oxidação (GRILLET, 2011; GRILLET *et al.*, 2013). Após 40 h de irradiação de luz, o nível de oxidação em AgNPs cúbicas foi de cerca de 30%, enquanto levaram apenas 9 h de irradiação de luz no caso de AgNPs esféricas,

confirmando que o processo de oxidação foi muito mais lento no caso de AgNPs cúbicas como observada a partir das micrografias da TEM representadas na Figura 8b.

Figura 8 - Foto-oxidação das nanopartículas de prata (AgNPs)



Legenda: a) Micrografias comparativas de TEM de AgNPs esféricas antes e depois da irradiação de luz. b) Micrografias TEM que representam os AgNPs cúbicos que foram continuamente irradiados com luz durante o tempo  $t = 0$  min, 45 min, 1,6 h, 2,4 h, 14 h e 26 h, respectivamente, com formação de pequenas NPs de óxido de prata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) evidenciando a foto-oxidação das AgNPs.

Fonte: Adaptado com permissão de (GRILLET *et al.*, 2013).

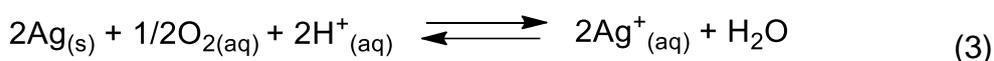
### 1.7.2 Fatores Intrínsecos que afetam a estabilidade físico-química das AgNPs

Fatores intrínsecos são fatores relacionados à própria natureza da formulação e, sobretudo, à interação de seus ingredientes entre si e/ou com a embalagem (SONG; LEE; HAN, 2017). No caso das AgNPs, respeitando suas características físico-químicas, foram observados que os parâmetros de controle da estabilidade química das AgNPs como: pH, oxigênio dissolvido, PZ e a viscosidade do meio (velocidade de

sedimentação), proporcionam maior estabilidade às AgNPs (KITTLER *et al.*, 2010; LIU; HURT, 2010).

#### 1.7.2.1 Estabilidade das AgNPs ao pH

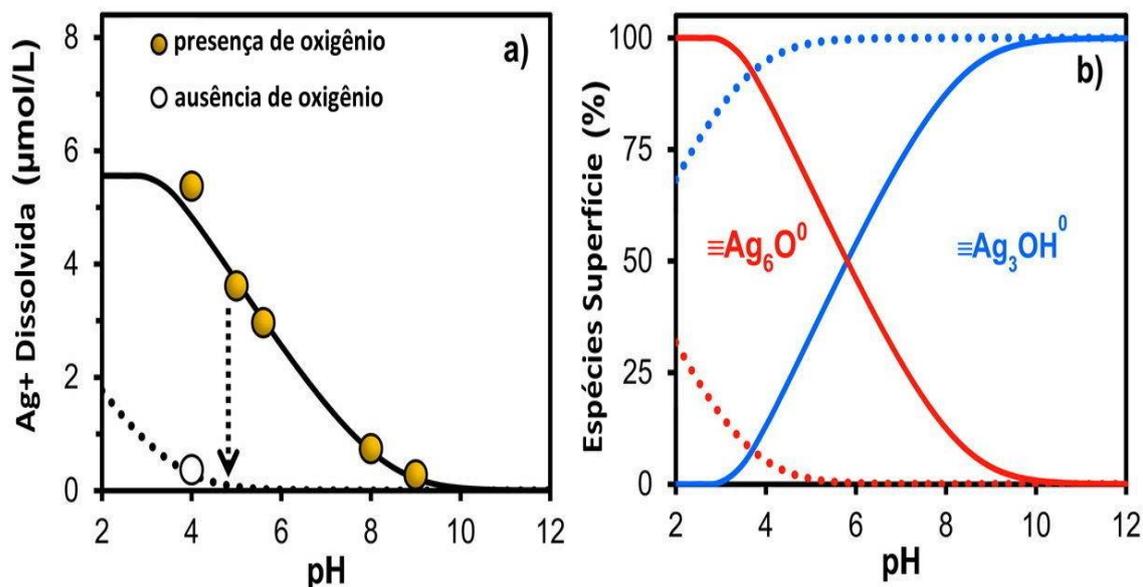
Estudos experimentais mostraram que em baixo pH, em geral, há o aumento da cinética de liberação de Ag<sup>+</sup> no meio (LIU; HURT, 2010; MOLLEMAN; HIEMSTRA, 2015; PERETYAZHKO; ZHANG; COLVIN, 2014). Liu e Hurt (2010) estudaram a dissolução de AgNPs em soluções aquosas tamponadas (tampão acetato e borato), em uma faixa de pH de 4 a 9 e observaram que o aumento do pH de 4 para 9 resultou em 10 vezes menos liberação de Ag<sup>+</sup>. A formação de uma camada protetora envolvendo as AgNPs ocorre com a formação da espécie Ag<sub>3</sub>OH<sup>0</sup>, que é iniciada a partir de pH 9,0. Esta camada atua como uma blindagem do processo dissolutivo das AgNPs (MOLLEMAN; HIEMSTRA, 2015; ZHANG *et al.*, 2011b). A dissolução AgNPs é maximizada em meio ácido e na presença de oxigênio dissolvido. A reação global do oxigênio como agente oxidante é demonstrada na equação 3 (LIU; HURT, 2010).



#### 1.7.2.2 Estabilidade das AgNPs ao oxigênio dissolvido

Liu e Hurt (2010) verificaram a extensão da liberação de prata dissolvida de AgNPs em água em função do oxigênio dissolvido e do pH. Várias medições de quantificação de Ag<sup>+</sup> foram realizadas em função do tempo. As AgNPs foram produzidas de duas formas. Na primeira, a água utilizada estava em soluções saturadas de ar (9,1 ppm O<sub>2</sub> dissolvido). Em contraste, na segunda forma de preparo, foi utilizada uma água com baixo teor de oxigênio dissolvido (purgada) (0,1 ppm O<sub>2</sub> dissolvido). Concluiu-se que a remoção do oxigênio dissolvido inibe completamente a liberação de prata dissolvida, indicando que o controle do teor de oxigênio dissolvido é essencial para evitar a oxidação das AgNPs, iniciada pelo O<sub>2</sub>, conforme mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Curva de dissolução de  $\text{Ag}^+$  em função da presença do pH na presença ou ausência de oxigênio e curvas de especiação de óxidos e hidróxidos de prata em função do pH



Legenda: a) Liberação de  $\text{Ag}^+$  após 1 dia de reação na presença de oxigênio. A seta pontilhada indica diminuição da liberação de  $\text{Ag}^+$  quando as AgNPs foram purgadas com  $\text{N}_2$ . Nesse caso, não há oxigênio dissolvido disponível para liberação oxidativa. b) Curva de especiação para a formação das espécies  $\text{Ag}_6\text{O}^0$  e  $\text{Ag}_3\text{OH}^0$  em função do pH. As linhas pontilhadas referem-se a um sistema sem oxigênio. Fonte: Reproduzido com permissão de (MOLLEMAN; HIEMSTRA, 2015).

Zhang e colaboradores (2011) verificaram que as taxas de dissolução oxidativa das AgNPs dependem do tamanho e concentração das partículas primárias, quando outros fatores ambientais (por exemplo, oxigênio dissolvido e prótons) eram mantidos constantes (ZHANG *et al.*, 2011b).

### 1.7.2.3 Estabilidade das AgNPs e o potencial zeta (PZ)

A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons ao seu redor, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície. Desse modo, forma-se uma dupla camada elétrica na superfície da partícula com o meio dispersante (dupla camada elétrica). Para garantir a estabilidade a longo prazo das nanopartículas, é essencial ter alto potencial elétrico repulsivo, e AgNPs com altos valores de PZ (módulo) maior do que  $-30$  mV criam uma força repulsiva suficientemente alta e protegem as partículas (CHAKRABORTY; PANIGRAHI, 2020). A estabilidade das nanopartículas carregadas depende da repulsão eletrostática e esta, por sua vez, depende da espessura da camada difusa, distância de Debye-

Hückel ( $k^{-1}$ ). Dessa forma, quanto menor a concentração de eletrólito no meio, maior será a distância na qual ainda existe potencial eletrostático ( $\Psi$ ) significativo e, portanto, menos favorável será a agregação das partículas (LOWRY *et al.*, 2016). O PZ aumenta, também, com o aumento do pH, o que melhora a estabilidade de dispersão das nanopartículas (HUANG *et al.*, 2009). Maiores informações sobre o PZ estão descritas no item 1.9.4

#### 1.7.2.4 Estabilidade das AgNPs a sedimentação

Outro ponto importante de estudo é a velocidade de sedimentação das AgNPs em suspensão. A sedimentação é o resultado da interação entre as partículas devido ao movimento browniano e a ação da força de gravidade sobre elas. O comportamento de sedimentação das nanopartículas é significativamente alterado pelo tamanho das partículas e a viscosidade do meio (MIDELET *et al.*, 2017). Para elucidar a influência do tamanho da partícula, considera-se uma simulação de velocidade de sedimentação de AgNPs com formato esférico, em solvente água e variação da viscosidade do meio, utilizando a Lei de Stokes conforme equação 4 (MIDELET *et al.*, 2017), coeficiente de sedimentação de partículas.

$$S = \frac{2}{9} \frac{r^2(\rho - \rho_A)}{\eta} \quad (4)$$

Onde  $r$  é o diâmetro das AgNPs,  $\rho$  a densidade das AgNPs,  $\rho_A$  a densidade da fase dispersante,  $\eta$  a viscosidade e  $S$  é o coeficiente de sedimentação.

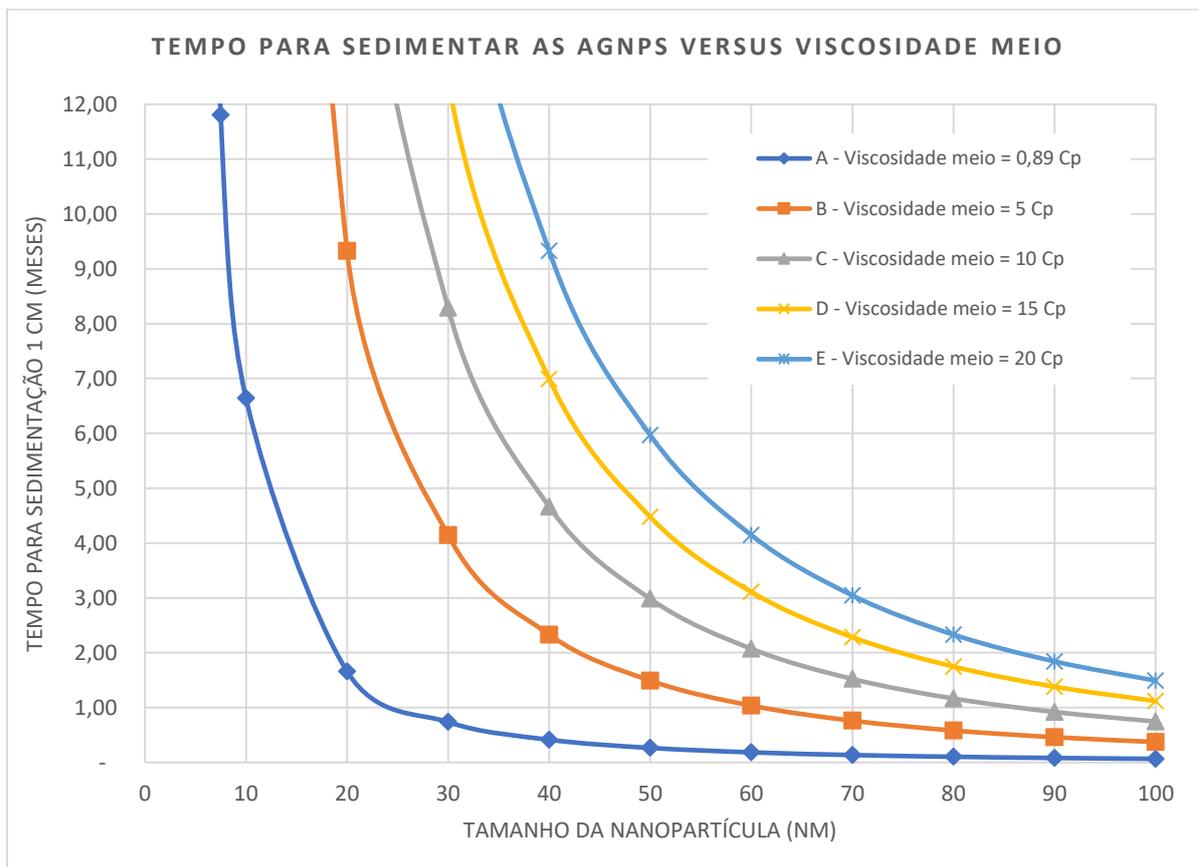
A velocidade de sedimentação de uma partícula influenciada pela força gravitacional ( $g$ ) em um líquido viscoso, na ausência de movimento browniano, é dada pelo coeficiente de sedimentação ( $S$ ) multiplicado pela constante de gravidade ( $g$ ), conforme equação 5 (MIDELET *et al.*, 2017).

$$V = S \times g \quad (5)$$

Aplicando-se a equação 4 e 5 e considerando a densidade de Ag de  $10,49 \text{ g cm}^{-3}$ , da água de  $0,997 \text{ g cm}^{-3}$ , a gravidade  $980,665 \text{ cm s}^{-2}$  e a viscosidade da água a  $25^\circ \text{ C}$  de  $0,890 \text{ cP}$ , foi relacionada a velocidade de sedimentação com o tamanho da AgNP e com a viscosidade do meio, para meios com viscosidade de  $0,89$ ;  $5$ ;  $10$ ;  $15$  e  $20 \text{ cP}$ , conforme apresentado na Figura 10. E, também, relacionado o tempo de

sedimentação de 1 cm da AgNPs (em meses) com tamanho e viscosidade do meio, para os mesmos meios, conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Tempo de sedimentação de 1 cm das AgNPs (em meses) de acordo com tamanho e viscosidade do meio



Fonte: (O autor, 2021).

A explicação para esse resultado se dá, pois, quanto menor o tamanho da partícula, menor será sua massa e, conseqüentemente, menor será a ação da gravidade sobre as partículas. Na Figura 10 é possível visualizar um aumento significativo na estabilidade no aspecto da sedimentação da AgNPs com tamanho de 40 nm, por exemplo, uma viscosidade de 20 Cp seria capaz de diminuir o tempo de sedimentação para 9 meses aproximadamente, comparado com aproximadamente 10 dias para a mesma partícula na viscosidade da água, que é 0,89 cP (25°C).

## 1.8 Síntese das AgNPs

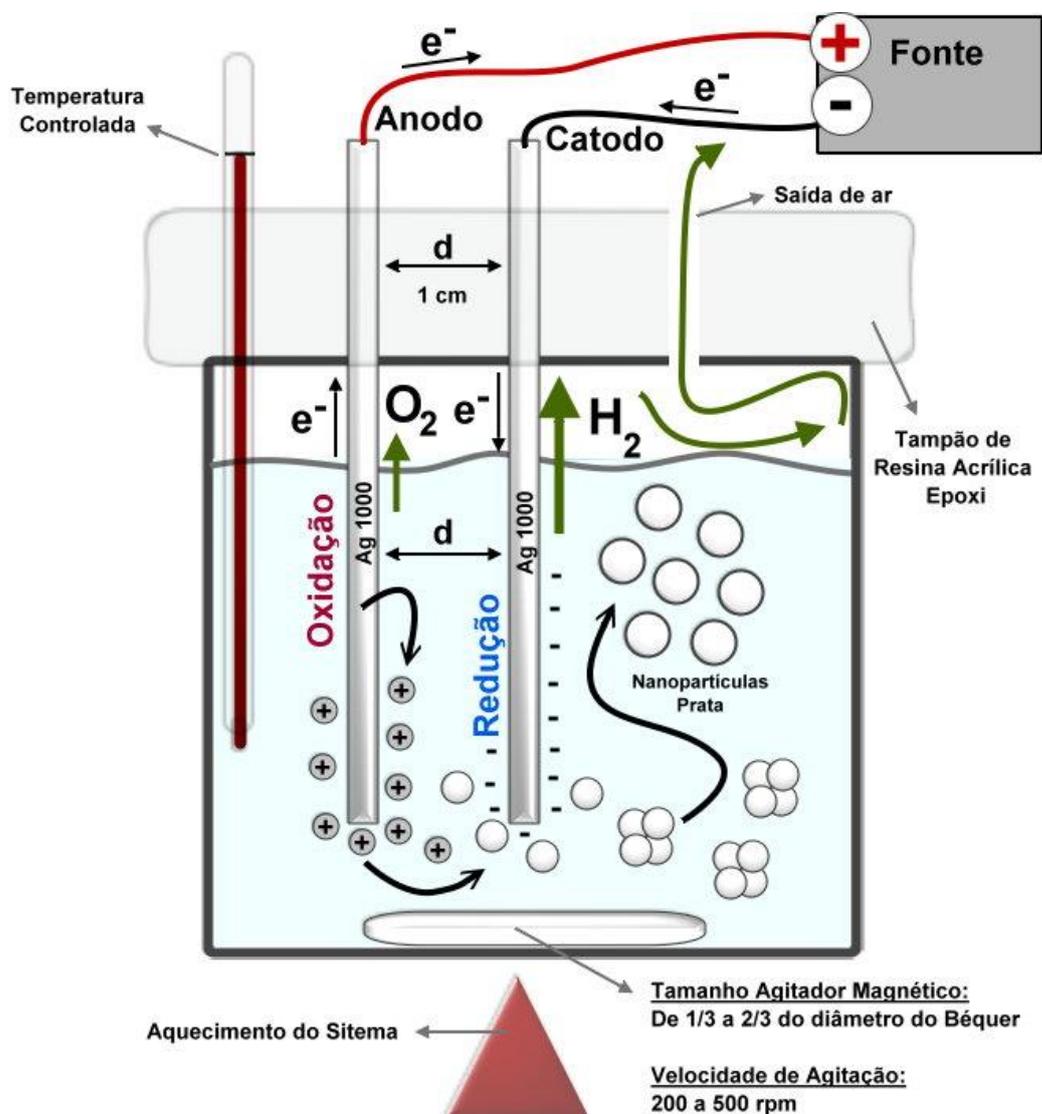
Existem diversos processos de síntese que permitem a obtenção de diferentes tipos de AgNPs em morfologia, tamanho e estabilidade (CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR, 2004). Entre os métodos de preparação das NPs pode-se distinguir dois grupos de processos definidos para sua obtenção: os *top-down* e *bottom-up*. O processo de cima para baixo (*top-down*) inclui os métodos de processamento do material volumétrico sólido (*bulk*), que são métodos físicos, como corrosão por plasma, litografia por feixe de elétrons e outros para desgastar e quebrar em partículas até chegar às nanopartículas. Por outro lado, os processos *bottom-up* são impulsionados quimicamente para que átomos se agrupem em unidade de células e cresçam formando as NPs (REVERBERI *et al.*, 2016).

Como um dos principais focos deste trabalho é a síntese, destacamos os princípios básicos de algumas sínteses clássicas que são detalhadas nas seções a seguir.

### 1.8.1 Método eletroquímico

O processo proposto para a obtenção de AgNPs baseia-se no uso de dois eletrodos, onde ânodo e cátodo são feitos do metal Prata 1000 (ou 100% de prata), para serem transformados em AgNPs. Os eletrodos são imersos em uma célula eletroquímica com água ultra pura, conforme Figura 11 (KHAYDAROV *et al.*, 2009).

Figura 11 - Eletrólise com eletrodos de Prata em água com formação de nanopartículas de prata



Fonte: (O autor, 2021).

As etapas e as reações químicas envolvidas na eletrólise da prata em água são explicitadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Etapas da eletrólise de AgNPs

Etapas da reação		Reação química	Número da equação
1°	Dissolução oxidativa do ânodo Ag sacrificial (anodo)	$\text{Ag} \longrightarrow \text{Ag}^+ + 1\text{e}^-$	(6)
2°	Liberação dos gases oxigênio e hidrogênio	$4\text{H}_3\text{O}^+ + 4\text{e}^- \longrightarrow 4\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}_2$ (catodo)	(7)
		$4\text{OH}^- \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4\text{e}^-$ (anodo)	(8)
		$2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$ (equação global)	(9)
3°	Formação das unidades de célula de prata composta por 4 átomos (catodo)	$\text{Ag}^+ + 1\text{e}^- \longrightarrow \text{Ag}^0$	(10)
		$\text{Ag}^0 + \text{Ag}^+ \longrightarrow \text{Ag}_2^+$	(11)
		$\text{Ag}_2^+ + \text{Ag}_2^+ \longrightarrow [\text{Ag}]_4^{+2}$	(12)
4°	Formação das AgNPs por nucleação e crescimento	$[\text{Ag}]_4^{+2} + 2\text{e}^- \longrightarrow [\text{Ag}]_4$	(13)

Fonte: (O autor, 2021).

No anodo temos a oxidação de eletrodo de sacrifício fornecendo  $\text{Ag}^+$  no sistema e em igual proporção estes são reduzidos pela fonte de elétrons provenientes do anodo, conforme as etapas descritas no Quadro 2. Para obtenção de partículas menores e monodispersas, o processo de nucleação deve ser lento, contínuo e homogêneo (FELDHEIM; FOSS, 2002).

MA e colaboradores (2004) avaliaram a influência da velocidade de agitação do meio reacional, durante a eletrólise, e verificaram que a mesma tem grande influência sobre o tamanho das partículas e o grau de dispersão. No caso de velocidades de rotação relativamente baixas (500 e 750 rpm), são geradas nanopartículas de prata maiores e polidispersas. Partículas esféricas de AgNP, com

tamanho médio de 10 nm e monodispersas foram obtidos com velocidades de rotação relativamente altas 1000 rpm a 1500 rpm (MA *et al.*, 2004).

Khaydarov e colaboradores (2009) realizaram a eletrólise com eletrodos de prata 1000 com variações na temperatura de 40 a 80 °C e na corrente aplicada, a uma tensão constante de 20 V, conforme Figura 12. No primeiro estágio descrito do processo da síntese eletroquímica, a polaridade da corrente direta entre os eletrodos era trocada periodicamente (a cada 30-300s) o que reduziu significativamente a eletrodeposição de Ag<sub>2</sub>O no cátodo. Assim que a polaridade muda, na superfície do cátodo antigo começa a redução de Ag<sub>2</sub>O em Ag, devido a formação de hidrogênio no anodo conforme equação 14.

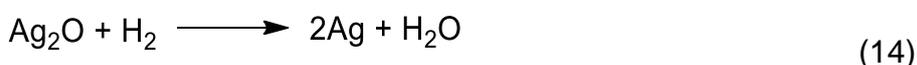
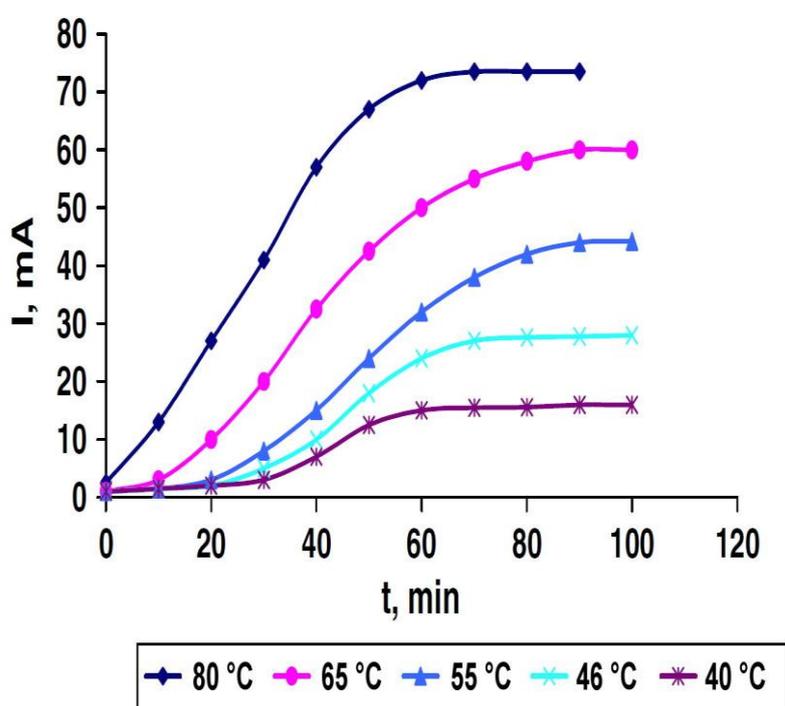


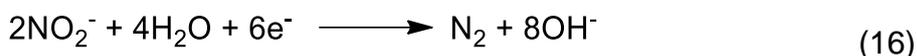
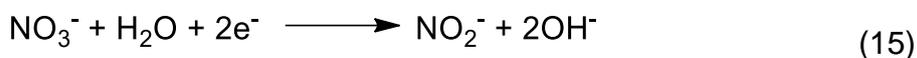
Figura 12 - Corrente em mA do sistema versus tempo de processo para diferentes temperaturas, voltagem de 20 V constante



Fonte: (KHAYDAROV *et al.*, 2009).

Para que a transferência de elétrons aconteça, é fundamental a presença do nitrato no meio, sob a forma de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>), que atua aumentando a condutividade do meio reacional e facilitando o transporte de elétrons (PAUNOVIC,

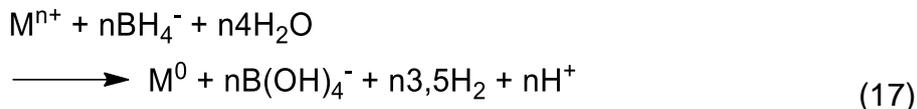
2007). Durante a eletrólise, em baixa corrente, o nitrato é reduzido a nitrito e em seguida a nitrogênio, conforme equações 15 e 16 (LI *et al.*, 2009; PAUNOVIC, 2007).



### 1.8.2 Redução pelo borohidreto (BH<sub>4</sub>)

Van Hying e Zukoski (1998) realizaram as primeiras tentativas de síntese de AgNPs usando BH<sub>4</sub>

como agente redutor (VAN HYNING; ZUKOSKI, 1998). A equação global do processo é apresentada na equação 17 (WUITHSCHICK *et al.*, 2013). Em resumo, está técnica usa um redutor forte, o NaBH<sub>4</sub> (E<sub>red</sub> = -0,481V), que reage com a prata (E<sub>red</sub> = 0,80V) de forma espontânea, pois ΔE da reação é igual a 1,28V.



Onde, M<sup>n+</sup> é o íon metálico precursor e M<sup>0</sup> é o elemento metálico em seu estado fundamental.

Resultados experimentais levam a um mecanismo de crescimento que consiste em quatro etapas: 1.redução, 2.coalescência, 3.estado metaestável e 4.coalescência final, conforme explicitados no Quadro 3 (POLTE *et al.*, 2012; WUITHSCHICK *et al.*, 2013).

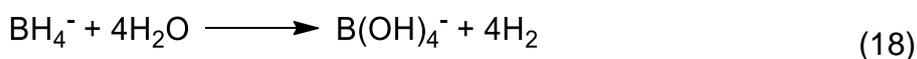
Quadro 3 – Etapas envolvidas na reação de obtenção das AgNPs pela redução do borohidreto

Etapa		Polidispersibilidade	Tamanho médio	Tempo
1	Redução	> 60%	< 1 nm	< 200 ms
2	Coalescência	60%	1 a 2 nm	5 s a 120 s
3	Estado metaestável	< 60%	Tamanho permanece constante (1 a 2 nm)	5 a 20 minutos
4	Coalescência final	-	-	30 a 90 minutos
5	AgNPs	15 a 20%	4 a 10 nm	

Fonte: (O autor, 2021).

A presença de oxigênio durante este processo leva a formação de óxidos e diminui a estabilização eletrostática das AgNPs provocando, em consequência, sua agregação. A adição de agentes estabilizadores para revestir as AgNPs formadas, como polivinilpirrolidona (PVP), citrato e outros, no meio reacional, não altera o mecanismo de crescimento e, por consequência, o tamanho final (o tamanho final é de fato o mesmo que sem PVP), mas afeta a duração de cada etapa e diminui a polidispersibilidade (POLTE *et al.*, 2012; WUITHSCHICK *et al.*, 2013).

A estequiometria da reação do  $\text{Ag}^+$  com  $\text{BH}_4^-$  é 1:1, porém um pequeno excesso pode ser conveniente, visto que o ânion permanece em solução ajudando a estabilizar as nanopartículas formadas (estabilização eletrostática) e, ao término, o excesso de  $\text{BH}_4^-$  livre se hidrolisa conforme equação 18, diminuindo o teor do íon borohidreto livre. A hidrólise é mais lenta em comparação com a reação de redução dos metais e, portanto, só é iniciada após toda a prata ter sido reduzida (WUITHSCHICK *et al.*, 2013).



### 1.8.3 Redução pelo íon Citrato

Turkevich e colaboradores (1951) relataram a síntese de nanopartículas de ouro, em solução, usando citrato de sódio para reduzir  $\text{AuCl}_4^-$ . Desde então, essa metodologia, conhecida como método de Turkevich, foi estendida a outros metais como a prata (PILLAI; KAMAT, 2004; TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951).

Sabe-se agora que o citrato age tanto para reduzir o cátion metálico ( $\text{Ag}^+$ ), bem como para estabilizar as nanopartículas resultantes.

### 1.8.4 Síntese verde de AgNPs com Matéria Orgânica Natural

Matéria orgânica natural (NOM) é uma mistura heterogênea de macromoléculas naturais derivada de extratos de plantas, ácidos húmicos e ácidos fúlvicos.

Sabe-se que a NOM é reativa às reações de oxirredução e desempenha papéis importantes na redução de muitos elementos. Nos últimos anos, verificou-se que a NOM também pode reduzir o  $\text{Ag}^+$  a AgNP (LIU; JIANG, 2015)

Infinitas possibilidades podem ser obtidas com a reação de diversos extratos orgânicos com o  $\text{Ag}^+$  para a obtenção das AgNPs, também conhecida como síntese verde. Sankar e colaboradores (2013) converteram 100% do íon prata em AgNPs da seguinte forma: 90 ml de solução 1 mM de nitrato de prata foi misturado com 10 ml de extrato aquoso *Origanum vulgare* 10% e aquecido a 90° C por 10 minutos. Ocorreu a formação de AgNPs de morfologia esférica, monodispersiva com tamanhos entre 63–85 nm (SANKAR *et al.*, 2013).

A utilização de extratos orgânicos de plantas, que já possuem uma propriedade conhecida, como por exemplo a Quina-amarela (*Cinchona ledgeriana*), que foi usada pelo sanitarista Carlos Chagas para tratamento da malária (BENCHIMOL; DA SILVA, 2008) e foi incluída na lista de plantas medicinais essenciais da *World Health Organization* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b). O extrato de folhas de Aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius leaf*) com sua promissora atividade antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, gastroprotetora e carminativa (BENDAOUD *et al.*, 2010; MUHS *et al.*, 2017; YASMIM ALMEIDA LIMA *et al.*, 2017). Temos ainda a propriedade antibiofilme do extrato das folhas de Louro (*Laurus nobilis*) (CAPUTO *et al.*, 2017; MERGHNI *et al.*, 2016; SPERONI *et al.*, 2011) e muitos outros exemplos

poderiam ser citados. Estas plantas podem, em sinergismo com as AgNPs, produzir uma nova classe de produtos eficazes e inovadores para saúde.

#### 1.8.5 Síntese de AgNPs plasmônicas (nanopratos triangulares e hexagonais)

Aproveitando o poder oxidativo do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), várias fontes de prata, incluindo sais de prata e prata metálica, podem ser diretamente convertidos em nanopratos triangulares ou hexagonais, com a assistência de um agente protetor apropriado, aumentando, assim, significativamente a reprodutibilidade da síntese. Estas formas de AgNPs, são nanopartículas plasmônicas que atraíram grande atenção, devido à sua forte ótica ser dependente da morfologia e tamanho das AgNPs, e que podem emitir colorações diferentes, de acordo com o tamanho dos nanopratos triangulares ou hexagonais formados (ZHANG *et al.*, 2011a).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) são frequentemente utilizadas como biossensores em marcadores biológicos e, também, em kits de diagnósticos. As AgNPs, além do formato mais conhecido, na sua forma quase-esférica, dependendo do processo utilizado podem ser convertidas em nanopratos triangulares ou hexagonais. Estes nanopratos possuem capacidade de absorver e dispersar fortemente a luz, em comprimentos de onda específicos, produzindo ondas densas de elétrons, que são chamadas de plásmons (ver apêndice A). Os nanopratos de prata podem possuir um amplo leque de colorações, conforme Figura 13 e podem ser utilizados como biossensores em substituição às AuNPs ou em novas pesquisas de *kits* de diagnóstico. Na síntese são empregados agentes oxidantes, redutores fortes, e estabilizantes, como o citrato tri-sódico, borax, polietilenoglicol (PEG) e produz nanoplaquetas de excelente uniformidade e estabilidade (YEN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2011a).

Figura 13 - Fotos de AgNPs plasmônicas com formato de nanopratos triangulares e hexagonais

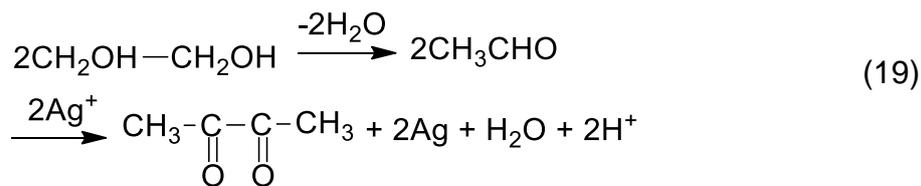


Legenda: Da esquerda para direita, apresenta as seguintes colorações: laranja, verde, marrom, violeta e azul. Créditos da imagem: Luiz Felipe de Melo Azevedo, 2021 - (DEQUA/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ). Fonte: (O autor, 2021).

#### 1.8.6 Síntese com polióis e PVP

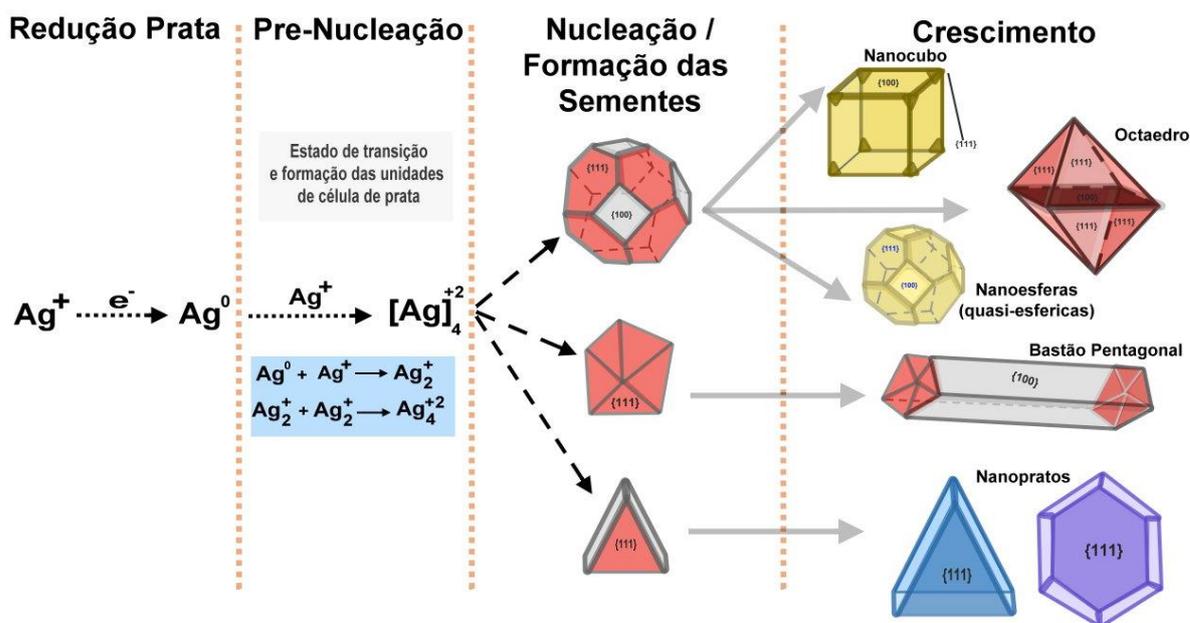
A versatilidade que o PVP proporciona para obter AgNPs, com diferentes morfologias, torna este método relevante para ser analisado.

A síntese de polioliol foi apresentada por Fievet e colaboradores (1989) como uma rota versátil para a síntese de várias nanopartículas metálicas e bimetálicas tais como: Ag, Au, Cu, Co, Ni, Pd, Pt, CoNi, FeNi etc. com a possibilidade de obter diferentes formas e tamanhos (FIEVET; LAGIER, 1989; WILEY *et al.*, 2005). Neste processo, uma substância inorgânica sólida adequada é suspensa em um polioliol líquido e a suspensão é agitada e aquecida a uma determinada temperatura, que pode se aproximar do ponto de ebulição do polioliol (FIEVET; LAGIER, 1989). A versatilidade que os polióis oferecem para a obtenção de AgNPs de diferentes formas e tamanhos torna este método interessante para o estudo de outras formas de AgNPs, além da esférica, que é a mais comum (WILEY *et al.*, 2005). Normalmente, a reação de redução do íon metálico pode ser explicada por uma oxidação dupla do acetaldeído, produzido pela desidratação do etilenoglicol (EG), conforme descrito na reação apresentada na equação 19 (KEYER; IMLAY, 1996):



Em resumo, a síntese de poliol envolve a redução de um sal metálico na presença de um solvente de alto ponto de ebulição a temperaturas elevadas (> 160°C). Além disso, para proteger as partículas nucleadas e evitar a aglomeração, o adjuvante mais comumente usado é o PVP (WILEY *et al.*, 2005). Uma das vantagens desse método é que o EG, além de servir como solvente, é também redutor. Ademais, como a reação depende da temperatura, ela permite fácil controle dos processos de nucleação e crescimento, conforme mostrado na Figura 14 (PACIONI *et al.*, 2015).

Figura 14 - Etapas do processo de formação das nanopartículas de prata (AgNPs)

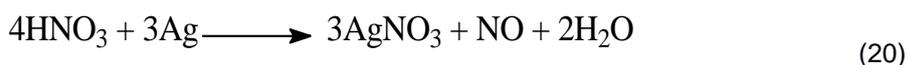


Legenda: A imagem mostra as etapas envolvidas com a formação de nanopartículas de prata com formatos de nanocubo, octaedro, nanoesferas, bastão e nanoplacas de acordo com o processo de nucleação e formação das sementes.

Fonte: (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021).

Ao iniciar a reação em uma solução de EG aquecida a ~ 160 ° C, as sementes de prata monocristalina são formadas por nucleação homogênea. Essas nanopartículas inicialmente formadas são dissolvidas devido à concentração relativamente alta de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), presente no primeiro estágio da reação. Quando a concentração de átomos de prata atinge o valor de supersaturação, eles

começam a nuclear e crescer como nanopartículas. Ao mesmo tempo, o HNO<sub>3</sub> gerado *in situ* ativa uma reação inversa, que dissolve o sólido de prata formado inicialmente. Conforme a reação continua, o HNO<sub>3</sub> é consumido gradualmente e uma segunda rodada de nucleação ocorre, de acordo com a equação 20 (FIEVET; LAGIER, 1989; IM *et al.*, 2005; WILEY *et al.*, 2005). O Quadro 4 mostra as condições experimentais para favorecer a síntese de nanocubos, nanofios ou nanoesferas.



Quadro 4 – Exemplos do método Fievet para obtenção de nanofios, nanocubos e nanoesferas de prata.

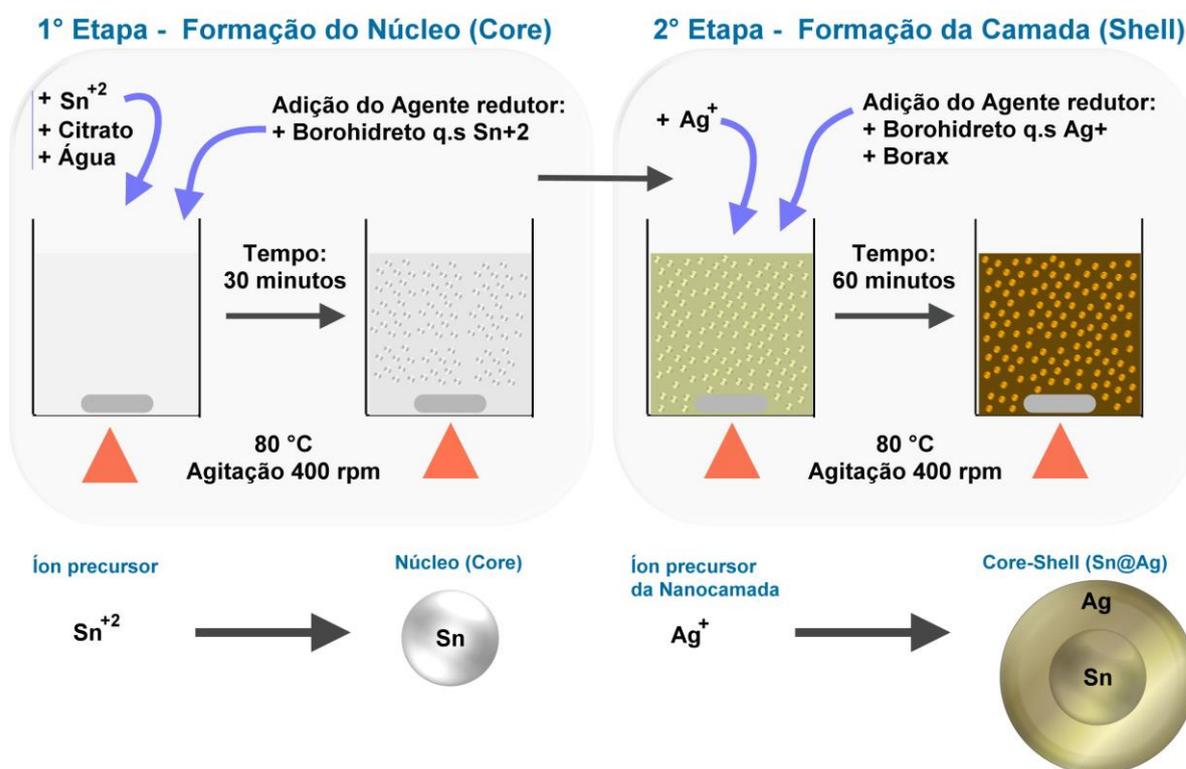
[Ag <sup>+</sup> ]	[Protetor]		[Ag <sup>+</sup> ] :[Protetor]	Polióis / T (°C) / Ácido	Tempo reação	Estrutura da Prata	Referência
94 mM	141 mM	PVP	1:1,5	EG / 140°C / 0,25 mM HNO <sub>3</sub>	15 h	Nanocubos ≈ 30 nm	(IM <i>et al.</i> , 2005)
94 mM	147 mM	PVP	1:1,5	EG / 140°C / 0,025 mM HCl	30 min	Nanofios ≈ 30 nm (d) ≈ 100 nm (c)	(CHANG <i>et al.</i> , 2011)
125 mM	188 mM	PVP	1:1,5	EG / 160°C	30 min	Nanocubos ≈ 80 nm	(WILEY <i>et al.</i> , 2005)
250 mM	375 mM	PVP	1:1,5	EG / 160°C	45 min	Nanocubos ≈ 175 nm	(WILEY <i>et al.</i> , 2005)
0,5 mM	0,0625 mM	PVP	1:0,0625	PEG / 260 °C	24 h	Nanoesferas ≈ 54 nm	(LIANG <i>et al.</i> , 2010)
0,25M	0,027 M	PVP	1: 0,108	EG / 120 °C	30 min	Nanoesferas ≈ 27 nm	(KIM; JEONG; MOON, 2006)

Fonte: (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021).

### 1.8.7 Síntese de nucleação *core-shell* Sn@Ag

O primeiro estágio da formação de nanopartículas bimetálicas é escolher qual será o elemento formador do núcleo. O primeiro elemento a ser reduzido formará o núcleo. Após esta primeira etapa da redução, a segunda etapa consiste em reduzir o elemento da camada externa para o processo de formação da nanocamada de revestimento, conforme Figura 15. Convencionalmente, utiliza-se a nomenclatura Sn@Ag, Sn (*core*) como núcleo e camada externa Ag (*shell*) (ARANISHI *et al.*, 2011).

Figura 15 – Esquema com as etapas simplificadas para preparação de nano *core-shell* Sn@Ag



Legenda: A primeira etapa mostra a formação do núcleo de estanho (*core*) e a segunda etapa a formação da camada de prata (*shell*) envolvendo as nanopartículas de estanho, com formação de nanopartículas bi-metálicas de Sn@Ag.

Fonte: (O autor, 2021).

## 1.9 Caracterização e requisitos para controle da qualidade

A caracterização das AgNPs e avaliação de suas propriedades físicas e químicas são imprescindíveis para o desenvolvimento (síntese) dessas NPs e para o estudo do seu comportamento, biodistribuição, segurança e eficácia. No contexto das

diretrizes regulatórias é importante avaliar os parâmetros de controle necessários para segurança e eficácia do seu uso. A caracterização é realizada usando uma variedade de técnicas analíticas, incluindo PZ, espectroscopia UV-visível, espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), espalhamento de luz dinâmico (DLS), entre outras técnicas (ZHANG *et al.*, 2016). Os princípios básicos das técnicas mencionadas aqui são detalhados nas seções a seguir.

Dependendo de sua rota de preparação, tamanho, forma, faces {111}, estado de agregação, síntese físico-química ou biológica, natureza química do revestimento, carga superficial e conteúdo de Ag<sup>+</sup> livre, cada AgNP é única. O controle de qualidade das AgNPs é imprescindível para garantir sua adequação ao uso pretendido, reprodutibilidade, eficácia e toxicidade (DURÁN *et al.*, 2018; MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021). Outro ponto importante é mostrar a importância para os pesquisadores de utilizar a concentração em número de partículas picomolar (pM / mL) ou nanomolar (nM /mL), ao invés da concentração em massa por volume (mg/L). Os detalhes deste item serão explicados no item 1.9.1.1 (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021).

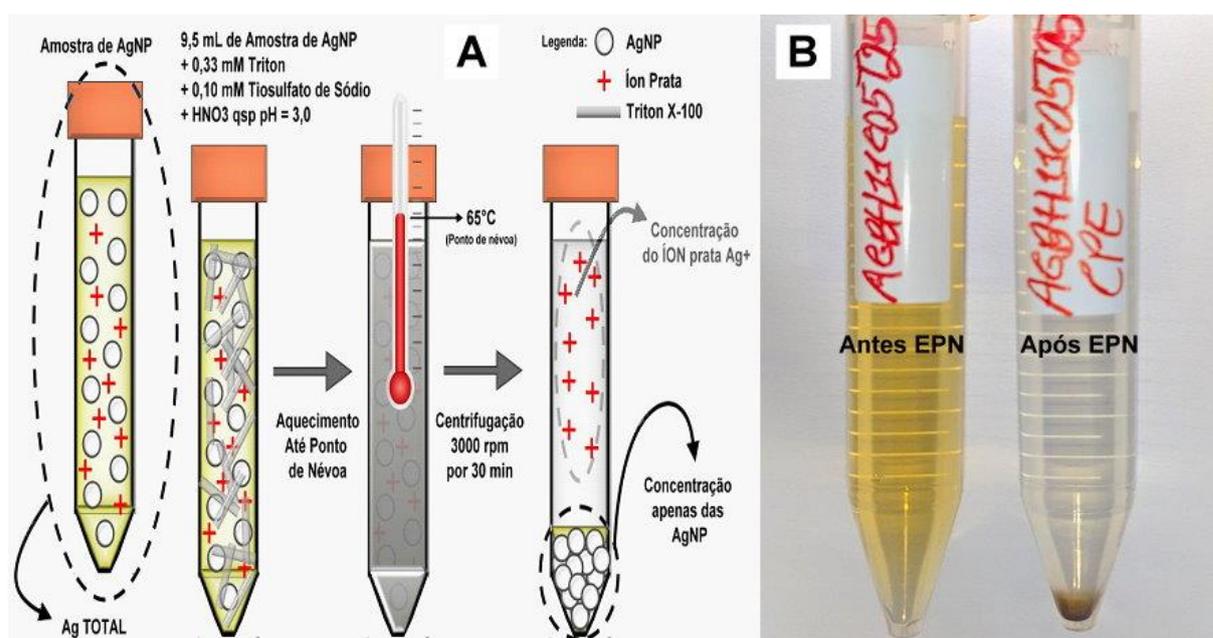
#### 1.9.1 Quantificação por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

A técnica ICP-OES é uma das técnicas mais populares na determinação de íons metálicos e nos permite detectar AgNPs e Ag<sup>+</sup> com alta precisão e sensibilidade. Esta técnica atomiza Ag<sup>+</sup> e AgNPs no plasma e não diferencia prata iônica (Ag<sup>+</sup>) das AgNPs (WEINBERG; GALYEAN; LEOPOLD, 2011). Por outro lado, uma nova técnica de espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (SP-ICP-MS) executada no modo de detecção individual (single particle – SP) oferece a capacidade única de diferenciar e quantificar íons dissolvidos e nanopartículas do metal, além da concentração também permite análise da dimensão e distribuição de tamanho (BAZILIO, 2020; MITRANO *et al.*, 2012). No caso de utilização da técnica de SP-ICP-MS o item 1.9.1.1 não é necessário.

##### 1.9.1.1 Separação por ponto de névoa (EPN)

A técnica de EPN foi iniciada em 1977 por Goto e colaboradores e é baseada na capacidade de solubilização e no ponto de névoa de tensoativos não iônicos (GOTO *et al.*, 1977). No ponto de névoa, a instabilidade observada nas micelas é promovida pela desidratação dos grupos hidrofílicos com a consequente formação de micelas gigantes (gaiolas). Com isto, proporciona-se redução da solubilidade em água, o que define a transição do ponto de névoa; e é exatamente neste ponto que as AgNPs são atraídas para o interior dessas “gaiolas” enquanto o  $\text{Ag}^+$  (mais hidrofílico) continua na solução aquosa, em seguida, durante a centrifugação são separados e as nanopartículas ficam precipitadas e o íon prata fica no sobrenadante, conforme Figura 16 (HINZE; PRAMAURO, 1993).

Figura 16 - Procedimento para separar AgNPs usando a técnica de Extração por Ponto de Névoa (EPN)



Legenda: (A) Apresentação esquemática do processo de separação das espécies AgNPs e  $\text{Ag}^+$ . (B) mostra um lote produzido de nanopartículas de prata (AgNPs) antes e após o EPN.

Fonte: (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021)

Este procedimento segue as etapas a seguir (LIU *et al.*, 2012a, 2009):

1. O surfactante não iônico é adicionado à solução da amostra com concentração final superior à sua concentração micelar crítica (CMC). A CMC é a concentração mínima necessária para iniciar a formação das micelas de um respectivo tensoativo. O Quadro 5 mostra informações técnicas sobre o Triton X-100, que é um tensoativo não iônico frequentemente usado nesta separação;

2. Ajustar o pH com HNO<sub>3</sub> para 3,0 e adicionar tiosulfato de sódio para diminuir o potencial zeta e criar instabilidade eletrostática no meio das AgNPs e facilitar a separação;
3. Aumento da temperatura até o ponto de turvação do tensoativo;
4. Centrifugação da solução micelar, ainda aquecida, com posterior separação em 2 fases. AgNPs são precipitadas no fundo do tubo e o íon de prata está no sobrenadante.

O Quadro 5 apresenta informações e propriedades do Triton X-100 como tensoativo não iônico.

Quadro 5 - Informações e propriedades do Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

Número CAS:	9002-93-1
Nome químico:	t-octilfenoxipolietoxietanol
Peso molecular:	625 g / mol
CMC:	0,2 - 0,9 mM (20-25 ° C)
Ponto de névoa:	65 ° C

CMC – Concentração Micelar Crítica, é a faixa de concentração onde a formação de micelas é iniciada  
Fonte: (O autor, 2021).

#### 1.9.1.2 *Quantificação das espécies AgNPs, Ag<sup>+</sup> e Ag Total*

Após a centrifugação do estágio EPN, as AgNPs decantaram no fundo, pois o Ag<sup>+</sup> está no sobrenadante, conforme mostrado na Figura 16. Assim, ao analisar este sobrenadante no ICP-OES, temos apenas o teor de Ag<sup>+</sup>, que é fundamental parâmetro de controle (HINZE; PRAMAURO, 1993). A concentração total de prata é obtida quando se analisa por ICP-OES a solução coloidal das AgNPs, anteriormente a EPN. A concentração de AgNPs é dada pela equação abaixo:

$$[\text{Concentração AgNPs}] = [\text{Concentração total de prata}] - [\text{concentração Ag}^+]$$

O conteúdo de AgNPs encontrado em massa mg / L deve ser convertido em número de partículas / mL e está relacionado à sua forma e tamanho. Para esclarecer, vamos considerar o exemplo abaixo. Existe uma solução de AgNPs com partículas esféricas com tamanho médio de 20 nm. No ICP-OES de AgNPs, o conteúdo encontrado foi de 30 mg / L (concentração de massa). O resultado encontrado foi 6,83

$\times 10^{11}$  partículas / mL ou 1,13 pM / mL. O cálculo para este exemplo é descrito em APENDICE B - Cálculo de partículas / mL para AgNPs de formato esférico.

### 1.9.1.3 *Validação da metodologia*

A validação analítica de uma metodologia são ensaios experimentais para confirmar e fornecer evidências que o método é confiável para o uso pretendido (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

#### 1.9.1.3.1 Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (ANVISA, 2017). Pode ser avaliada através do exame de um gráfico de resíduos produzidos por regressão linear (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002)

##### 1.9.1.3.1.1 Estimativa dos parâmetros de regressão

Os cálculos para estimativa dos parâmetros da regressão podem ser calculados conforme equações da Tabela 2.

Tabela 2 – Equações utilizadas na estimativa dos parâmetros da regressão

Fórmula	Descrição	Equação
$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$	É o coeficiente angular, e representa o quanto a média varia de Y para um aumento de uma unidade da variável X.	(21)
$a = \bar{y} - b\bar{x}$	É o ponto onde a reta corta o eixo Y.	(22)
$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	Equações resultantes de derivadas através do erro estimado pelo método dos mínimos quadrados.	(23)
$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$		(24)
$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$		(25)
$\bar{y} = a + b\bar{x}$	Equação (reta) da regressão	(26)
$e_i = y_i - (a + bx_i)$	A diferença entre os valores observados e os preditos é o resíduo referente a cada valor $x_i$ .	(27)
$R^2 = \frac{\sum(\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$	Coeficiente de determinação. Variação explicada pelo modelo dividido pela variação total.	(28)
$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx}S_{yy}}}$	Coeficiente de correlação simples.	(29)

Fonte: (O autor, 2021).

#### 1.9.1.3.1.2 Teste de normalidade

O método de verificação da normalidade Ryan-Joiner (RYAN; JOINER; JNR., 1985) para verificação da normalidade e indica se o conjunto de dados analíticos seguem uma distribuição normal, calculando a correlação entre seus resíduos da regressão (BAZILIO *et al.*, 2012).

O coeficiente de correlação  $R_{eq}$  deve ser comparado com o valor Tabelado de  $R_{crit}$  para um nível de significância de 0,05. Para  $R_{eq} > R_{crit}$  a distribuição é normal e para  $R_{eq} < R_{crit}$  a distribuição não é normal.

#### 1.9.1.3.1.3 Teste de homoscedasticidade

A homoscedasticidade significa “mesma variância” e é um parâmetro fundamental para avaliação da regressão linear. A homogeneidade das variâncias é uma das premissas essenciais e um teste preliminar para realizar a análise de

variância (ANOVA) para testar as médias de várias populações. O erro é o mesmo em todos os valores das variáveis independentes (ESMAILZADEH, 2019).

#### 1.9.1.3.1.4 Teste de autocorrelação dos resíduos (independência)

O teste de Durbin-Watson testa a autocorrelação dos resíduos obtidos de um modelo de regressão linear (DURBIN; WATSON, 1950). A estatística é aplicada aos resíduos de regressões de mínimos quadrados conforme equação 30 (BAZILIO *et al.*, 2012).

$$d = \frac{\sum_{i=1}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (30)$$

São calculados dois limites críticos  $d_L$  (limite inferior) e  $d_u$  (limite superior) para um nível de significância de 0,05. Se o valor de  $d > d_L$  e  $d < d_u$ , o teste é inconclusivo. Para  $d < d_L$ , indicam autocorrelação e para  $d > d_u$  indicam independência dos resíduos (BAZILIO *et al.*, 2012).

#### 1.9.1.3.1.5 Teste de significância da regressão

A análise de variância (ANOVA) usa o teste F para avaliar estatisticamente a igualdade das médias de três ou mais grupos. Uma estatística F é a proporção de duas variâncias que é avaliada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) (FROST, 2019). O valor da significância p observado para a regressão deve ser menor que 0,001 enquanto o valor da significância p-valor para o desvio da linearidade deverá ser maior que 0,05.

#### 1.9.1.3.2 Tendência

A tendência pode ser expressa como recuperação do analito e pode ser estimada pela divisão entre o valor observado e o valor esperado da amostra fortificada (INMETRO, 2020).

### 1.9.1.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Para cálculo do limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) utiliza-se a regressão dos mínimos quadrados ponderados. O LD é calculado conforme equação 31 (ZORN; GIBBONS; SONZOGNI, 1997) e 32 (BAZILIO *et al.*, 2012), onde  $a$  é o coeficiente angular e  $b$  é o coeficiente linear.

$$LD = \frac{Y_C - b}{a} \quad (31)$$

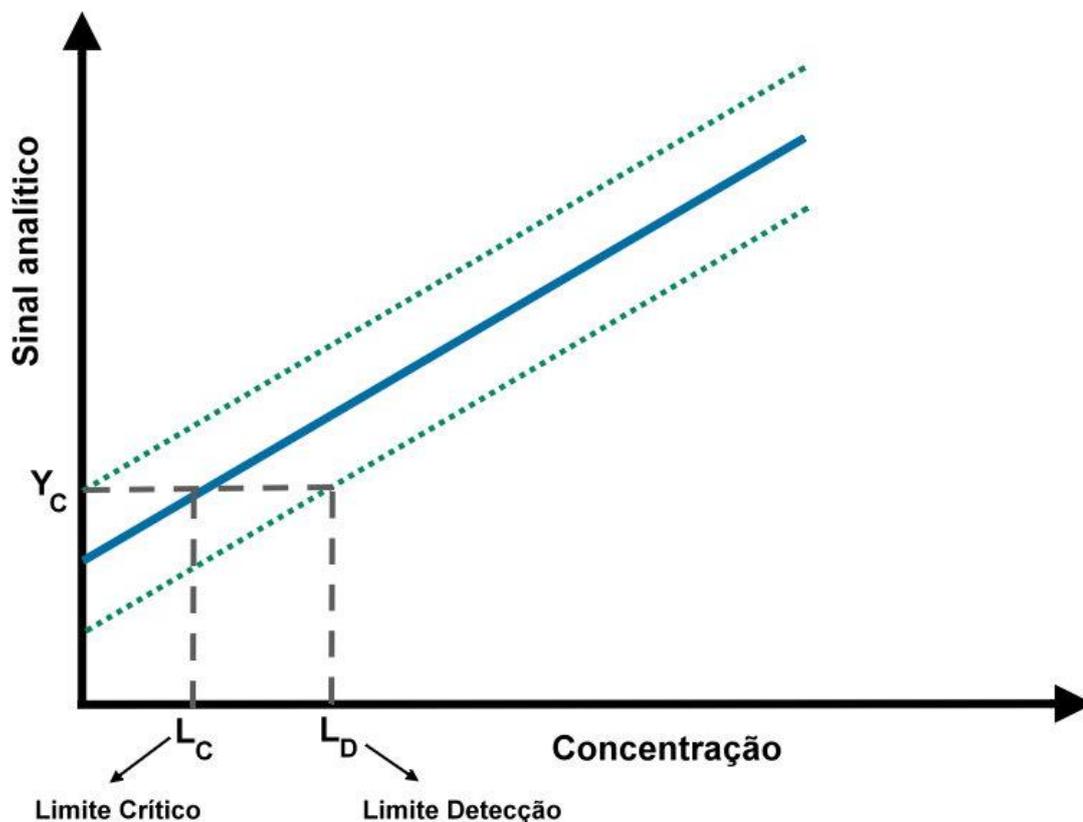
$$Y_C = b + t_{(0,05;n-2)} \times S_{yx} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (32)$$

E o limite de quantificação conforme equação 33 (BAZILIO *et al.*, 2012).

$$LQ = \frac{(2 \times LD \times a + b) + t_{(0,05;n-2)} \times S_{yx} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(2 \times LD - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} - b}{a} \quad (33)$$

O método utiliza a curva analítica e o seu intervalo de confiança conforme Figura 17.

Figura 17 – Gráfico ilustra a linha de tendência com intervalo de confiança



Onde: a resposta ( $Y_c$ ) para um limite crítico ( $L_c$ ) com a representação gráfica do limite de detecção ( $L_D$ ).

Fonte: (O autor, 2021).

#### 1.9.1.3.4 Repetibilidade

A repetibilidade do método poder ser avaliada utilizando-se o desvio padrão relativo ( $DPR_r$ ) que é igual à média das medições dividida pelo desvio padrão das medidas e multiplicado por 100. O critério de aceitação é baseado no desvio padrão relativo previsto ( $DPRPr$ ). O valor de  $DPRPr$  é igual a metade do valor do desvio padrão relativo previsto de reprodutibilidade ( $DPRPr_R$ ), que para concentrações até 1 ppm (mg / kg) ou fração de massa de  $1,0 \times 10^{-6}$  (C),  $CV\% = 2C^{-0,1505}$  que é 16%. O método é considerado repetitivo com o valor de  $HorRat_r$  (equação 34) menor ou igual a 2. (HORWITZ; ALBERT, 2006).

$$HorRat_r = \frac{DPR_r}{DPRP_r} \quad (34)$$

#### 1.9.1.3.5 Seletividade

A seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Dessa forma, um método que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2020).

#### 1.9.2 Espectroscopia de absorção UV-VIS

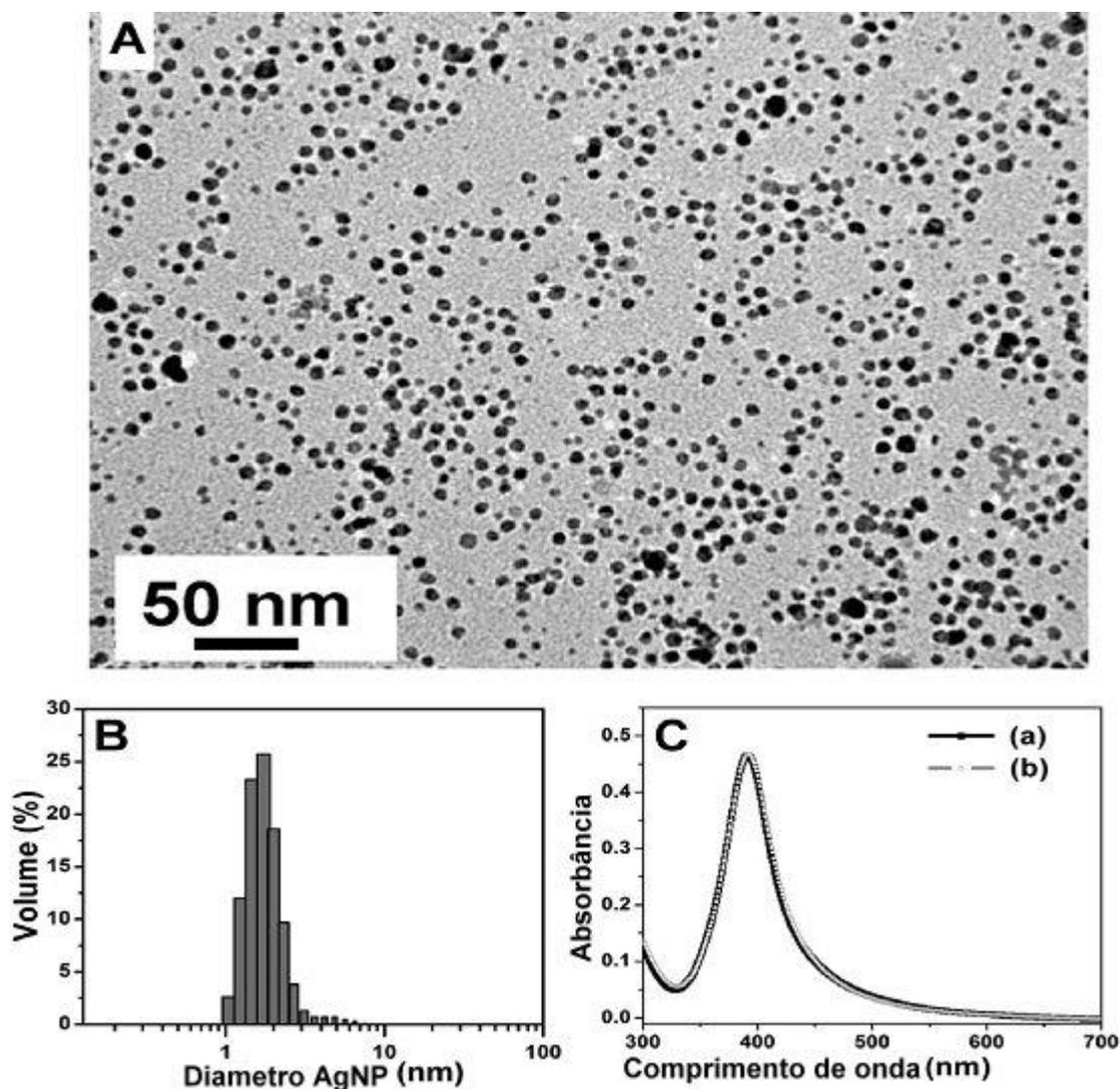
Nanopartículas metálicas são conhecidas por emitirem cores características na região visível do espectro eletromagnético, devido a um fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície. A cor da solução de nanopartículas coloidais depende principalmente de seu tamanho e forma (WILEY *et al.*, 2006). As propriedades ópticas das AgNPs tendem a mudar quando as partículas se agregam. Conseqüentemente, os elétrons condutores próximos à superfície de cada partícula, são realocados causando uma mudança na ressonância do plasmon de superfície, que pode ser observada a partir do espectro de absorção. Também é concebível avaliar uma possível dissolução das AgNPs, devido ao fato do íon prata não absorver na região visível. (LIU; HURT, 2010; WILEY *et al.*, 2006)

Gustav Mie foi o primeiro a explicar rigorosamente as cores exibidas pelos colóides metálicos com as equações de Maxwell. É possível calcular o dipolo polarizado pela luz incidente e todos os outros dipolos da matriz das nanopartículas, além de prever o comportamento de seus respectivos espectros.

A espectroscopia UV-vis é um método simples e seguro para monitorar a estabilidade físico-química das AgNPs. Quando as partículas se agregam, se dissociam ou mudam de forma, o pico de absorção original muda de intensidade, indicando claramente uma mudança na nanopartícula (RIHN, 2018). Liu e Hurt (2010) avaliaram a estabilidade das AgNPs recém preparadas e após armazenamento a 4°C, conforme representado na Figura 18, em que o espectro de absorção de UV-Vis da amostra preparada era quase comparável ao espectro obtido na amostra de AgNPs de 5 meses armazenada a 4 °C, levando a uma sobreposição, o pico de absorbância

a 390 nm manteve-se inalterado, indicando estabilidade de tamanho e forma (LIU; HURT, 2010).

Figura 18 - Investigação experimental sobre a estabilidade de AgNPs



Legenda: (A) micrografia TEM, (B) distribuição de tamanho por espalhamento de luz dinâmico, (C) espectros de absorção de UV-vis de soluções de AgNPs (a) recentemente sintetizado; (b) armazenado a 4 °C por 5 meses. O pico de absorbância a 390 nm manteve-se inalterado, indicando estabilidade de tamanho e forma.

Fonte: Reimpresso com permissão de (LIU; HURT, 2010).

### 1.9.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Historicamente, as primeiras abordagens para descrever as interações entre luz e nanopartículas foram publicadas no início do século XX. Atualmente, a teoria mais popular é a de Gustav Mie, publicada em 1908 que, em suma, descreve a intensidade da luz espalhada de uma radiação laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) incidente, que

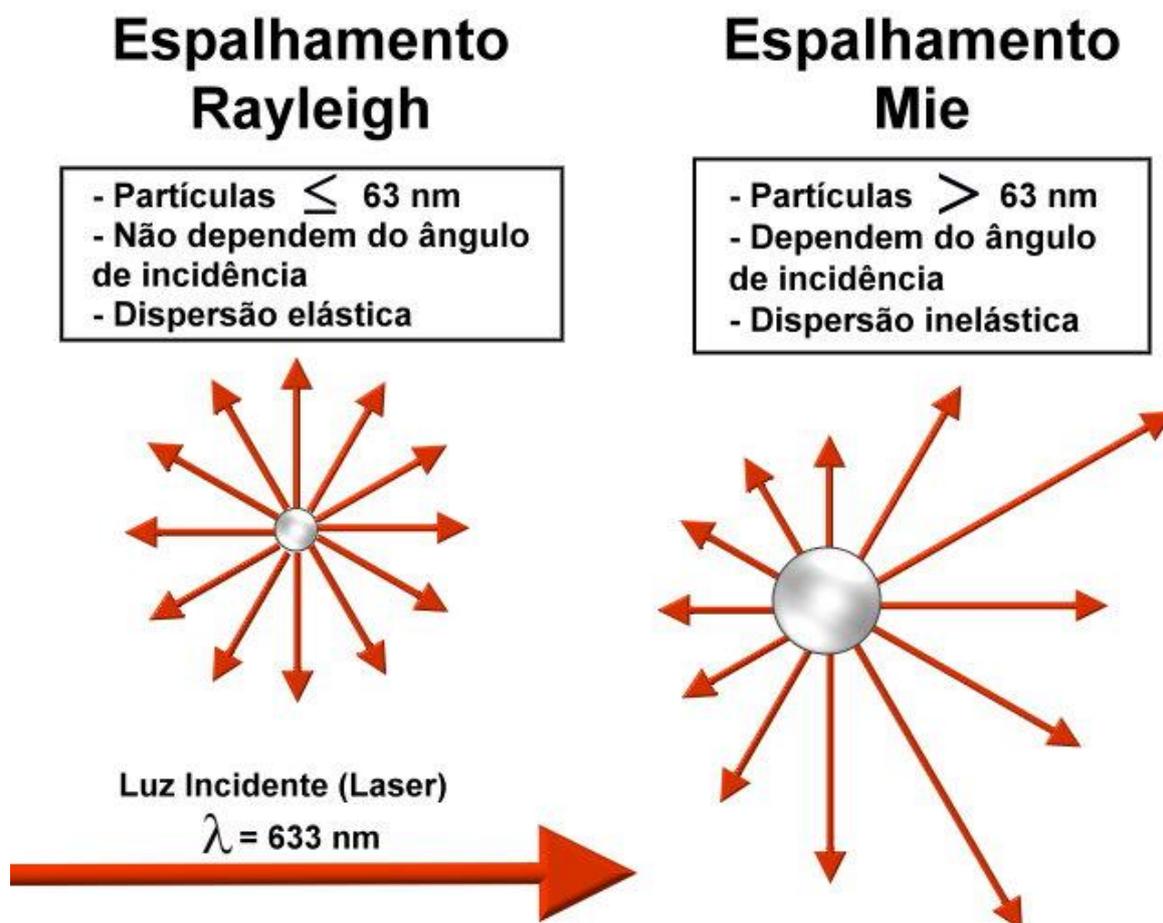
depende do tamanho das partículas. As teorias de espalhamento de luz são facilmente aplicáveis a partículas esféricas e não aglomeradas; para outros tipos de estruturas mais complexas, novos modelos foram desenvolvidos (MIE, 1908; MOORES; GOETTMANN, 2006). Quando as partículas têm 1/10 do comprimento de onda da luz incidente, ou seja, 633 nm (comprimento de onda do laser), partículas menores que 63 nm de tamanho, a luz espalhada por elas carrega a mesma energia (dispersão elástica) que a luz incidente e não depende do ângulo (espalhamento de Rayleigh). No entanto, quando o tamanho da partícula é maior que 63 nm, a dispersão de Rayleigh é substituída pela dispersão anisotrópica de Mie, na qual a luz espalhada é desigual na energia da luz incidente (dispersão inelástica) e dependente do ângulo de incidência conforme Figura 19 (BHATTACHARJEE, 2016; FAN; ZHENG; SINGH, 2014).

A técnica DLS baseia-se no movimento browniano e no espalhamento de luz das partículas e moléculas, em suspensão, que estão em constante movimento. A velocidade desse movimento browniano é medida e fornece o coeficiente de difusão translacional (D) (curva de correlação da intensidade) que é convertido em diâmetro hidrodinâmico ( $D_H$ ), usando a equação de Stokes-Einstein conforme equação 35 (KASZUBA *et al.*, 2008).

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (35)$$

Onde  $k$  é a constante de Boltzmann's,  $T$  é a temperatura e  $\eta$  é a viscosidade do dispersante.

Figura 19 - Diferenças entre o espalhamento de luz Rayleigh e Mie.



Fonte: (O autor, 2021).

A técnica DLS fornece informações importantes para a avaliação de soluções mono e polidispersas, sendo o índice de polidispersão (PDI), que é basicamente uma representação da distribuição das populações de tamanho em uma dada amostra. O valor numérico do PDI varia de 0,0 (para uma amostra perfeitamente uniforme em relação à partícula / tamanho) a 1,0 (para uma amostra altamente polidispersa com várias populações de tamanhos de partícula). Valores menores ou iguais a 0,3 são considerados aceitáveis e indicam uma população homogênea; valores maiores que 0,3 a 0,6 indicam uma população com polidispersidade média; e acima de 0,7, população muito polidispersa. (DANAEI *et al.*, 2018)

#### 1.9.4 Potencial Zeta (PZ)

O potencial zeta é medido através da aplicação de um campo elétrico na dispersão (DELGADO; GONZÁLEZ-CABALLERO; SALCED, 1986). Uma voltagem é

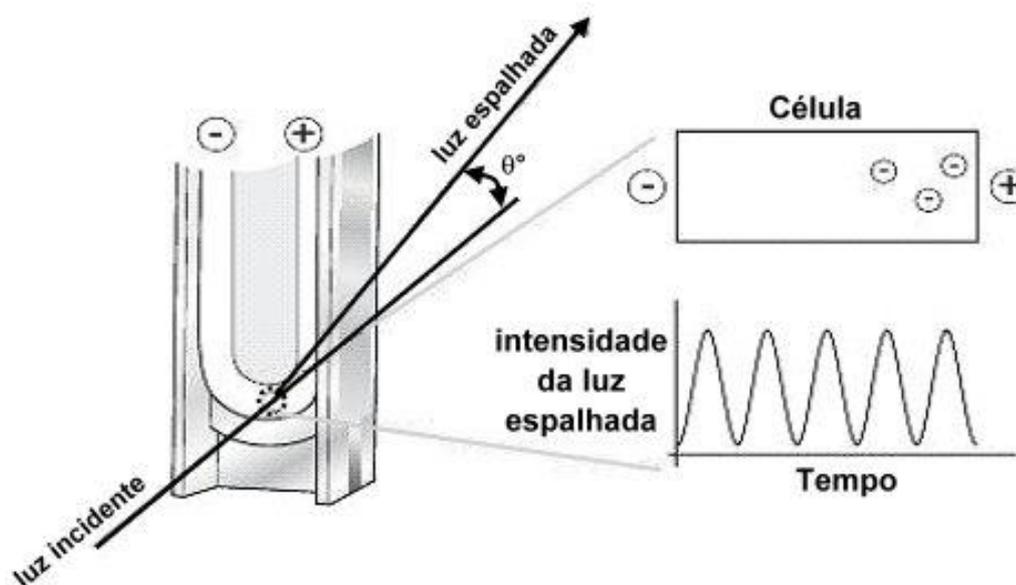
aplicada em um par de eletrodos, um em cada extremidade de uma célula, que contém a dispersão de partículas. Estas partículas carregadas são atraídas para o eletrodo com carga oposta e suas velocidades são medidas por pequenos desvios de frequência na luz espalhada, que surgem devido ao movimento de partículas (efeito doppler) em um campo elétrico aplicado (KASZUBA *et al.*, 2010). O cálculo da mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ) está apresentado na equação 36 que é convertida em PZ ( $\zeta$ ) pela equação de Henry (1931) (apud DELGADO; GONZÁLEZ-CABALLERO; SALCED, 1986).

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta F(ka)}{3\eta} \quad (36)$$

Onde  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do meio dispersante,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $F(ka)$  é a função de Henry.

A Figura 20 mostra como acontece o espalhamento da luz incidente quando as partículas carregadas são atraídas para os eletrodos.

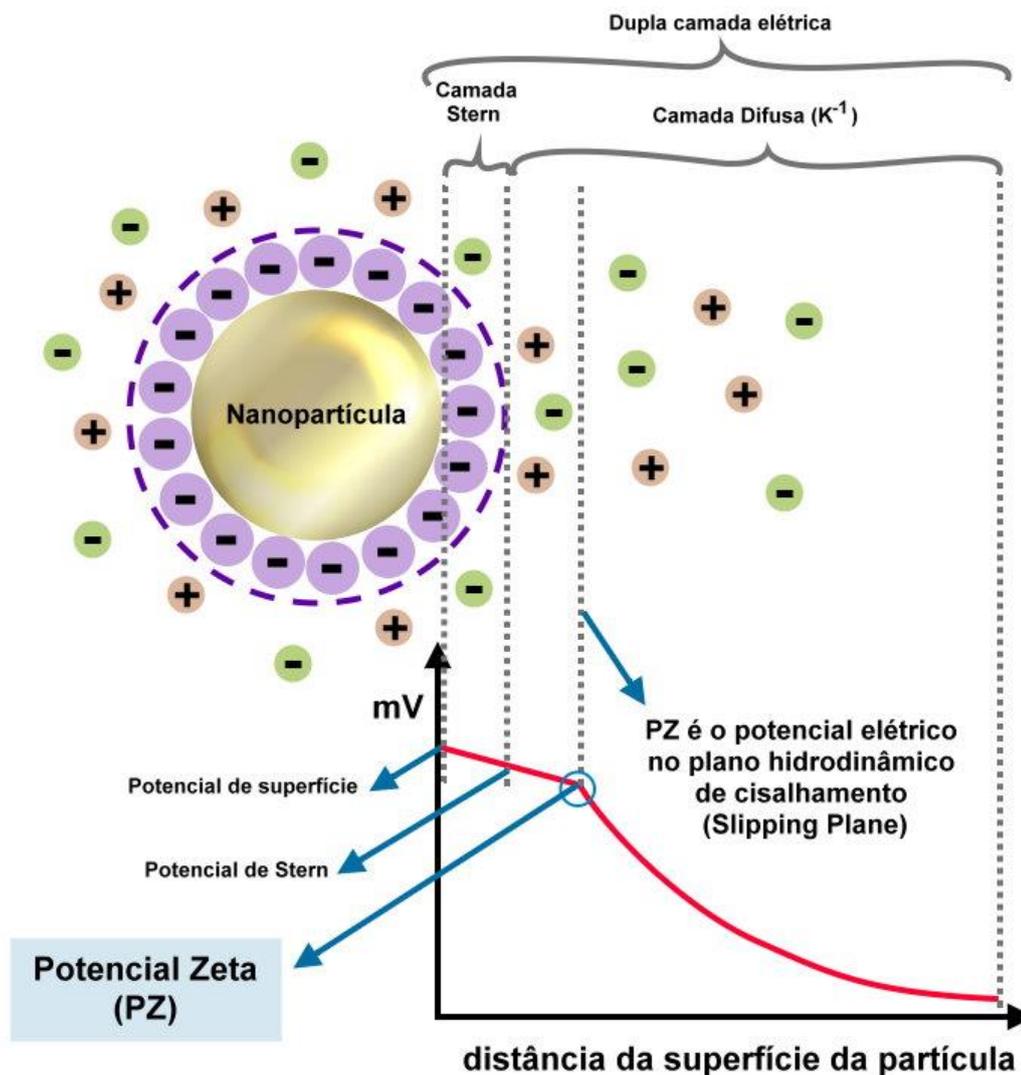
Figura 20 - Um feixe de laser passa através da amostra na célula capilar de PZ



Legenda: A frequência é diretamente proporcional a mobilidade eletroforética das partículas e ao PZ.  
Fonte: (INDIANA UNIVERSITY, 2016).

O PZ ou potencial eletrocinético é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, conforme Figura 21 (WEINER; TSCHARNUTER; FAIRHURST, 1993), e reflete a carga superficial da nanopartícula.

Figura 21 - Representação de uma nanopartícula carregada eletricamente



Legenda: A imagem mostra as respectivas camadas de superfície: stern, difusa e dupla camada elétrica. E o potencial de superfície, Stern e Zeta.  
Fonte: (O autor, 2021).

#### 1.9.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

O microscópio eletrônico de transmissão é baseado na condução de um feixe de elétrons em um conjunto de lentes eletromagnéticas. Os elétrons permeiam na amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas pela difração e arranjo cristalino dos átomos na amostra. Para

nanopartículas metálicas, cerâmicas ou poliméricas utiliza-se uma tensão de aceleração de até 200 kV (PADILHA, 2001). Um feixe de elétrons focado é varrido sobre a superfície da amostra que, ao colidirem sobre o material, sofrem processos de espalhamento elástico, que resultam em uma perda de energia, bem como uma deflexão angular dos elétrons. A imagem observada é a projeção de um determinado tamanho do material, podendo ocorrer superposição na projeção da imagem (BUHR *et al.*, 2009).

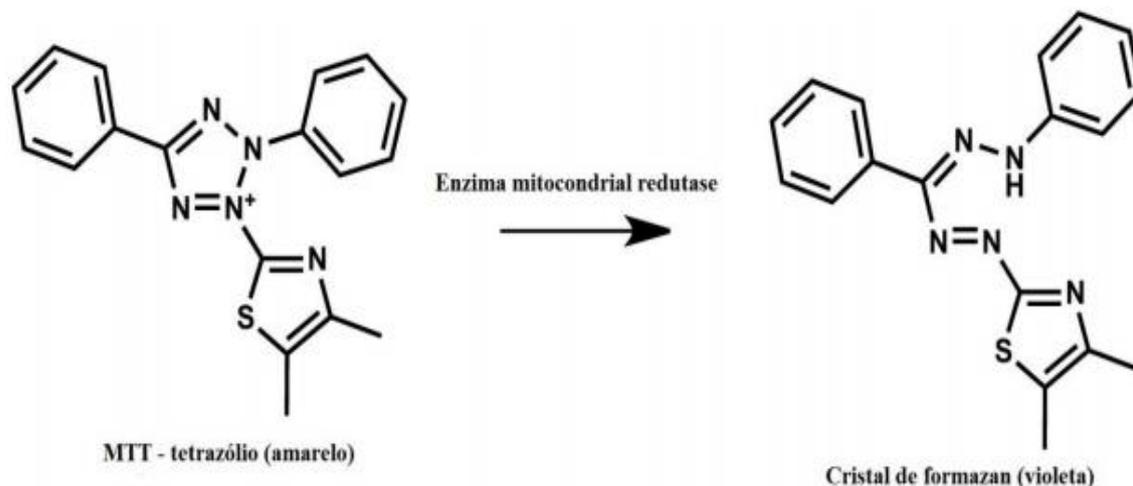
De forma complementar, o tamanho, distribuição, heterogeneidade de formas, morfologia, dispersão e agregação podem ser avaliados diretamente através do TEM. A alta resolução espacial facilita a investigação da estrutura eletrônica e o estudo da composição química (LIN *et al.*, 2014). No entanto, as desvantagens, além do caro custo do instrumento, incluem a exigência de alta tensão, alto vácuo e preparação adequada da amostra, que é extremamente importante para obter imagens de alta qualidade (LIN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016).

### **1.10 Citotoxicidade das AgNPs**

Para avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade, utiliza-se o ensaio de viabilidade celular por [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo] (MTT) e parte do princípio da reação de enzimas desidrogenases mitocondriais de células viáveis com o MTT onde a viabilidade é quantificada pela redução do MTT (tetrazólio) a formazan (COLLIER; PRITSOS, 2003).

O ensaio MTT envolve a conversão do corante amarelo solúvel em água, MTT, em um formazan, roxo insolúvel, pela ação da redutase mitocondrial, conforme Figura 22. O Formazan após solubilizado pode ser detectado colorimetricamente por densidade ótica (DO) entre 540 a 595 nm (COLLIER; PRITSOS, 2003; KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018).

Figura 22 - Reação do MTT com a enzima mitocondrial redutase



Fonte: (O autor, 2021).

A atividade metabólica em células eucarióticas pode ser determinada em células de mamífero e fúngicas pelo ensaio de redução de MTT. Para cada tipo de célula a ser usado, um meio adequado deve ser escolhido, além do branco, controle de viabilidade celular (número de células vivas) e controle para visualização de morte celular. Uma vez padronizado para cada tipo celular, o método é muito robusto (KUPCSIK, 2011).

### 1.11 Controle Sanitário

As AgNPs possuem diversas variáveis de controle e caracterização e é neste ponto que gira o principal enfoque deste trabalho. Desde 2006, a *Food and Drug Administration* (FDA) criou uma força tarefa em nanotecnologia (FDA, 2007, 2014), com a qual criou procedimento para determinar as abordagens regulatórias, que permitiriam o desenvolvimento contínuo de produtos inovadores, seguros e eficazes, de materiais em nanoescala. Além desta, outras agências mundiais de controle de saúde pública iniciaram, também, o controle aos nanomateriais onde citamos: *Health Canada*, *National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme* (NICNAS, 2018b).

Inúmeros sites nacionais e internacionais (Amazon.com, Ebay.com) comercializam as AgNPs, também conhecida como prata coloidal, sem nenhum tipo de controle e garantia. O consumidor não possui nenhum tipo de proteção para saber se aquele produto se trata de uma prata coloidal verdadeira ou se é apenas água, ou

ainda, se ao invés de AgNPs ele estaria ingerindo íons de prata, nitrato de prata, o que poderia ocasionar danos irreversíveis à sua saúde, como já mencionado.

Em 2014, o Comitê Interno de Nanotecnologia da Anvisa foi instituído em 21/08/2014 pela Portaria 1.358/14. Entre as atribuições do Comitê está a elaboração de normas ou guias específicos para a avaliação e controle de produtos que utilizam nanotecnologia. A portaria que instituiu o Comitê também prevê a criação de um banco de dados sobre nanopartículas ou nanomateriais relacionados à saúde, a elaboração de um plano de capacitação, entre outras atribuições e conta com a participação de 12 áreas técnicas. Até a presente data nenhuma portaria ou norma foi produzida a este respeito.

#### 1.11.1 Justificativa

Até o momento a comercialização das AgNPs, em solução coloidal, não tem registro e aval de órgãos governamentais brasileiros de saúde para seu uso como medicamento. Por ser um produto de interesse para o consumidor e não existir nanopartículas de prata devidamente registradas no mercado e nem regulamentação, muitos consumidores recorrem a obtenção de produtos fabricados de forma artesanal e sem controle sanitário, gerando um risco de consumo de produtos que não tem a sua segurança de utilização garantida. Portanto, a padronização de síntese de solução de AgNPs e seu controle sanitário garantirá uma segurança para o consumidor e gerará conhecimento em uma área de crescente interesse, tanto para a sociedade, pesquisadores e, também, para a indústria farmacêutica e SUS.

Existem vários métodos de produção das AgNPs e, dependendo da síntese química, obtém-se AgNPs de diversos tamanhos, formas e teores diferentes  $Ag^+$ . Sabe-se que o tamanho da partícula, sua forma e o teor livre de  $Ag^+$  podem influenciar diretamente na sua atividade microbiológica e, também, influenciar na toxicidade das AgNPs.

As propriedades físico-químicas das nanopartículas são importantes para saber o comportamento, a biodistribuição, a segurança e a eficácia. Portanto, tanto a síntese como a caracterização das AgNPs precisam ser bem estabelecidas e padronizadas, para se obter protocolos seguros de síntese, bem como de controle sanitário.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Sintetizar, caracterizar as AgNPs, e estabelecer parâmetros de controle sanitário.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1 - Produção padronizada e detalhada para obtenção de nanopartículas de prata com dimensões média de 10 nm, para uso seguro na área biológica e em estudos clínicos, por um método de fácil acesso aos pesquisadores, com facilidade de síntese e reprodutível.
- 2 - Elaborar um procedimento operacional padronizado (POP) de produção das AgNPs (prata coloidal) de formato esféricos, tamanho médio de 10 nm e teor de íon prata livre ( $\text{Ag}^+$ )  $< 200 \mu\text{gL}^{-1}$ .
- 3 - Definir parâmetros para controle da qualidade para a formulação.
- 4 - Desenvolver e validar método de quantificação de AgNPs e  $\text{Ag}^+$  por ICP-OES.
- 5 - Analisar a influência de algumas matérias-primas, que fazem parte da matriz das soluções de AgNPs, nas análises de DLS.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Síntese das nanopartículas de prata (AgNPs)

Este trabalho avaliou diversos processos de síntese das AgNPs com o objetivo final de obter nanopartículas estáveis, de tamanho reduzido (< 10 nm), com tamanho uniforme (baixa polidispersibilidade), baixo teor de íon prata (Ag<sup>+</sup>) livre e, sobretudo, que fosse um processo acessível e de fácil reprodutibilidade de síntese.

Foram utilizados, principalmente, o método eletroquímico, redução pelo BH4 com borax, redução por matéria orgânica natural, síntese de partículas bi-metálicas (nanocamadas), síntese de nanopartículas plasmônicas e redução pelo íon citrato.

##### 3.1.1 Síntese eletroquímica

As formulações preliminares apresentadas em seminários 2, foram fundamentais para o planejamento experimental das próximas produções e estratégias para obtenção de síntese padrão ouro, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 – Observações encontradas em nosso estudo preliminar de síntese das AgNPs (continua)

<b>Influências</b>	<b>Observações encontradas</b>	<b>Estratégias</b>
<b>Agitação do sistema</b>	A falta de agitação constante e adequada, aumenta o índice de Polidispersibilidade (PDI).	Adicionar uma velocidade de agitação constante e padroniza-la.
<b>Teor de Carboxi Metil Celulose (CMC-r)</b>	Aumenta o PZ Aumenta a estabilidade de sedimentação, porém pode aumentar o PDI.	0,15% de CMC-r produz excelente estabilidade de sedimentação. Na temperatura de 5°C apresenta viscosidade média de 7 cP.

Tabela 3 - Observações encontradas em nosso estudo preliminar de síntese das AgNPs (conclusão)

<b>Teor de citrato</b>	<b>Auxilia na estabilidade e na redução do PDI</b>	<b>Relação de 1 mol de prata para 1 mol de citrato. Em maior quantidade tende a formação das AgNPs com formato de nanopratos.</b>
<b>PEG</b>	Aumenta a estabilidade das AgNPs. Assim como o PVP. Observou-se um aumento do PDI	Verificar se o aumento do PDI está relacionado com o PEG
<b>Nitrato de potássio</b>	Elemento importante para proporcionar a força iônica mínima necessária para início da eletrólise (ponte salina)	Concentrações baixas de $\text{KNO}_3$ se mostram necessárias para iniciar o processo eletroquímico.
<b>PVP</b>	Aumenta a estabilidade das AgNPs. Observou-se uma diminuição no PDI	0 rpm 70 °C 15 min
<b>pH</b>	Amostras com pH > 8,0 com a mesma constituição apresentaram maior PZ.	pH nas amostras deve ser entre 8,5 e 9,5.
<b>Condutividade</b>	Menor a condutividade do sistema, menor a espessura da camada difusa e menor a dispersão.	Teor de aditivos inorgânicos, não deve ser alto. 0,15% CMC aumenta pouco a condutividade final da solução.

Fonte: (O autor, 2021).

### 3.1.1.1 Cálculo do diâmetro mínimo dos eletrodos

O processo eletroquímico envolve diretamente a passagem de corrente por eletrodos, que são a principal matéria-prima deste processo.

Para definição dos tamanhos dos eletrodos definimos que 20 cm de comprimento seria um tamanho suficiente para realizar a síntese, em béquer de 250 a 2 L de volume, podendo ter uma área imersa de até 15 cm. No entanto, para encontrarmos o diâmetro mínimo aceitável que possibilitará a condução da carga elétrica necessária para eletrólise, precisamos recorrer a primeira e a segunda leis de Ohm, para cálculo da corrente formada no eletrodo e limite de potência conforme Tabela 3 e de acordo com as equações 37 e 38 e dados abaixo:

Dados:

Resistividade da prata:  $\rho = 1,59 \times 10^{-8} \Omega \cdot m$  (HAYNES, 2017)

Comprimento dos eletrodos: 0,20 m

$$V = R \times I \text{ (1º Lei de Ohm)} \quad (37)$$

Onde V é a voltagem em Volts, R é a resistência em  $\Omega$  e I é a corrente em Ampere (A).

$$R = \frac{\rho \times l}{A} \text{ (2º Lei de Ohm)} \quad (38)$$

Onde R é a resistência elétrica do eletrodo em Ohms,  $\rho$  é a resistividade da prata, l é o comprimento do eletrodo em metros e A é a área superficial do eletrodo em metros ( $\pi r^2$ ).

A Tabela 4 apresenta os valores de resistência do eletrodo, da área transversal, da resistência, da voltagem, da corrente e da potência em função dos valores do diâmetro do eletrodo.

Tabela 4 – Cálculos de constantes elétricas dos eletrodos de prata em função do diâmetro do eletrodo

Material	Diâmetro Eletrodo (mm)	A - Área Transversal (m <sup>2</sup> )	R Resistência (Eletrodo) ( $\Omega$ )	Voltagem (V)	I Corrente (Eletrodo) (A)	Potência (W)
Ag	5,00	1,96E-05	0,00016	15	92618	1389266
Ag	2,00	3,14E-06	0,00101	15	14819	222282
Ag	1,00	7,85E-07	0,00405	15	3705	55571
Ag	0,50	1,96E-07	0,01620	15	926	13893

Fonte: (O autor, 2021).

Com base nos cálculos acima verificamos que um eletrodo de 0,50 mm de prata seria suficiente para a faixa de trabalho de corrente pretendida (10 mA até 600 mA) para comprimento de 20 cm. No entanto, devido a prata ser muito dúctil, uma espessura pequena poderia ocasionar deformidade no eletrodo rapidamente e prejudicar os ensaios. Dessa forma, verificamos que a partir de 2,00 mm de diâmetro os eletrodos tinham uma consistência adequada. Existe também uma questão econômica envolvida, pois quanto maior o diâmetro do eletrodo maior seu peso e seu custo associado.

### 3.1.1.2 Obtenção dos eletrodos por fundição e moldagem

Essa foi a primeira tentativa de confeccionar os eletrodos que não teve sucesso. Ver Apêndice D.

### 3.1.1.3 Obtenção dos eletrodos por fundição e trefilação

O processo de fundição, obtenção do lingote e trefilação são antigos da arte de metalurgia, também conhecida como ourivesaria.

Um ourives especializado foi contratado para confecção de nossos eletrodos de prata e outros metais no tamanho e composição, conforme Tabela 5, com os respectivos custos.

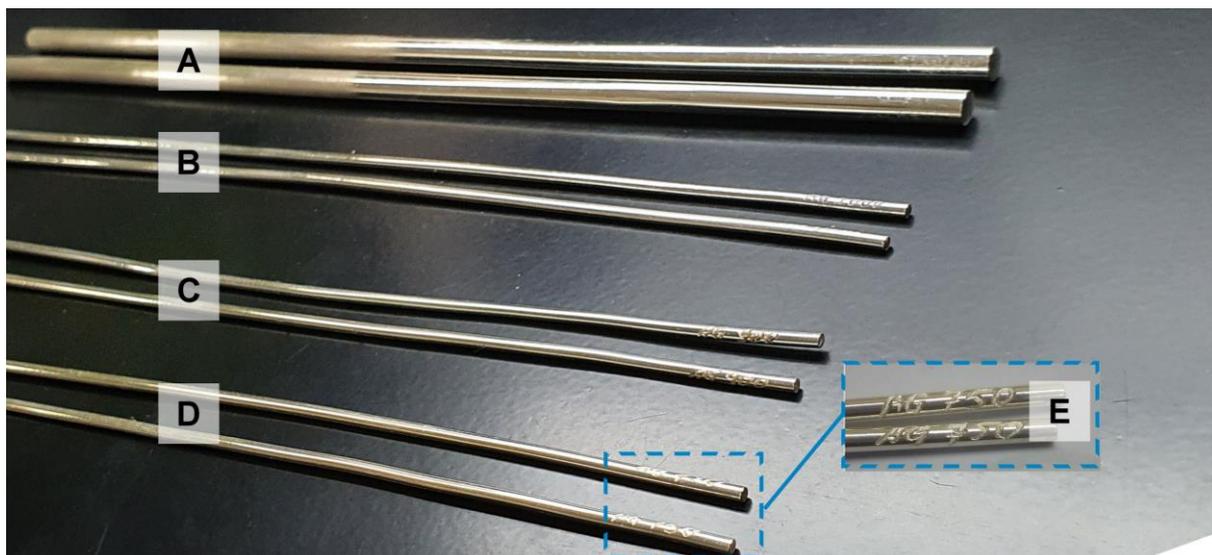
Tabela 5 - Tabela de eletrodos de prata 1000, 900, 750 e Estanho 1000 para confecção por especialista em metais com o respectivo valor

Eletrodo	Comprimento (cm)	Diametro (mm)	Massa Prata (g)	Massa Cobre (g)	Custo dos Eletrodos R\$ 20,0 a g do eletrodo c/ mão-de-obra em 01/2020)
Ag 1000 (100% Ag)	20	5,0	82,4	0,0	1.648
Ag 1000 (100% Ag)	20	2,0	13,2	0,0	264
Ag 900 (90% Ag/ 10% Cu)	20	2,0	11,7	1,3	260
Ag 750 (75% Ag/ 25% Cu)	20	2,0	9,5	3,2	254
Sn 1000 (100% Sn)	20	5,0	NA	NA	1.145
				Total	R\$ 2.678

Fonte: (O autor, 2021).

A Figura 23 mostra os eletrodos com identificação. Visualmente não é possível distinguir um eletrodo de prata 1000 para um eletrodo de prata 750.

Figura 23 - Eletrodos de prata produzidos para a condução do estudo



Legenda: Todos com 20 cm de comprimento e em formato cilíndrico. A) Prata 1000, 5 mm diâmetro. B) Prata 1000, 2 mm diâmetro. C) Prata 900, 2 mm diâmetro. D) Prata 750, 2 mm diâmetro. E) Mostra a identificação impressa em cada eletrodo. Créditos da imagem: Luiz Felipe de Melo Azevedo (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ).  
Fonte: (O autor, 2021).

#### 3.1.1.4 Fonte de alimentação e estação de trabalho eletroquímica

A fonte de alimentação é um dos itens mais importantes no controle do processo eletroquímico. Ela que enviará a corrente contínua aos eletrodos com a quantidade programada e com a voltagem estabelecida. Foi utilizado para este estudo uma fonte com marca de qualidade reconhecida e que foi utilizada por outros autores em artigos científicos. Dessa forma, a fonte da marca BK PRECISION foi usada nos estudos, conforme Figura 24, que possui faixa de trabalho de 0 a  $18V \pm 0,01 V$  e 0 a  $5A \pm 0,01 A$ .

Figura 24 – Fonte de alimentação fabricante BK PRECISION modelo 1785B

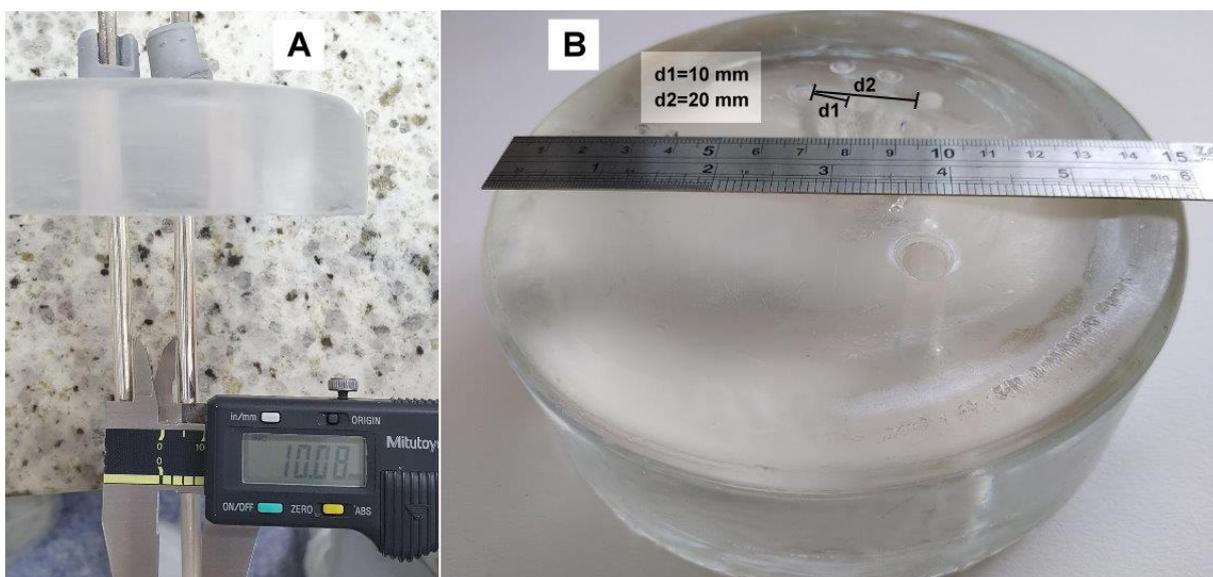


Fonte: (O autor, 2021).

Uma tampa de resina transparente foi confeccionada para ser colocada em cima do béquer e dar suporte aos eletrodos e termômetro. Esta tampa foi fabricada com a utilização de resina epóxi transparente e catalisador da marca Redelease, que foi adicionada em um molde e misturado ao catalisador que após 24 horas endurece a resina deixando-a totalmente curada e pronta para aplicação pretendida. Foram utilizados cerca de 5 kg de resina e cada kg custa 76,90 (valor de março/2020).

Além disso, esta tampa tem a função de controlar a temperatura, minimizar a entrada de oxigênio durante a eletrólise e controlar a distância entre os eletrodos. A distância entre os eletrodos é de 10 mm, conforme Figura 25 e 26.

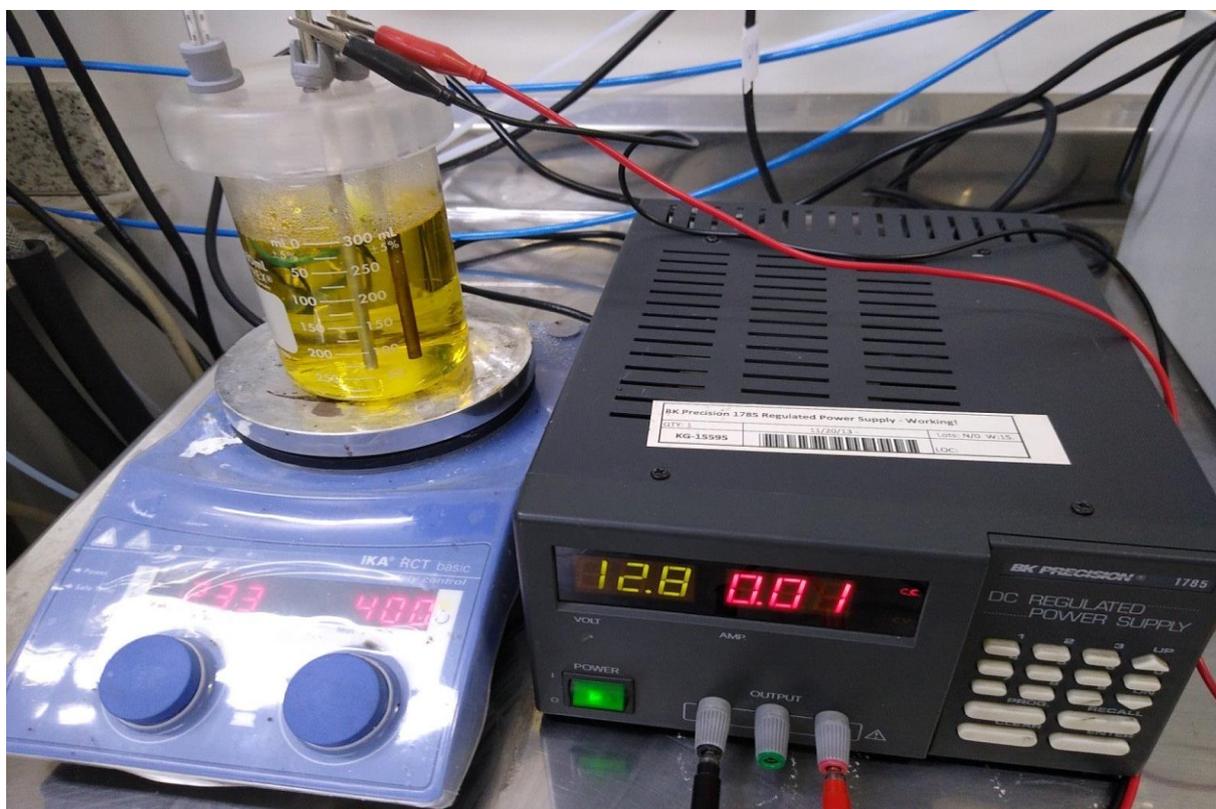
Figura 25 – Apresenta a tampa de resina acrílica de epóxi com detalhes



Legenda: (A) Tampa de resina epóxi com 2 eletrodos de prata 1000 com 5 mm de diâmetro e um paquímetro medindo a distância entre eles. (B) vista superior de resina epóxi mostrando furos de 5 mm e de 2 mm, bem como, a distância de 10 mm e 20 mm entre os eletrodos, o furo maior é para o termômetro.

Fonte: (O autor, 2021).

Figura 26 – Estação de trabalho eletroquímica



Fonte: (O autor, 2021).

A fonte de alimentação pode trabalhar no modo corrente constante (C.C.) ou voltagem constante (C.V.). Os testes foram realizados mantendo fixa a corrente determinada e, conforme o andamento da eletrólise, a resistividade do meio diminui e, conseqüentemente a voltagem (V) tende a diminuir, de acordo com a 1ª Lei de Ohm conforme equação 37.

#### 3.1.1.5 *Princípios da eletrólise (Leis de Faraday)*

A eletrólise é um processo físico-químico em que a corrente elétrica força a ocorrência de reações químicas. Todo este processo é diretamente relacionado com as leis da eletrólise. O cientista Michael Faraday (1791-1867) por meio de suas experimentações trouxe maior clareza e compreensão sobre os processos eletrolíticos. A carga de elétrons necessária para reação em função do tempo é conhecida como a primeira lei de Faraday, conforme equação 39 (EHL; IHDE, 1954; SARTORI ER, SANTOS VAGNER B, TRENCH AB, 2013).

$$Q = i \times t = C \text{ (Coulomb)} \quad (39)$$

Onde Q representa a carga elétrica medida em coulombs (C), i representa a corrente elétrica em ampere (A) e t está representando o intervalo de tempo da passagem da corrente elétrica em segundos (s).

A constante de Faraday (F) é fundamental para saber qual a carga elétrica (C) necessária para oxidar ou reduzir determinada massa de prata (mol) e, assim, obter a concentração final no valor desejado. A constante F é o resultado da multiplicação do número de Avogadro (NA) pela carga elétrica do elétron (e) e o seu valor é 96485,33289 C/mol (MOHR; NEWELL; TAYLOR, 2016).

##### 3.1.1.5.1 Cálculo do tempo de eletrólise

A exemplo, para produzir 1000 mL de AgNPs com 20 ppm, a uma corrente constante de 10 mA, qual o tempo necessário de eletrólise? Descrevemos o memorial de cálculo abaixo:

20 mg Ag para 1000 mL

Massa oxidada do eletrodo de sacrifício (catodo) = Massa que será reduzida.

1 mol de Ag = 107,8682 g

Temos que, 20 mg equivale a  $1,85 \times 10^{-4}$  mol.

Conforme a constante de Faraday, para reduzir 1 mol de  $\text{Ag}^+$  é necessário 1 mol de  $e^-$

1 mol de Ag ----- 96485,33289 C

$1,85 \times 10^{-4}$  mol ----- X

17,8895 C é a carga elétrica necessária

Aplicando 1º Lei de Faraday descobrimos o tempo necessário de eletrólise na amperagem especificada.

$$Q = i \times t \rightarrow t = Q/i$$

$$t = 17,8895 \text{ C} / 0,01 \text{ A} = 1788,949 \text{ s} \approx 30 \text{ minutos}$$

### 3.1.1.6 Proposta simplificada da síntese eletroquímica

Com conhecimento adquirido nesta pesquisa, montamos 5 formulações eletroquímicas, conforme Tabela 6 e de acordo com as seguintes premissas para todas as formulações conforme Quadro 6.

Tabela 6 – Dados do processo referente aos lotes fabricados por síntese eletroquímica

<b>Lote</b> <b>Data de Fabricação</b>	<b>Eletrodo</b>	<b>Volume produção /</b> <b>Concentração Ag</b>	<b>Dados do Processo</b>
AGE31AG1000 16/07/2020	Ag 1000 (100% Ag)	500 mL / 20,0 ppm	Corrente: 10 mA Eletrólise: 15 minutos
AGE32AG900 16/07/2020	Ag 900 (90% Ag/10% Cu)	500 mL / 20,0 ppm	Corrente: 10 mA Eletrólise: 15 minutos
AGE33AG750 16/07/2020	Ag 750 (75% Ag/25% Cu)	500 mL / 20,0 ppm	Corrente: 10 mA Eletrólise: 15 minutos
AGE34AG950L1 16/07/2020	Ag950L1 (95% Ag/ 5% Cu e Ge)	500 mL / 20,0 ppm	Corrente: 10 mA Eletrólise: 15 minutos
AGE35Ag@Sn 16/07/2020	Ag 1000 e Sn 1000	500 mL / 20,0 ppm Ag 3,6 ppm Sn	Corrente: 10 mA Eletrólise 1º Etapa: 15 minutos (catodo Ag 1000) 2º Etapa: 5 minutos (catodo Sn 1000)

Fonte: (O autor, 2021).

Quadro 6 – Sequência de procedimentos necessários durante todas as etapas da eletrólise até o acondicionamento final do produto

Sequência	Descrição	Etapa
1	Lavagem do béquer com detergente de laboratório (Extran®). Após enxaguar com HNO <sub>3</sub> 2% e depois com água ultrapura tipo 1.	Antes da eletrólise
2	Adicionar 90% da quantidade água ultrapura tipo 1	Antes da eletrólise
3	Adicionar 1 mM/L KNO <sub>3</sub> .	Antes da eletrólise
4	Purga de N <sub>2</sub> por 15 minutos.	Antes da eletrólise
5	Preparar a estação de trabalho eletroquímica com os eletrodos (10 mm distância entre eles) e termômetro.	Antes da eletrólise
6	Agitação constante em 400 rpm (de acordo com o volume de fabricação e o agitador magnético utilizado pode ser necessário um ajuste para que não haja a formação de vortex). O agitador magnético deve ter um tamanho aproximado entre 1/3 a 2/3 do diâmetro do béquer.	Antes da eletrólise
7	Aquecimento do sistema com tampa de epóxi até 80°C.	Antes da eletrólise
8	Iniciar a eletrólise pelo tempo calculado.	Eletrólise
9	Agitação constante em 400 rpm, ou ajustar para não causar vortex.	Eletrólise
10	Desligar a fonte ao término do tempo de eletrólise.	Fim da eletrólise
11	Desligar aquecimento e diminuir a agitação para 50 rpm. Aguardar esfriar naturalmente.	Após eletrólise
12	Adicionar borax na seguinte proporção molar: 1 parte Ag: 0,5 para borax (tampão e protetor da Ag).	Após eletrólise
13	Transferir quantitativamente todo conteúdo do béquer para um balão volumétrico apropriado e avolumar com água ultrapura tipo 1.	Após eletrólise
14	Transferir a solução de AgNP para frasco apropriado vidro (preferencialmente âmbar) ou poli(tereftalato de etileno) (PET). Envolvê-lo com papel alumínio e identifica-lo com seu n° lote.	Finalização
15	Armazenar em câmara fria 2-8°C. NÃO CONGELAR.	Finalização

Fonte: (O autor, 2021).

Uma planilha foi criada para automatizar os cálculos e evitar possíveis erros de cálculo, durante o processo produtivo, conforme Figura 27 e 28. Esta planilha armazena as informações detalhadas de cada lote produzido, bem como efetua

cálculos do tempo de eletrólise, cálculos da massa, equivalente estequiométrico e outras informações, que são úteis ao processo de síntese e desenvolvimento.

Figura 27 – Planilha de síntese das AgNPs com configurações de processo, tempo de eletrólise e outras informações (continua)

B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
Mestrado INCQS/Fiocruz: Síntese e Controle Sanitário de Nanopartículas de Prata										© 2021 Gabriel Mustafá Misirli					
<b>Planilha de Síntese - Nanopartículas Prata (Silver Nanoparticles)</b>															
<b>Data</b>		16/07/2020			<b>Lote:</b>		AGE35AG@SN			<b>Dados do Processo e Parâmetros de Controle</b>					
<b>Número de Camadas da Nanopartícula</b>		2			<b>Volume de Produção (mL)</b>		500			Temperatura	80	°C			
										Velocidade Homogeneização	400	rpm			
										Razão Molar Ag:Protetor 1	Borax	0,50			
										Razão Molar Ag:Protetor 2					
										Razão Molar Ag:Protetor 3					
										Razão Molar Ag:Protetor 4					
										Razão Molar Ag:Peróxido	-				
										Razão Molar Ag:Redutor	-				
										pH Inicial	6,50				
										pH Final desejado	9,0				
										Viscosidade a 5°C		cP			
<b>Nanopartícula:</b>		Ag	@	Sn	@										
<b>Concentração Massica:</b>		20,0			ppm										
<b>Dados e Constantes</b>															
1 mol	6,02E+23														
Carga e	1,6E-19			C											
Constante Faraday	96485,3329			C/mol											
<b>N° de Nanopartículas/L</b>	2,913E+16			%											
<b>Concentração (Núcleo)</b>	Ag	20,0	ppm	84,70											
<b>Concentração (2° Cam.)</b>	Sn	3,6	ppm	15,30											
<b>Concentração (3° Cam.)</b>		0,0	ppm	0,00											
<b>Massa Total das NPs</b>	8,11E-19			g			100,00								
<b>Densidade média Nanopartícula</b>	10,00			g/cm3											
<b>Massa da Nanopartícula</b>	1,022E-18			g											
<b>Tamanho Final das NPs</b>	5,4			nm											
<b>Tamanho Final das NPs (Kda)</b>	615,1			Kda											
<b>Tamanho das NPs</b>	5,00	nm	<b>Espessura da 2° Camada</b>		0,40	nm	<b>Espessura da 3° Camada</b>			nm					
<b>Concentração Mássica</b>	20,0	ppm	<b>Concentração NPs</b>		3,6	ppm	<b>Concentração NPs</b>		0,0	ppm					
<b>Massa Partícula</b>	6,9E-19	g	<b>Massa da Camada na NP</b>		1,2E-19	g	<b>Massa da Camada na NP</b>		0,00E+00	g					
<b>Elemento Núcleo</b>	Ag			NanoShell (Camada)			Sn								
<b>Dados da Eletrólise (1° Etapa)</b>					<b>Dados da Eletrólise (2° Etapa)</b>					<b>Dados da Eletrólise (3° Etapa)</b>					
Voltagem	15,0	V	Voltagem	15,0	V	Voltagem	#DIV/0!	V							
Corrente	10,0	mA	Corrente	10	mA	Corrente		mA							
Potência	0,15	W	Potência	0,15	W	Potência		W							
Tempo	14,9	min	Tempo	4,9	min	Tempo		min							
Carga Elétrica (Q)	8,94	C	Carga Elétrica (Q)	2,94	C	Carga Elétrica (Q)		C							
<b>Elemento Núcleo</b>	Ag			NanoShell (Camada)			Sn								
<b>Dados da Eletrólise (1° Etapa)</b>					<b>Dados da Eletrólise (2° Etapa)</b>					<b>Dados da Eletrólise (3° Etapa)</b>					
Voltagem	15,0	V	Voltagem	15,0	V	Voltagem	#DIV/0!	V							
Corrente	10,0	mA	Corrente	10	mA	Corrente		mA							
Potência	0,15	W	Potência	0,15	W	Potência		W							
Tempo	14,9	min	Tempo	4,9	min	Tempo		min							
Carga Elétrica (Q)	8,94	C	Carga Elétrica (Q)	2,94	C	Carga Elétrica (Q)		C							
<b>Fonte do Elemento</b>	eletrodo			eletrodo			eletrodo								
<b>Valência</b>	1			2											
<b>Sal Precursor</b>															
<b>Massa Molar</b>	107,87	g/mol	<b>Massa Molar</b>	118,71	g/mol	<b>Massa Molar</b>		g/mol							
<b>Massa Oxi/Red (mg)</b>	10,00	Ag	<b>Massa Oxi/Red (mg)</b>	1,8	Sn	<b>Massa Oxi/Red (mg)</b>		0,0							
										<b>Variação temperatura</b>		79	mínima	82	máxima
										<b>Tempo</b>		0	15,0	10	Ag
										<b>Voltagem</b>		1	13,5	10	Ag
										<b>I (mA)</b>		2	12,3	10	Ag
												5	11,0	10	Ag
												7	10,4	10	Ag
												15	9,5	10	Sn
												15	9,5	10	Sn
<b>Observações:</b>															
Tudo OK durante o processo.															
Ao iniciar a 2° Etapa da eletrólise o estanho altera a cor de amarelo para castanho "acinzentado"															
Voltagem inicial atingiu máxima com amperagem mínima. Em próximo tentativa avaliar diminuição do KNO3.															
<b>Produção</b>															
<b>Matéria-prima</b>		Conc	%	Quant. (mL)	n° de mMols										
<b>Precursores</b>	Água Milli-Q		90,0	450,0											
	eletrodo	Ag			0,093	1° Etapa									
	eletrodo	Sn			0,015	2° Etapa									
						3° Etapa									
<b>NaBH4</b>	0,1	M	0	0,000	0,0000										



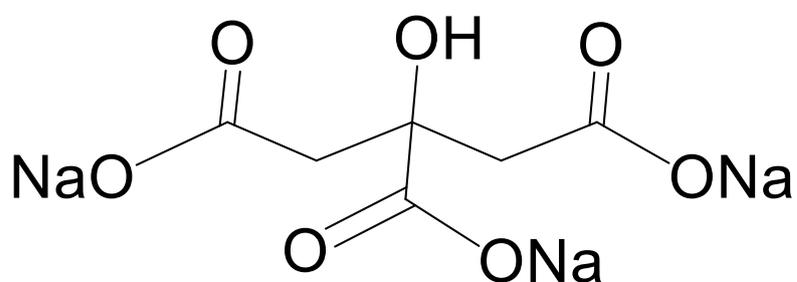
Dados do BH<sub>4</sub>: Fabricante: Sigma, Lote: SHBK1761. FR 5 g.

### 3.1.2.2 *Citrato versus Borax como agente de revestimento*

A utilização do citrato tri-sódico é bem conhecida na síntese de nanopartículas, talvez tenha origem com o método de síntese de ouro coloidal de Turkevich (1951). Sua função como estabilizante é fato reconhecido na síntese das nanopartículas. No entanto, uma outra matéria-prima tem relevância neste estudo, que é o borax.

Ambas estruturas químicas são apresentadas nas Figuras 28 e 29.

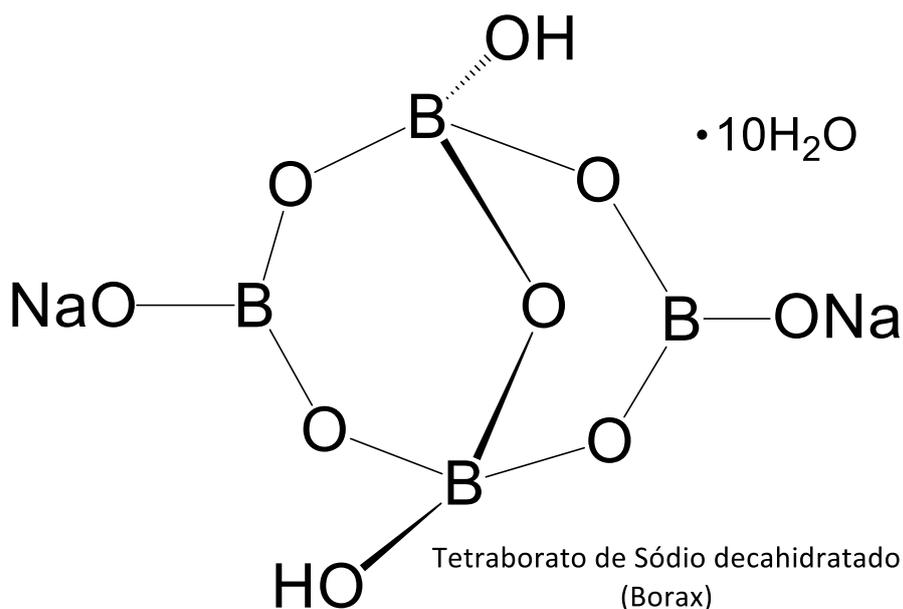
Figura 28 - Estrutura do citrato tri-sódico



Citrato Tri-sódico

Fonte: (O autor, 2021).

Figura 29 - Estrutura do Tetraborato de sódio



Fonte: (O autor, 2021).

O ânion tetraborato é um anel, inclui dois átomos de boro tetraédricos ( $sp^3$ ) e dois átomos de boro trigonais ( $sp^2$ ) localizados simetricamente em estrutura cíclica. Além disso, o borax possui excelente estabilidade química e em associação com o  $[B(OH)_4]^-$  ou  $H_3BO_3$  (gerado na hidrólise do  $BH_4$ , conforme equação 18) atua como tampão de pH na faixa de pH 8,5 a 9,5, que é exatamente a faixa de trabalho com as AgNPs.

Um outro aspecto que não poderia ser esquecido é a toxicidade. Segundo a OMS, as doses letais relatadas para ácido bórico são 640 mg/kg de peso corporal (oral) e considera o  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  (borax), ácido bórico e outros boratos como semelhantes, quando dissolvidos em água ou fluidos biológicos (OMS, 2003).

Na proporção máxima de 0,185 mMol/L de borax, que foi a quantidade média utilizada na síntese, que equivale a 70,6 mg de borax ou 8,0 mg de boro para cada litro de AgNPs produzidas. Segundo a OMS, e outros cientistas, como Rex Newnham, um teor de boro de 3 a 10 mg para ingestão diária é considerado seguro e essencial para nossa saúde, e fundamental na saúde dos ossos e articulações (NEWNHAM, 1994).

Foram realizadas várias formulações com a redução de  $Ag^+$  pelo  $BH_4$ , **com 10% a mais do que a quantidade estequiométrica necessária ( $R = 1,10$ )**, e com variações na temperatura de processo e relação molar prata e agente protetor, conforme Tabela 7. Todas as amostras foram calculadas para obter concentração mássica final de 20 ppm de AgNPs, e a velocidade de agitação do processo foi de 400 rpm.

Tabela 7 - Relação de sínteses de AgNPs com citrato e borax

Agente Protetor	Relação Molar Ag:Protetor	Relação Molar Ag:BH <sub>4</sub> (R)	Temperatura (°C)	Lote
Citrato	0,5	1,10	25	AGBH11C05T25
Citrato	1,0	1,10	25	AGBH11C10T25
Citrato	0,5	1,10	60	AGBH11C05T60
Citrato	1,5	1,10	60	AGBH11C15T60
Citrato	0,5	1,10	80	AGBH11C05T80
Borax	0,5	1,10	25	AGBH11BOR05T25
Borax	1,0	1,10	25	AGBH11BOR10T25
Borax	2,0	1,10	25	AGBH11BOR20T25
Borax	1,0	1,10	80	AGBH11BOR10T80

Legenda: A Tabela mostra relação molar do agente protetor em relação a 1 molar de Ag. Agitação (400 rpm), AgNO<sub>3</sub> e teor de BH<sub>4</sub> foram iguais para todos os lotes.

Fonte: (O autor, 2021).

Foi utilizado a mesma solução de nitrato de prata 0,1N para todos os lotes fabricados e padronizada, preferencialmente, no dia da síntese. Conforme equação 17, para cada 1 Mol de Ag<sup>+</sup> é necessário 1 mol de BH<sub>4</sub><sup>-</sup>.

Diversos autores utilizam a quantidade de BH<sub>4</sub>, que varia de 200% (R=2) a 600% (R=6) a mais do que a quantidade estequiométrica necessária para redução da prata (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014; VAN HYNING; ZUKOSKI, 1998; WUITHSCHICK *et al.*, 2013). Porém, após hidrólise do excesso de BH<sub>4</sub>, é gerado H<sub>2</sub> e B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> (equação 18) e este íon (água boricada) fica na solução. Em nosso trabalho, verificamos que esta quantidade não é necessária. Um pequeno excesso de 10% foi suficiente, além de ter proporcionado menor tamanho de partícula, maior PZ, menor PDI, comparando com a mesma formulação utilizando-se os fatores de R=1,5, 2,0 e 3,0, por exemplo.

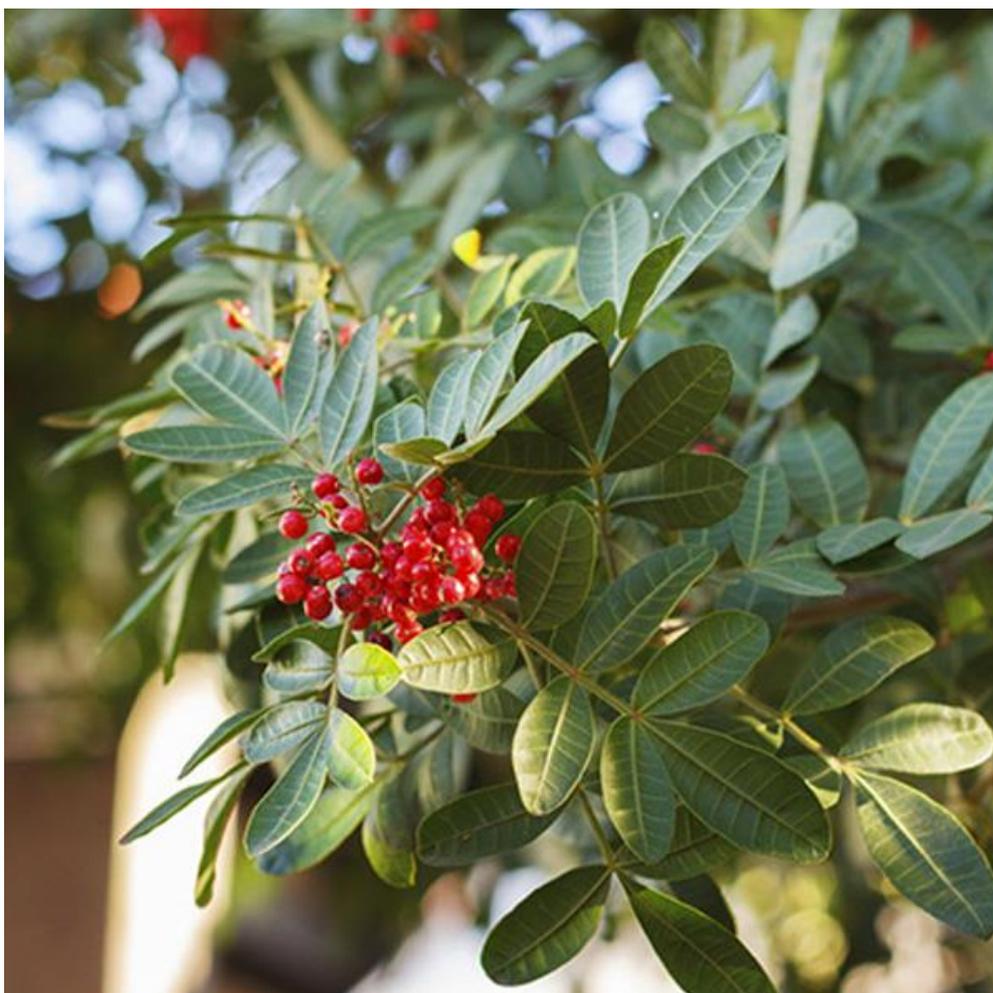
### 3.1.3 Síntese verde de AgNPs com NOM

#### 3.1.3.1 NOM escolhida: *Schinus terebinthifolius*

O extrato das folhas de Aroeira pimenteira rosa (*Schinus terebinthifolius leaf*) (Figura 30) possui uma atividade antimicrobiana promissora, inclusive para

*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) além de atividade antifúngica, antioxidante e outras (MUHS *et al.*, 2017). Essa planta tipicamente brasileira foi testada para verificar sua sinergia de ação junto com as AgNPs, bem como seu potencial estabilizador.

Figura 30 – Foto da árvore de Aroeira pimenteira rosa (*Schinus terebinthifolius*)

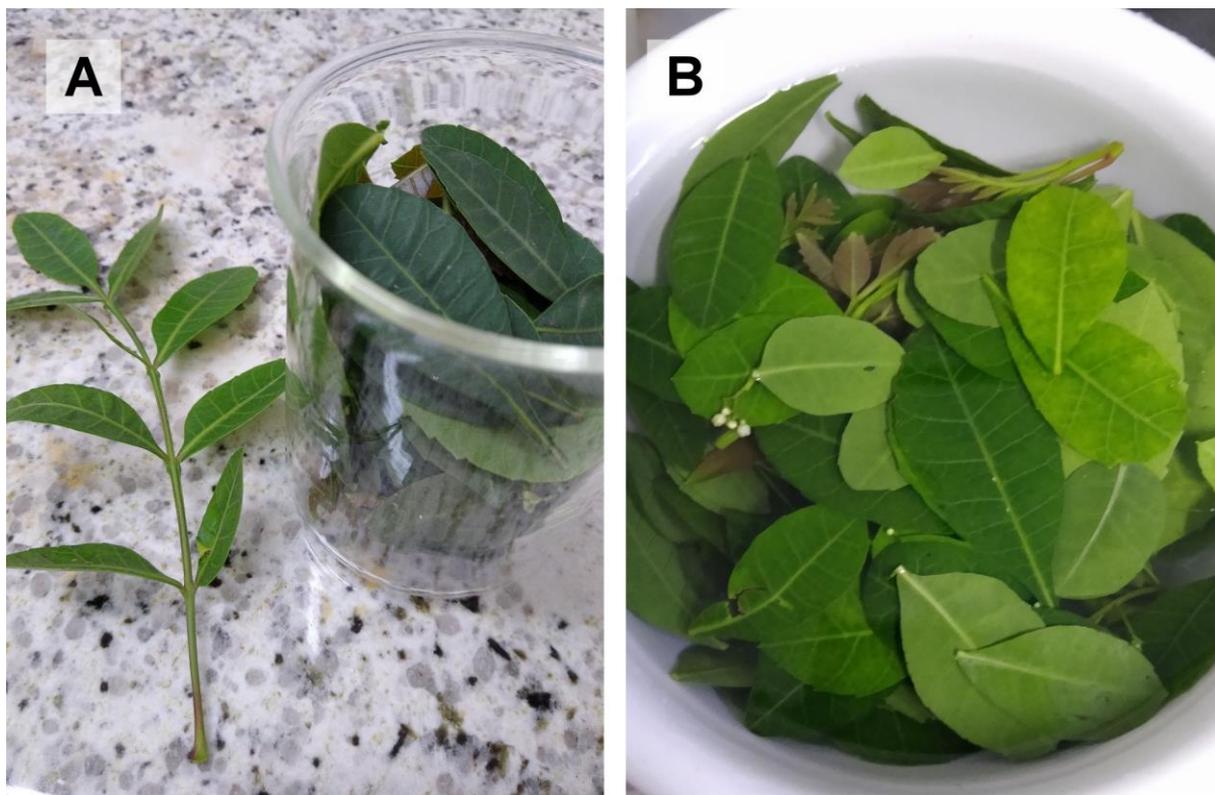


Fonte: (VEJA, 2017).

### 3.1.3.2 Preparo do Extrato de Folhas de Aroeira

Foram coletados ramos jovens e frescos da árvore Aroeira. As folhas foram separadas e lavadas em água ultrapura tipo 1 e enxaguadas, por 3 vezes para remoção de toda poeira, partículas e/ou possíveis insetos conforme Figura 31.

Figura 31 – Coleta e lavagem das folhas de aroeira



Legenda: (A) Folha de aroeira recém-coletada. (B) Folhas em processo de lavagem com água ultrapura tipo 1.

Fonte: (O autor, 2021).

Após isso as folhas foram secas em estufa a vácuo a 65°C por 24 h e após este tempo as folhas estavam completamente secas, conforme Figura 32.

Figura 32 – Secagem das folhas de aroeira



Legenda: (A) Estufa a vácuo ajustada para 65°C. (B) Folhas secas de Aroeira após 24 h na estufa a vácuo.

Fonte: (O autor, 2021).

Em seguida foram pesados 5 g de (massa seca) e colocados em 50 mL de etanol 60°GL. Esta mistura foi colocada em recipiente de vidro âmbar para ficar macerando por 15 dias em temperatura ambiente e no escuro, agitando o recipiente diariamente conforme indicado pela Farmacopeia Homeopática Brasileira (ANVISA, 2011). Com obtenção do extrato alcoólico de folhas de Aroeira a 10% (massa seca).

Após este tempo o extrato foi filtrado e devidamente armazenado em frasco de vidro, local escuro e na temperatura ambiente.

### 3.1.3.3 Síntese de AgNPs com Aroeira

O extrato de aroeira foi inserido no método de redução com NOM e com borohidreto. As variações das formulações, métodos e agentes protetores são descritos na Tabela 8.

Tabela 8- Síntese das AgNPs com extrato de aroeira e dados do processo com agentes protetores e respectivo lote

Método	Dados do Processo	Agente Protetor / Revestimento	Temp. (°C)	Lote
	Conc. AgNP final: 20 ppm	Borax 0,093 mMol/L		
Redução por NOM, BH4	0,185 mMol/L AgNO <sub>3</sub> 0,204 mMol/L BH4  Tempo de reação: 40 minutos	Após término e na temperatura ambiente: BSA 5,0 µg/mL 1% Extrato Aroeira	80	AGCBOR05BSA05 T80AROEV15

Legenda: NOM, Matéria orgânica natural.

Fonte: (O autor, 2021).

O nitrato de prata 0,1N foi padronizado no dia da síntese.

### 3.1.4 Síntese de AgNPs Bi-metálicas (core-shell)

Produção de nanopartículas núcleo-camada (core-shell) de Sn e Ag acopladas em uma única core-shell de Sn@Ag não podendo ser separadas. As NPs bimetálicas podem amplificar suas características e desempenhos físico-químicos comparados às suas partes monometálicas isoladas, porque suas estruturas eletrônicas estão em ressonância e equilíbrio (ARANISHI *et al.*, 2011).

#### 3.1.4.1 Síntese de nanocamada de AgNPs com núcleo de estanho Sn@Ag

Em um béquer de 600 mL, devidamente limpo e conforme sequência 1 do Quadro 7, foi adicionado 490 mL de água ultrapura tipo 1, 120 µL de citrato tri-sódico a 0,39M (0,046 mmol), 286 µL cloreto estanhoso (SnCl<sub>2</sub>) a 0,01M (0,003 mmol), com agitação de 400 rpm e aquecimento até 80°C. Após a temperatura em 80°C,

adicionou-se 63  $\mu\text{L}$   $\text{BH}_4$  a 0,1M (0,006 mmol) e homogeneizar por 30 minutos. O aquecimento deverá se manter durante todo o processo.

Na segunda etapa, adicionou-se 927  $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$  a 0,1M (0,093 mmol), 1020  $\mu\text{L}$   $\text{BH}_4$  a 0,1M (0,102 mmol) e 464  $\mu\text{L}$  borax a 0,1M (0,046 mmol) e continuou-se a reação por mais 60 minutos. Após, diminuiu-se a agitação para 100 rpm e aguardar esfriar a solução até 20°C e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 500,00 mL, avolumando com água ultrapura tipo 1.

A razão molar Sn:Ag = 1:32.

## 3.2 Controle da Qualidade das AgNPs

### 3.2.1 Quantificação por ICP-OES

#### 3.2.1.1 *Separação por ponto de névoa (EPN)*

A extração das AgNPs foi realizada em tubo de polipropileno tipo “Falcon®”, Onde 9,5 mL da amostra são adicionados, 400 $\mu\text{L}$  Triton X-100 5% (p / v), 100  $\mu\text{L}$  1M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (tiosulfato de sódio) e cerca de 10  $\mu\text{L}$  1M  $\text{HNO}_3$  para amostras com pH até valor de 10, esta quantidade é suficiente para que o pH fique em torno de 3,0. As amostras foram aquecidas em banho-maria 65 °C que é o ponto de névoa e, a seguir, centrifugadas por 30 minutos a 3000 rpm (rotações por minuto), conforme mostrado na Figura 16.

#### 3.2.1.2 *Preparo da curva de calibração*

O método do ICP-OES é bem sensível para detecção de prata.

Como existe um número variável de amostras de ampla faixa de concentrações e dissociações dos íons, realizamos o preparo de uma curva analítica com 6 níveis em triplicata.

Utilizamos um padrão de nitrato de prata 1000 ppm, para ICP MRC<sup>1</sup> (anexo A), para preparar os padrões para curva analítica conforme Tabela 9. Valor real da concentração de Ag no certificado = 998 mg/L e todos os padrões foram avolumados com HNO<sub>3</sub> Suprapur<sup>®</sup> 2% (v/v).

Tabela 9 – Preparo dos padrões para curva de calibração com alíquota e volume do balão volumétrico

	Conc (ppm)	Aliquota ( $\mu$ L)	Balão Volumétrico (mL)	Concentração Real (ppm)	Concentração Real (ppb)
P1	0,010	20,0	2000,00	0,00998	9,98
P2	0,100	50,0	500,00	0,09980	99,80
P3	0,250	125,0	500,00	0,24950	249,50
P4	0,500	125,0	250,00	0,49900	499,00
P5	0,750	150,0	200,00	0,74850	748,50
P6	1,000	100,0	100,00	0,99800	998,00

Fonte: (O autor, 2021).

### 3.2.1.3

#### 3.2.1.4 *Preparo das amostras*

Uma alíquota de amostra (tendo como orientação a Tabela 8) foi transferida para um béquer de 50 mL, onde foram adicionados 1,0 mL de água ultrapura tipo 1 e 1,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado suprapur. Esta mistura foi levada à fervura branda até a solução ficar totalmente translúcida (cerca de 1 a 3 minutos de fervura). Após resfriamento da solução, todo este conteúdo, foi transferido quantitativamente para balão volumétrico, avolumando-se com HNO<sub>3</sub> 2%.

Os padrões e branco foram preparados com HNO<sub>3</sub> 2%, com o mesmo utilizado para o preparo das amostras.

---

<sup>1</sup> Material de referência, caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor de propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica.

Todas as amostras a serem analisadas foram diluídas com HNO<sub>3</sub> 2% e o fator de diluição das amostras foi estabelecido conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Fator de diluição das amostras para análise de prata total e prata iônica

	Faixa de Concentração	Alíquota (μL)	Balão Volumétrico	Fator Diluição
Prata Total	10 a 80 ppm	200,0	10,00	50X
Prata Iônica	0,1 a 20 ppm	1000,0	10,00	10X

Fonte: (O autor, 2021).

### 3.2.1.5 Parâmetros de análise e configuração do método no ICP-OES

O ICP-OES utilizado em nossos estudos foi o modelo Óptima 7000DV do fabricante PerkinElmer, com os seguintes acessórios descritos no Quadro 7.

Quadro 7 –Acessórios do ICP-OES utilizados

Acessórios:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nebulizador MicroMist</li> <li>- Câmara Baffled Cyclonic</li> <li>- Tocha Quartz 1-Slot Torch.</li> </ul>
-------------	--

Fonte: (O autor, 2021).

As configurações analíticas para o método de quantificação da prata neste equipamento com utilização do *software* Winlab 32 são descritas no Quadro 8.

Quadro 8 – Parâmetros de configuração do método no Winlab32

Comprimento de Onda ( $\lambda$ )	328,068	
Purge Gas Flow:	Normal	
Parâmetros de Leitura:	Min Time	Max Time
	1,0 s	5,0 s
	Delay Time (Sec)	45
	Replicates	3
Plasma	Source Equilibration Delay	15 s
	Gas Flow Plasma (L/min)	15
	Auxiliary (L/min)	0,2
	Power (watts)	1300
	Plasma view	Axial
Nebulizador	Fluxo (L/min)	0,85
Amostra	Sample Flow Rate (mL/min)	1,00
	Flush time	30 s
Limpeza	Wash	Between Samples
	Rate (mL/min)	2,50
	Flush Time (s)	30

Fonte: (O autor, 2021).

### 3.2.1.6 Validação da metodologia

Em função do tempo disponível para conclusão do trabalho, optou-se pela realização de uma validação parcial. Foi avaliada a linearidade (nos resíduos da linearidade foram avaliados presença de valores extremos (“outliers”), a normalidade, homoscedasticidade, a independência da regressão), a significância da regressão, a significância da falta de ajuste, seletividade, recuperação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e repetibilidade. **Todos os parâmetros de regressão e os testes estatísticos descritos nos itens abaixo** foram calculados com o auxílio da planilha intitulada “Planilha para Avaliação de Premissas” elaborada por Bazilio e colaboradores (2012).

### 3.2.1.6.1 Linearidade

A curva analítica foi preparada conforme item 3.2.1.2.

Para avaliação foram utilizados teste de normalidade, homoscedasticidade dos resíduos, significância da regressão (ANOVA) a um nível de significância de 5% e o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990. Todos os cálculos estatísticos foram realizados de acordo com planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012), conforme ANEXO B – PLANILHA PARA AVALIAÇÃO DE PREMISSAS BAZILIO *ET AL* (2012).

#### 3.2.1.6.1.1 Tratamento de valores extremos (*outliers*)

Os valores extremos foram avaliados pelo método dos resíduos padronizados Jackknife e os valores considerados extremos são marcados de vermelho e não são considerados na avaliação das premissas. Todos os cálculos estatísticos foram realizados de acordo com planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012), conforme ANEXO B – PLANILHA PARA AVALIAÇÃO DE PREMISSAS BAZILIO *ET AL* (2012).

#### 3.2.1.6.1.2 Teste de normalidade

Foi utilizado o método Ryan-Joiner (RYAN; JOINER; JNR., 1985) para verificação da normalidade.

O coeficiente de correlação  $R_{eq}$  deve ser comparado com o valor Tabelado de  $R_{crit}$  para um nível de significância de 0,05. Para  $R_{eq} > R_{crit}$  a distribuição é normal e para  $R_{eq} < R_{crit}$  a distribuição não é normal. Todos os cálculos estatísticos foram realizados de acordo com planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012), conforme ANEXO B – PLANILHA PARA AVALIAÇÃO DE PREMISSAS BAZILIO *ET AL* (2012).

#### 3.2.1.6.1.3 Teste de homoscedasticidade

Foi utilizado o teste de Levene (1960 apud BAZILIO *et al.*, 2012) para avaliação deste parâmetro e todos os cálculos estatísticos foram realizados de acordo com

planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012), conforme ANEXO B – PLANILHA PARA AVALIAÇÃO DE PREMISSAS BAZILIO *ET AL* (2012).

#### 3.2.1.6.1.4 Teste de autocorrelação dos resíduos (independência)

Todos os cálculos estatísticos foram realizados de acordo com planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012), conforme ANEXO B – PLANILHA PARA AVALIAÇÃO DE PREMISSAS BAZILIO *ET AL* (2012).

#### 3.2.1.6.1.5 Teste de significância da regressão

Todos os cálculos estatísticos foram realizados de acordo com planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012), conforme ANEXO B – PLANILHA PARA AVALIAÇÃO DE PREMISSAS BAZILIO *ET AL* (2012).

#### 3.2.1.6.2 Seletividade e tendência

Para avaliar a tendência um dos processos utilizados é a realização de ensaios de recuperação, a adição de uma respectiva quantidade conhecida de prata na forma de  $\text{Ag}^+$  (padrão de prata 1000 ppm MRC), sob a amostra.

A seletividade foi testada pela sua capacidade de quantificar a prata com adição de 500 ppb de cobre adicionado na amostra, como impureza, na própria matriz das AgNPs fabricadas.

Foram escolhidos um padrão de AgNP 10 nm (Sigma) e uma amostra de AgNP de nossa produção para avaliar a seletividade e recuperação do método. Com volumes de alíquota da amostra, padrão de  $\text{Ag}^+$  1000 ppm e padrão de  $\text{Cu}^+$  1000 ppm (contaminante), definidos conforme Tabela 11, foram digeridos com 1,00 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado suprapur e transferidos quantitativamente para o respectivo balão volumétrico e avolumados com  $\text{HNO}_3$  2%.

Tabela 11 – Identificação das amostras com respectivas alíquotas e preparo para ensaio de recuperação e seletividade

	Alíquota Amostra ( $\mu\text{L}$ )	Alíquota Padrão Ag+ 1000 ppm ( $\mu\text{L}$ )	Alíquota Padrão Cu 1000 ppm ( $\mu\text{L}$ )	Balão Volumétrico
<b>AgNP 10 nm</b>	400,0	100,0	100,0	200,00 mL
<b>AGCBOR05V13</b> (síntese com BH4 e borax)	400,0	100,0	100,0	200,00 mL

Fonte: (O autor, 2021).

Cem microlitros do Padrão da solução de Ag a 1000 ppm fornece 500 ppb do elemento para o volume 200,00 mL. De acordo com a Tabela da AOAC apud INMETRO, (2020), o critério de aceitação para recuperação da prata na faixa de concentração de 0,1 ppm até 10 ppm é 80 a 110% (INMETRO, 2020) e seu cálculo é dado pela fórmula abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{Ag_{Conc}(\text{Amostra\_Fortificada}) - Ag_{Conc}(\text{Amostra})}{500 \text{ ppb Ag} \times \left(\frac{998^*}{1000^{**}}\right)} \times 100$$

\* - Concentração real de prata no certificado. \*\* Concentração teórica do padrão de prata 1000 ppm.

### 3.2.1.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Todos os cálculos estatísticos foram realizados de acordo com planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012), conforme ANEXO B – PLANILHA PARA AVALIAÇÃO DE PREMISSAS BAZILIO ET AL (2012).

### 3.2.1.6.4 Repetibilidade

Para avaliação da repetibilidade do método, foi analisado um lote produzido de AgNPs, AGCBOR05V13. As análises foram conduzidas nas mesmas condições analíticas, pelo mesmo analista, em triplicata e no mesmo dia. A repetibilidade do método foi avaliada para a concentração de prata total utilizando-se o desvio padrão

relativo ( $DPR_r$ ) que é igual à média das medições dividida pelo desvio padrão das medidas e multiplicado por 100 e o desvio padrão relativo previsto ( $DPRPr$ ).

O valor de  $DPRPr$  é igual a metade do valor do desvio padrão relativo previsto de reprodutibilidade ( $DPRPr_R$ ) que para concentrações até 1 ppm (mg/kg) ou fração de massa de  $1,0 \times 10^{-6}$  (C),  $2C^{-0,1505}$  que é 16%.

### 3.2.2 Espectroscopia UV-VIS

Foi utilizado o espectrômetro a Agilent modelo Cary 60 UV-Vis.

As varreduras foram utilizadas na caracterização e acompanhamento da estabilidade das AgNPs com a seguinte configuração:

Faixa de varredura: 210 a 1100 nm

Tempo médio: 0,1000 s

*Data interval*: 1 nm

Velocidade de varredura: 600 nm/min

### 3.2.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A análise de DLS foi realizada introduzindo 1,0 mL de amostra na célula. Antes das medições, as amostras foram diluídas dez vezes com água ultrapura tipo 1. Após o equilíbrio a uma temperatura de 20 °C por 2 min, cinco medições foram realizadas usando 12 repetições de 10 s cada.

A distribuição do tamanho das partículas e o potencial zeta foram medidos por DLS (Zetasizer, Nano ZS, Malvern) com arranjo óptico do detector em 90°, conforme Figura 33.

Figura 33 - Equipamento de DLS



Legenda: Modelo, (Zetasizer, Nano ZS, Malvern); Local, LMN/Farmanguinhos/Fiocruz  
 Fonte: (O autor, 2021).

As constantes da prata utilizadas em nosso estudo foi a de Rakic e colaboradores (1998) no comprimento de onda de 0,633  $\mu\text{m}$ , que são apresentados no Quadro 9, juntamente com as constantes do meio dispersante principal, que é a água.

Quadro 9 – Constantes da água e da prata utilizadas na análise de DLS no equipamento Malvern

Constantes	Dispersante principal (água)	Prata	Referência
Coeficiente de Extinção (k)	-----	3,8060 ( $\lambda=633$ nm)	(RAKIĆ et al., 1998)
Índice de Refração	1,33211 (20°C)	0,15680 ( $\lambda=633$ nm)	(RAKIĆ et al., 1998)
Viscosidade	1,0005 cP	-----	
Temperatura	20 °C	-----	
Constante Dielétrica	80,4	-----	

Fonte: (O autor, 2021).

Foram analisadas amostras de padrões de AgNPs com os tamanhos de 10, 20, 40, 60 e 100 nm, para se obter a correlação do tamanho certificado do fabricante com o resultado do DLS, conforme Tabela 12.

Tabela 12 – Amostras de Padrão AgNP para análise DLS

Número	Amostra	Código	Fabricante/ Código	Lote
1	Padrão 10 nm	PD10	Sigma / 730785	MKCJ6205
2	Padrão 20 nm	PD20	Sigma / 730793	MKCK5339
3	Padrão 40 nm	PD40	Sigma / 730807	MKCJ3883
4	Padrão 60 nm	PD60	Sigma / 730815	MKCK7323
5	Padrão 100 nm	PD100	Sigma / 730777	MKCK7625
6	50% Padrão 20 nm + 50% Padrão 60 nm	PD20_PD60	Não aplicável	Não aplicável

Fonte: (O autor, 2021).

### 3.2.3.1 Seletividade de detecção do DLS

Um fato importante a ser pesquisado e observado é que aglomerado de água podem chegar até 100  $\mu\text{m}$ . SHU e colaboradores (2015) verificaram que o cloreto de sódio (NaCl) não se dissolve completamente em água. Uma solução de NaCl 0,2M forma agregados com cerca de 100 nm e foram encontrados no DLS nanosizer (SHU; WU; JEGATHEESAN, 2013).

Se o NaCl, que é um sal altamente solúvel, forma agregados de sal em soluções diluídas, é lógico concluir que outros sais e até outras substâncias semelhantes ou menos solúvel, também devam formar agregados em soluções diluídas. Portanto, a agregação é um amplo fenômeno de propagação (SHU *et al.*, 2015).

Dessa forma, verifica-se como um ponto importante testar no equipamento DLS os componentes individuais, que compõem a matriz de produção da AgNPs, para avaliação do que é realmente uma nanopartícula ou um agregado e de que forma esses componentes poderiam interferir no resultado das AgNPs. Foram analisadas amostras, que possuem apenas a matéria-prima em questão, conforme Quadro 10.

Quadro 10 - Soluções em concentrações típicas encontradas na matriz de fabricação das AgNPs para avaliação da seletividade de detecção pelo espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Item	Identificação	Produto:	Concentração
1	AGN1	AgNO <sub>3</sub>	1 ppm
2	AGN100	AgNO <sub>3</sub>	100 ppm
3	AGN01M	AgNO <sub>3</sub>	0.1M
4	AGCIT01	Citrato-3Na	0,02%
5	AGCIT02	Citrato-3Na	0,05%
6	AGCMC01	CMC-r	0,15%
7	AGCMC02	CMC-r	0,30%
8	AGPVP01	PVP-K30	0,05%
9	AGPEG01	PEG 6000	0,10%
10	BSA20	BSA	20 µg/mL

Legenda: Onde: Citrato-3Na, citrato de sódio; CMC-r, carboximetil celulose; PVP-K30, polivinilpirrolidona (peso molecular 40.000 a 80.000 g/mol); PEG 6000, polietilenoglicol (peso molecular 6000 g/mol); BSA, Albumina de Soro Bovino.

Fonte: (O autor, 2021).

### 3.2.4 Potencial Zeta (PZ)

As células zeta devem ser enxaguadas abundantemente antes do uso. Como as células zeta têm duas portas, é recomendável lavar com no mínimo 1 mL de água, ultrapura tipo 1, através de cada porta, para enxaguar completamente cada eletrodo, o que pode ser alcançado usando uma seringa descartável de 1 mL, após rinsar com etanol.

As amostras foram diluídas 10 vezes com água ultrapura tipo 1.

A análise de PZ foi realizada introduzindo 1 mL das amostras diluídas na célula. Após o equilíbrio a uma temperatura de 20 °C por 2 min, cinco medições foram realizadas usando 12 repetições de 10 s cada.

### 3.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

### 3.2.5.1 *Preparo das grades de cobre (Cu) com revestimento de Formvar*

Foram utilizadas grades de Cu com malha de 400 mesh com revestimento de filme de Formvar, que é uma resina de polivinil formal produzida pela empresa Monsanto Chemical Company e no TEM serve como suporte das grades para aderir o material a ser analisado. Para preparo do revestimento foi utilizado uma solução de 0,5% de Formvar em clorofórmio. Um bureta de coluna cromatográfica (adaptada) foi utilizada para preencher de forma uniforme as lâminas de vidro com a solução de Formvar 0,5%. Posteriormente, a solução foi drenada da bureta numa vazão de escoamento constante, conforme Figura 34.

Figura 34 – Bureta para preenchimento uniforme do Formvar na lâmina de vidro



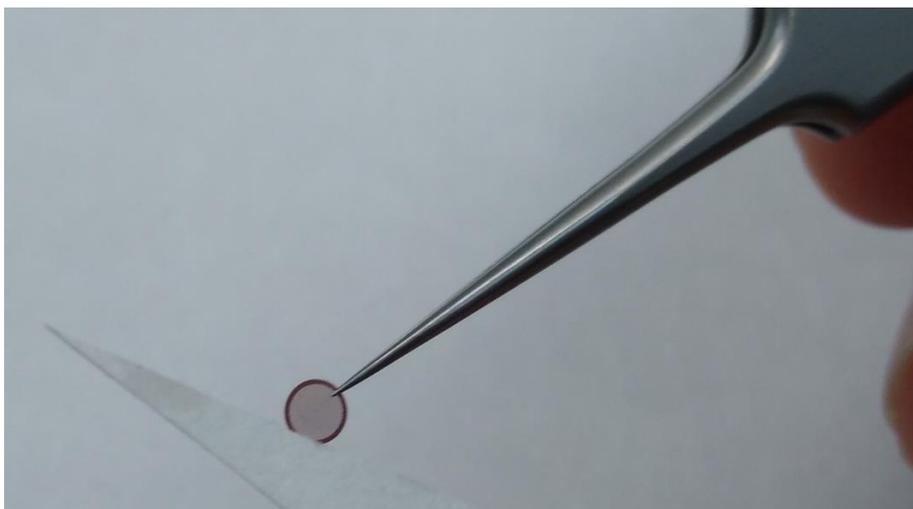
Fonte: (O autor, 2021).

Após secagem da solução de Formvar na lâmina de vidro, uma película (filme) de Formvar foi formada. Em seguida, o filme de Formvar foi destacado da lâmina de vidro e as grades foram cuidadosamente depositadas sobre o filme.

#### 3.2.5.2 *Preparo da amostra*

Para preparo da amostra, adicionou-se 10,0  $\mu\text{L}$  da amostra sobre a grade (grid) revestida com película de Formvar em uma lâmina de vidro, deixando a gota formada sobre o grid por 30 minutos. Depois, com o auxílio de uma pinça, as grades foram cuidadosamente secas com papel filtro para retirada do excesso de líquido, conforme Figura 35.

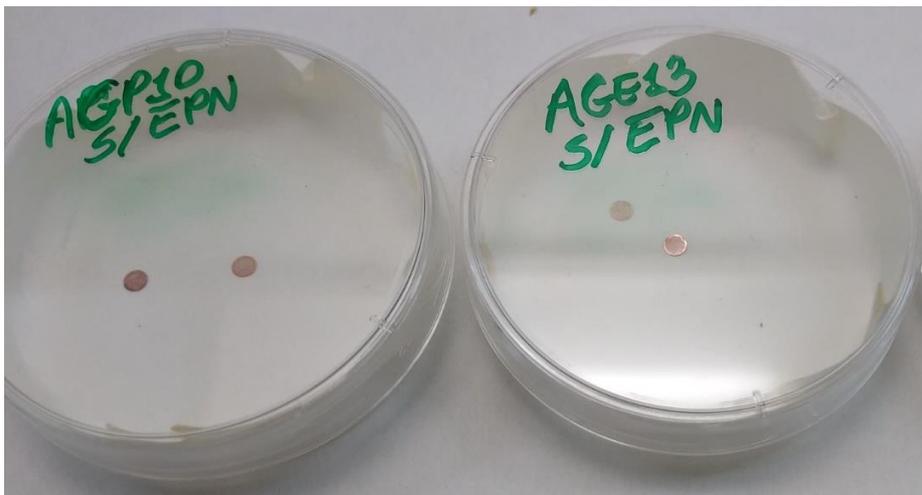
Figura 35 - Secagem do excesso de líquido na grade



Fonte: (O autor, 2021).

Após esta etapa, todas as grades foram alocadas em placa de petri para secagem por no mínimo 24 horas a temperatura ambiente, conforme Figura 36.

Figura 36 – Grades de cobre após impregnação da amostra



Legenda: Amostras de nanopartículas (AgNPs) produzidas e devidamente impregnadas nos grids, aguardando secagem; Onde: AGP10 (lote de AgNP plasmônica) e AGE13 (lote de AgNP método eletroquímico).

Fonte: (O autor, 2021).

### 3.2.5.3 Observação das amostras no TEM JEOL JEM-1011

Com as grades devidamente preparadas e identificadas, procedeu-se a observação das amostras no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM-1011 (Figura 37), operando a 80 kV de tensão de aceleração. Imagens foram obtidas com uma câmera digital Gatan Orius.

Figura 37 - Microscópio Eletrônico JEOL JEM-1011



Plataforma de Microscopia - IOC/Fiocruz.  
Fonte: (O autor, 2021).

### 3.3 Citotoxicidade das AgNPs

#### 3.3.1 Ensaio MTT

Foram utilizadas as células de linhagem celular CHO (células de ovário de hamster chinês).

O sobrenadante de cultivo das células CHO foi desprezado e adicionado 10 ml, quantidade suficiente do meio de cultura (ExpiCHO™ Expression Medium) sem adição de antibiótico e antimicótico, conforme orientação do fabricante. O meio de cultivo não contém qualquer componente de origem animal. Para suspensão das células foram feitas lavagens com 10 ml de meio para posterior coleta de uma alíquota para contagem celular.

Após o preparo da suspensão celular, as estimativas da concentração e do percentual de células viáveis foram realizadas por meio de contagem de células, em câmara de Neubauer, utilizando solução de corante Azul de Tripán 0,4% (Invitrogen Trypan Blue). As células capazes de captar o corante são consideradas inviáveis, devido à perda de seletividade da membrana, permitindo, desta forma, estimar a viabilidade através da razão entre células viáveis e não viáveis, após a contagem.

Foram inoculadas  $5 \times 10^5$  células CHO em 100  $\mu\text{L}$  de meio ExpiCHO™ por poço em placa de 96 poços de fundo chato. As amostras-teste no volume de 100  $\mu\text{L}$ /poço foram em seguida adicionadas totalizando um volume final 200  $\mu\text{L}$  e concentração final das células:  $2,5 \times 10^6$  células/mL. As placas de cultura foram incubadas em estufa a 37° C com 8% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Como mostrado no Quadro 11, as amostras no primeiro nível (linha B) em triplicata foram testadas sem diluição e a cada nível abaixo (linhas C a G) diluídas 2X sequencialmente (diluições 2X a 32X), com tampão fosfato (PBS). Os controles de viabilidade e morte celular foram verificados em culturas em triplicata nos poços contendo somente células e em células tratadas com DMSO 3%, respectivamente. O branco do ensaio constituído apenas de meio e PBS, sem adição de células (100  $\mu\text{L}$  PBS + 100  $\mu\text{L}$  do meio usado para o cultivo celular) foi adicionado a cada um dos 6 poços da coluna 11. Os poços ao redor de toda placa foram adicionados com água para evitar a evaporação durante incubação na estufa.

Quadro 11 – Esquema de configuração do teste MTT em placa de 96 poços com amostras de prata em triplicata

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
B	H <sub>2</sub> O	Amostra Ag+ 10 ppm	Amostra Ag+ 10 ppm	Amostra Ag+ 10 ppm	Amostra V13 20 ppm	Amostra V13 20 ppm	Amostra V13 20 ppm	Ctrl Morte	Ctrl Morte	Ctrl Morte	Branco	H <sub>2</sub> O
C	H <sub>2</sub> O	Dil. 2X	Ctrl Morte	Ctrl Morte	Ctrl Morte	Branco	H <sub>2</sub> O					
D	H <sub>2</sub> O	Dil. 4X	Ctrl Morte	Ctrl Morte	Ctrl Morte	Branco	H <sub>2</sub> O					
E	H <sub>2</sub> O	Dil. 8X	Ctrl Viab.	Ctrl Viab.	Ctrl Viab.	Branco	H <sub>2</sub> O					
F	H <sub>2</sub> O	Dil. 16X	Ctrl Viab.	Ctrl Viab.	Ctrl Viab.	Branco	H <sub>2</sub> O					
G	H <sub>2</sub> O	Dil. 32X	Ctrl Viab.	Ctrl Viab.	Ctrl Viab.	Branco	H <sub>2</sub> O					
H	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

Legenda: Onde: Ag<sup>+</sup> corresponde à amostra testada sob a forma de AgNO<sub>3</sub> (B2, B3 e B4) e V13 corresponde à amostra de nanopartículas de prata, AgNP-B-BSA (B5, B6, B7), com 5 níveis de diluição sequencial de 2X em PBS; Ctrl Morte - controle para verificação de morte celular (DMSO 3%), Ctrl viab.: controle de viabilidade celular (células+meio) e branco (meio+PBS).

Fonte: (O autor, 2021).

As amostras que foram testadas foram o íon prata (Ag<sup>+</sup>) sob a forma de nitrato de prata na faixa de concentrações (0,31 a 10 ppm), AgNP-B-BSA lote: AGBOR05BSAV13 (0,63 a 20 ppm) e Sn@Ag lote: SN@AGBOR05V14 (0,63 a 20 ppm).

Posteriormente, ao período de tratamento de 24h foram adicionados a todos os poços da placa, 22,5 µl de solução de {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (MTT) com concentração de 5 mg/mL seguido de incubação por 4 h em estufa a 37°C e 8% de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação, as placas foram centrifugadas por 3 minutos a 2800 rpm, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 150 µl/poço de DMSO 3%.

A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro em densidades ópticas (DO) em 540 nm. Quanto mais intensa a coloração e próxima ao controle de viabilidade celular significa que a amostra testada não apresenta toxicidade para as células testadas.

Os experimentos foram realizados em triplicata para cada nível de concentração e em dois dias independentes. Os valores médios de DO foram analisados estatisticamente e por análise gráfica. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 9.00. Utilizou-se *One-way ANOVA* e como teste de comparações múltiplas entre os grupos e o teste de hipótese de Newman-Keuls ao nível de significância de 0,05.

### 3.4 Controle Sanitário

Com o objetivo de averiguar o risco de possíveis consumidores estarem consumindo prata coloidal sem a devida segurança sanitária, foram adquiridos três produtos comercializados como prata coloidal sendo que um deles foi importado por compra na internet, conforme Figura 38.

Figura 38 – Marcas de prata coloidal adquiridas para análise



Fonte: (O autor, 2021).

Realizamos os ensaios básicos de controle do teor de AgNPs, teor de Ag<sup>+</sup>, pH, tamanho por DLS e PZ.

### 3.5 Estabilidade das AgNPs

#### 3.5.1 Estabilidade ao congelamento

Realizamos um ciclo de congelamento a -80 °C por 7 dias, para verificar a influência do congelamento nas amostras de AgNPs.

As amostras utilizadas no estudo estão descritas na Tabela 13 e terão seu espectro UV-VIS analisados antes e após o congelamento, assim como seu aspecto visual.

Tabela 13 – Identificação das amostras utilizadas no experimento de congelamento a -80 °C por 7 dias

Código amostra	Identificação da Amostra	Temperatura	Nº de Ciclos de Congelamento
1.1	Padrão de AgNP 10 nm	2 – 8 °C	NA
1.2	Padrão de AgNP 10 nm	- 80 °C por 7 dias	1
2.1	Padrão de AgNP 20 nm	2 – 8 °C	NA
2.2	Padrão de AgNP 20 nm	- 80 °C por 7 dias	1
3.1	Padrão de AgNP 40 nm	2 – 8 °C	NA
3.2	Padrão de AgNP 40 nm	- 80 °C por 7 dias	1
4.1	Padrão de AgNP 60 nm	2 – 8 °C	NA
4.2	Padrão de AgNP 60 nm	- 80 °C por 7 dias	1
5.1	Padrão de AgNP 100 nm	2 – 8 °C	NA
5.2	Padrão de AgNP 100 nm	- 80 °C por 7 dias	1
6.1	Amostra AgNP L: AGBOR05BSAV13	2 – 8 °C	NA
6.2	Amostra AgNP L: AGBOR05BSAV13	- 80 °C por 7 dias	1
7.1	Amostra AgNP L: SN@AGBOR05V14	2 – 8 °C	NA
7.2	Amostra AgNP L: SN@AGBOR05V14	- 80 °C por 7 dias	1
8.1	Amostra AgNP L: AGBOR05AROEV15	2 – 8 °C	NA
8.2	Amostra AgNP L: AGBOR05AROEV15	- 80 °C por 7 dias	1

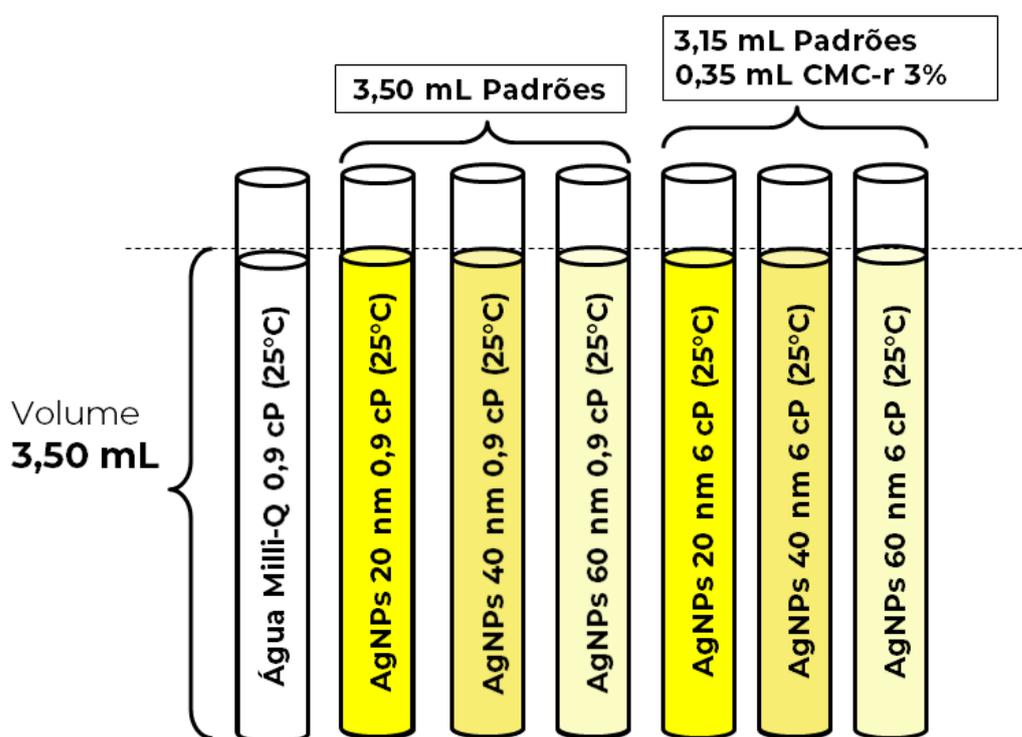
Legenda: NA, Não aplicável: a amostra não foi congelada.

Fonte: (O autor, 2021).

### 3.5.2 Estabilidade da sedimentação das AgNPs

Foram adicionadas, em cada tubo de ensaio com tampa, 3,50 ml de padrão de AgNPs nos tamanhos de 20, 40 e 60 nm (viscosidade media medida 0,9 cP a 25 °C). Ao mesmo tempo, foram repetidas as mesmas adições, em tubos de ensaio com tampa, adicionando-se em cada tubo 0,35 ml de solução a 3 % de CMC-r com consequente homogeneização (viscosidade media medida de 6 cP a 25 °c), conforme figura 39. Os tubos ficaram em local estático, protegidos da luz e em temperatura ambiente. foram fotografados digitalmente nos tempos: t0, t15, t30 e t60 dias.

Figura 39 – Desenho experimental do estudo de estabilidade da sedimentação das AgNPs



Legenda: Onde: cP, viscosidade a 25°C em centipoise; CMC-r, solução de carboxi metil celulose 3%; após a adição de CMC-r a viscosidade final das soluções de padrão de AgNPs passou de 0,9 cP para 6 cP.

Fonte: (O autor, 2021).

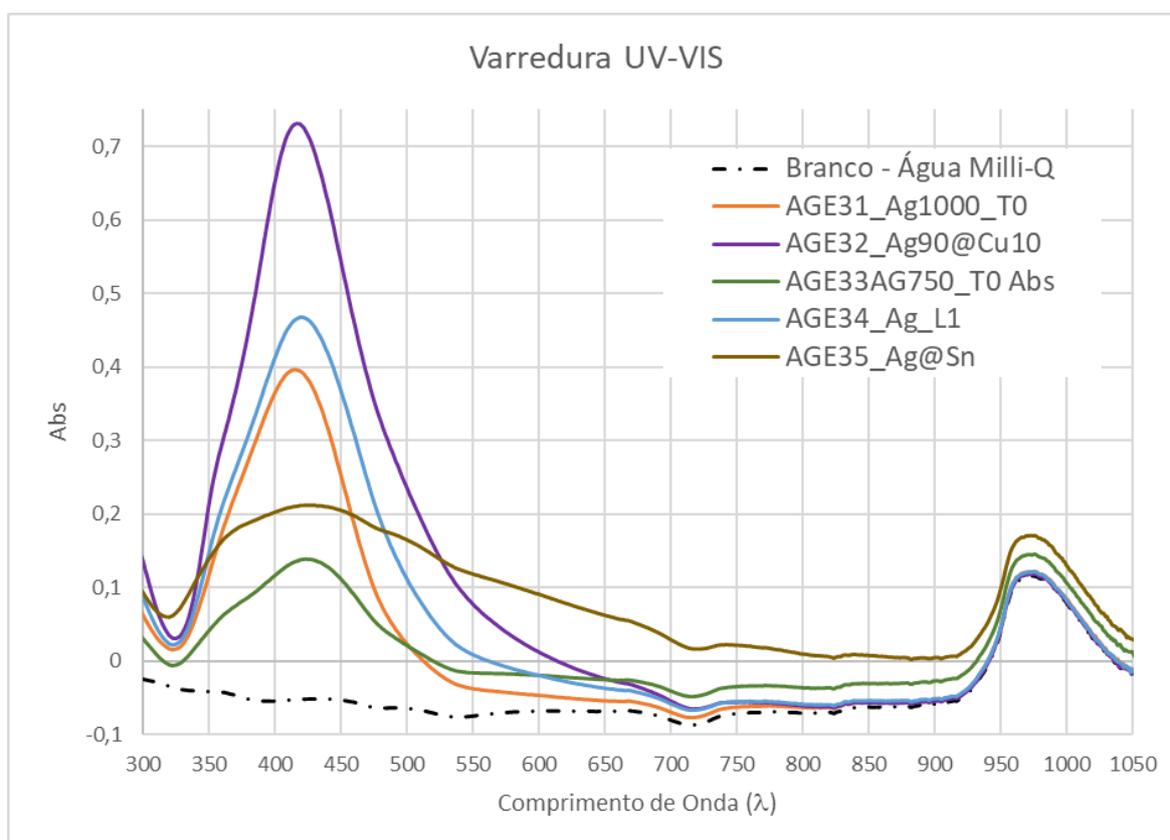
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese das AgNPs

#### 4.1.1 Síntese eletroquímica

Foram realizadas análise de varredura UV-VIS nas amostras AGE31, AGE32, AGE33, AGE34 e AGE35, conforme Figura 40.

Figura 40 – Espectroscopia de UV-VIS das amostras produzidas pela síntese eletroquímica



Legenda: Onde: AGE31 (eletrodos de Ag 1000), AGE32 (eletrodos de Ag 900), AGE33 (eletrodos de Ag 750), AGE34 (eletrodos de Ag 950 com cobre e germânio) e AGE35 (eletrodos de Ag 1000 e Sn 1000).

Fonte: (O autor, 2021).

Estas amostras foram produzidas no dia 16/07/2020 e culminou com o ápice da pandemia. Neste momento, todos os laboratórios parceiros estavam com atividades suspensas. Dessa forma, não foi possível realizar as análises de DLS, PZ, TEM, e quantificação por ICP-OES de AgNP e Ag<sup>+</sup>.

As primeiras amostras produzidas pelo método eletroquímico apresentaram níveis de PDI relativamente altos nas amostras produzidas. Provavelmente pela falta de homogeneização durante o processo de síntese e pela corrente aplicada ao sistema, logo fica necessário diminuir a corrente e aumentar a velocidade de homogeneização. Quanto menor a corrente aplicada ao sistema menor é a velocidade de nucleação e menor será o tamanho produzido das AgNPs.

Com relação à voltagem, a mesma é necessária para “quebrar” a resistência do sistema e conseguir gerar a corrente. Para ilustrar, vamos supor o seguinte exemplo: Qual a voltagem necessária para conduzir uma corrente de 10 mA na eletrólise de uma solução contendo apenas água ultrapura tipo 1, com um par de eletrodos de prata 1000 separados por uma distância de 1 cm? Temos que a resistência da água é 18,2 M $\Omega$ .cm (18.200.000 ohm). Aplicando-se a 1<sup>o</sup> lei de Ohm (equação 23), temos:  $V = 18200000 \times 0,01 = 182.000$ , logo seriam necessários 182.000 Volts para romper essa resistência da água ultra pura tipo 1. Fica muito claro o quanto é necessário diminuir a resistência da água com a adição de agentes que irão aumentar a condutividade. A Figura 60 mostra o aumento da condutividade da água ultrapura tipo 1 em função de volumes (em  $\mu$ L) de 3 soluções eletrolíticas para romper a resistividade da água que é inversamente proporcional a condutividade.

O KNO<sub>3</sub> 0,1M apresentou excelente estabilidade para o processo eletroquímico e após permitir o início da eletrólise acaba sendo reduzido a N<sub>2</sub> conforme equações 15 e 16. O Borax não deve ser adicionado durante a eletrólise pois observou-se a formação de um precipitado branco nos eletrodos tanto no anodo como no catodo dificultando o processo. Somente após o término da eletrólise é que o mesmo deve ser adicionado.

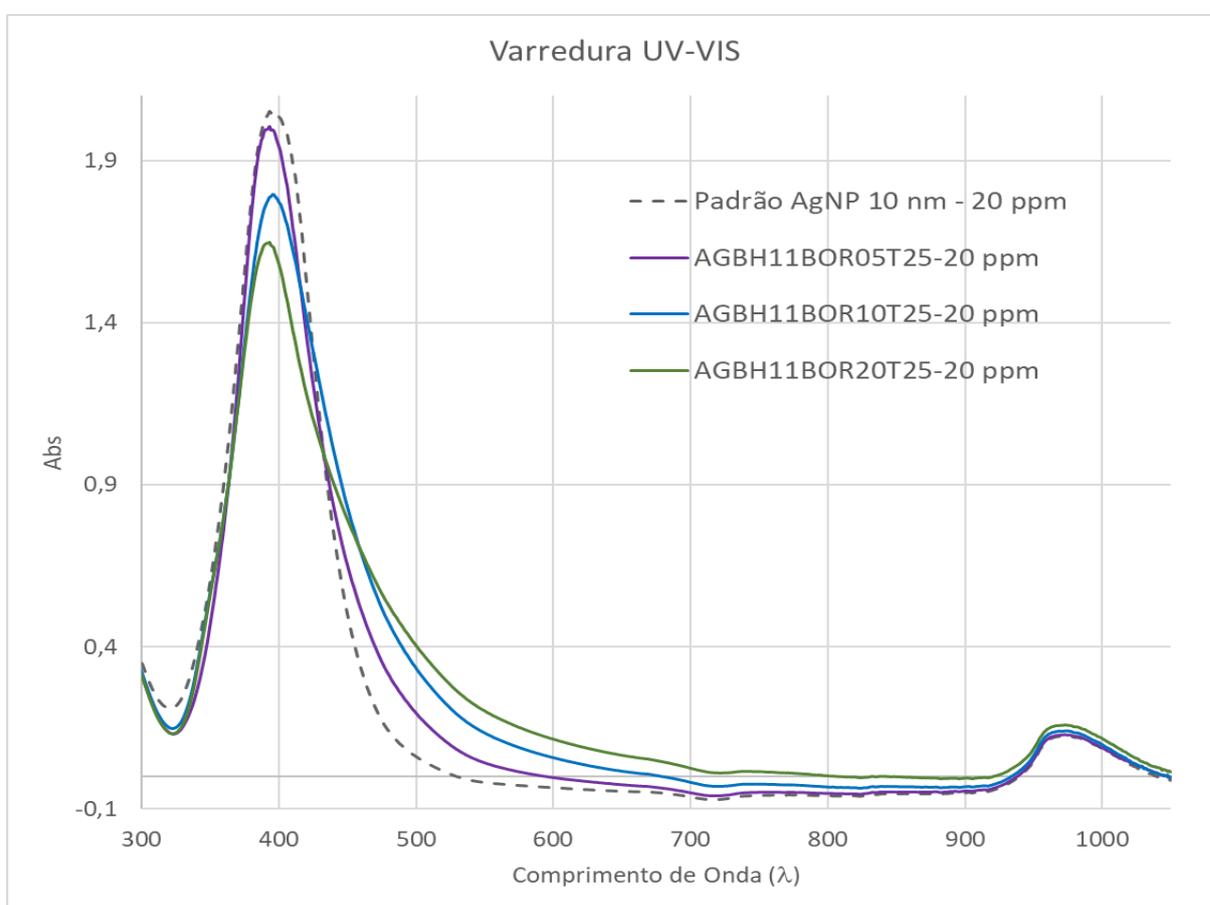
Quando falamos de processo eletroquímico, é necessário ter em mente as leis da eletrólise estabelecidas pelo físico-químico Michael Faraday onde a massa da substância eletrolisada em qualquer dos elementos é diretamente proporcional à quantidade de carga elétrica que atravessa a solução (EHL; IHDE, 1954).

Além da corrente aplicada, para que os elétrons sejam conduzidos e concluam o circuito eletrolítico é necessário que a solução apresente uma condutividade adequada para concluir a eletrólise. Devido à perda de água por evaporação, ao final da formulação e após resfriamento até a temperatura 20°C, a mesma deve ser avolumada em balão volumétrico adequado ao volume produzido. Esse procedimento é aplicável a todas as amostras produzidas mesmo por outros métodos.

#### 4.1.2 Síntese com Borohidreto e Borax

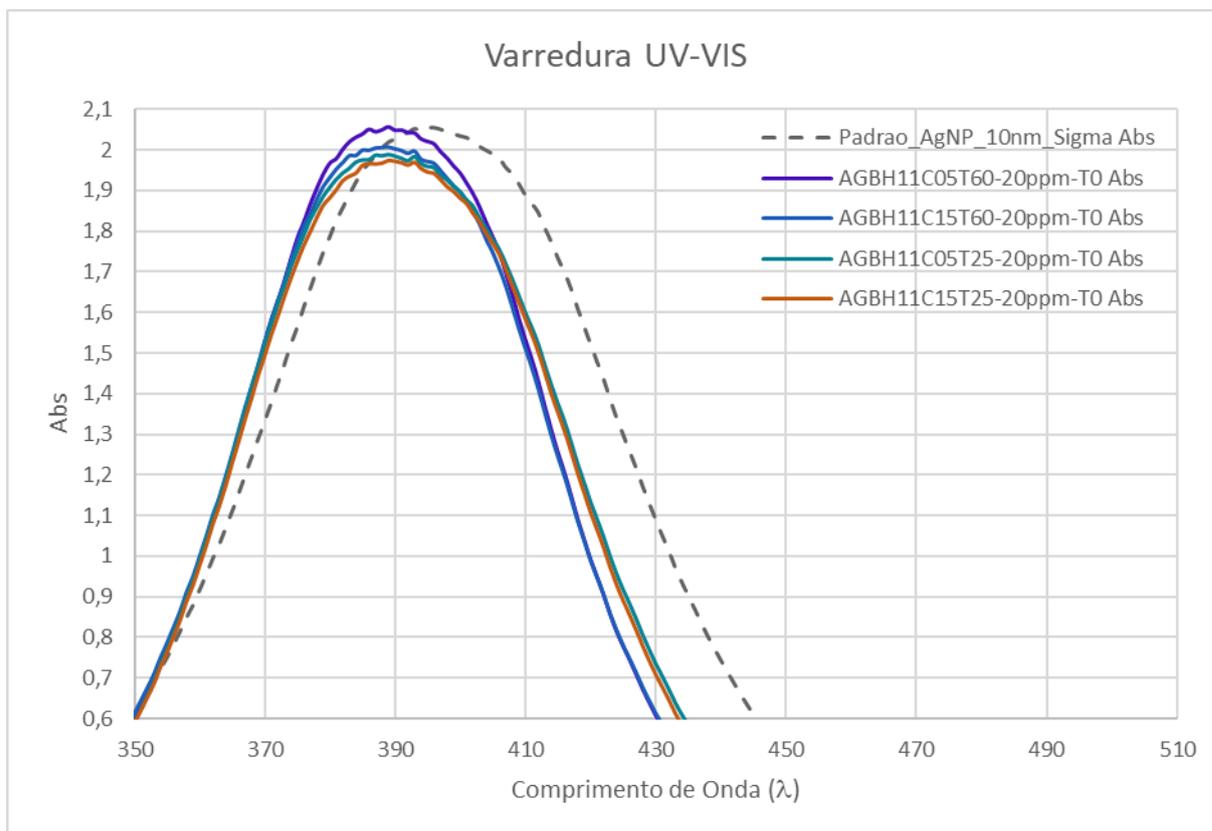
Foram realizadas sínteses com borohidreto utilizando como agente protetor o citrato e o borax. A Figura 41 mostra a varredura UV-VIS nas amostras de BH4 tendo o borax como agente protetor e na Figura 43, as amostras de BH4 com citrato.

Figura 41 – Espectros UV-VIS das sínteses de borohidreto com borax como agente protetor



Legenda: Com os respectivos lotes indicados na legenda, todos na concentração mássica de 20 ppm. A linha pontilhada representa o padrão de AgNP de 10 nm na concentração mássica de 20 ppm. Fonte: (O autor, 2021).

Figura 42 – Espectros UV-VIS das sínteses de borohidreto com citrato como agente protetor



Legenda: Com os respectivos lotes de nanopartículas de prata (AgNPs) indicados na legenda, todos na concentração mássica de 20 ppm. A linha pontilhada representa o padrão de AgNP de 10 nm na concentração mássica de 20 ppm.

Fonte: (O autor, 2021).

Na Figura 41 é possível notar que a formulação AGBH11BOR05T25 (relação molar borax:Ag = 0,5) apresentou maior proximidade do padrão de AgNP 10 nm mesmo na temperatura de 25°C. Já nas amostras com teor de borax de 1,0 e 2,0, houve uma diminuição no pico na região dos 400 nm, porém houve um aumento na região do infravermelho.

Com relação ao citrato, é possível perceber na Figura 42 que o aquecimento de 60°C favorece o aumento do pico na região dos 400 nm indicando uma melhor eficiência do processo e que a amostra AGBH11C05T60 (relação molar citrato:Ag = 0,5) apresentou absorção semelhante a do padrão de AgNP 10 nm, com o pico mais deslocado a esquerda indicando possivelmente um tamanho menor que 10 nm.

Estas amostras também foram fabricadas no ápice da pandemia e não foi possível avaliar os outros parâmetros de controle.

#### 4.1.3 Síntese verde com Aroeira

A síntese com aroeira apresentou grande facilidade de produção e os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados físico-químicos das AgNPs com extrato de folhas de aroeira pimenteira rosa

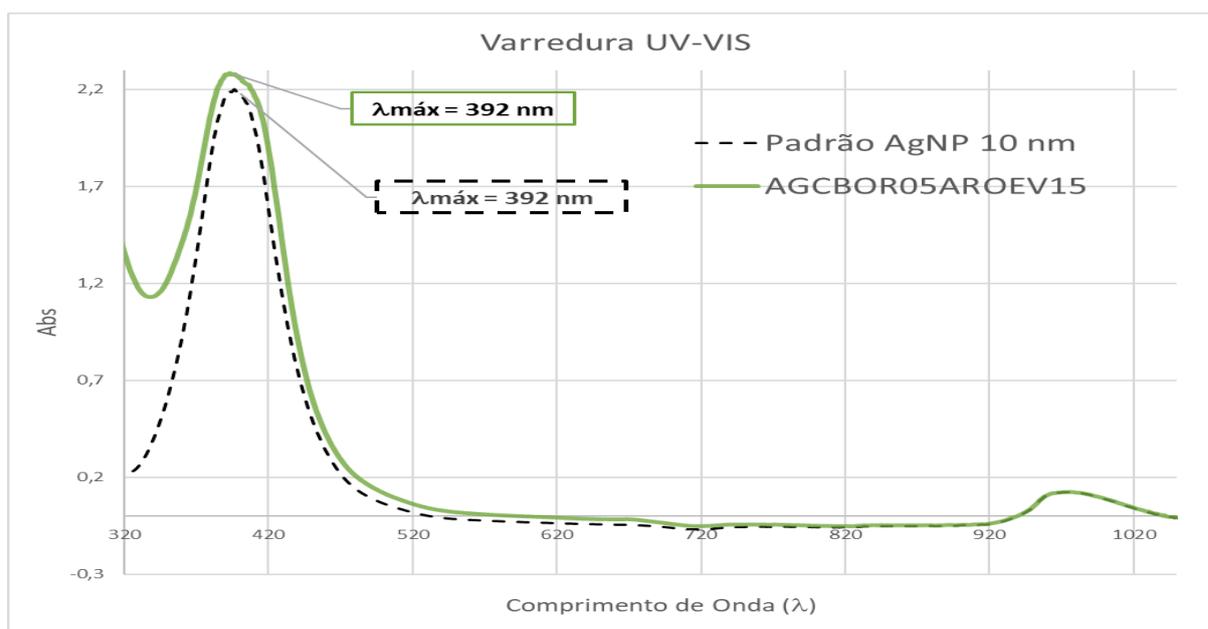
Produto	Conc Ag Total (ppm)	Conc AgNP (ppm)	Conc. Ag+ (ppm)	Tamanho			
				Médio (nm) DLS	Zeta (mV)	PDI	pH
AGCB0R05AROEV15	20,01	19,91	< 0,033	15,57	-41,2	0,296	9,0

Legenda: DLS, espalhamento dinâmico da luz; PDI, índice de polidispersão.

Fonte: (O autor, 2021).

A formulação apresentou excelente estabilidade e seu espectro UV-VIS é praticamente semelhante com o padrão de AgNPs 10 nm conforme mostrado na Figura 43, tendo como diferente apenas a região do ultravioleta (UV) devido aos compostos orgânicos do extrato de aroeira.

Figura 43 - Espectro UV-VIS da síntese de borohidreto com borax e aroeira



Legenda: Na concentração mássica de 20 ppm. A linha pontilhada representa o padrão de AgNP de 10 nm na concentração mássica de 20 ppm.

Fonte: (O autor, 2021).

A amostra apresentou população homodispersa, com baixo teor de íon prata, pH adequado, e resistência ao congelamento conforme item 4.5.2 (Figura 61), tamanho de 15,6 nm, valor de PZ -41,2 mV (alto) o que garante excelente estabilidade elétrica.

Esta formulação apresenta excelente estabilidade eletroestérica (elétrica + estérica).

#### 4.1.4 Síntese de AgNPs plasmônicas

Estas formulações não seriam adequadas para uso biológico. Seu uso estaria voltado para catálise ou para desenvolvimento de revelação de imunocomplexos antígeno-anticorpo para o desenvolvimento de kit de diagnósticos.

As formulações apresentaram alto teor de íon prata livre, e o valores de PDI alto. Os resultados são apresentados na Tabela 15.

Como mencionado na introdução vários autores atribuem um maior poder bactericida das AgNPs com maior número de faces {111}, que são os nanopratos triangulares ou hexagonais aqui produzidos. Porém, deixamos um questionamento para futuras pesquisas: esse maior poder bactericida está realmente relacionado as faces {111} ou ao alto teor de Ag<sup>+</sup> livre decorrente do processo produtivo destas partículas? Para a correta comparação do poder bactericida das AgNPs em formato de nanopratos com as AgNPs de formato esférico, seria necessário separar este íon prata das mesmas.

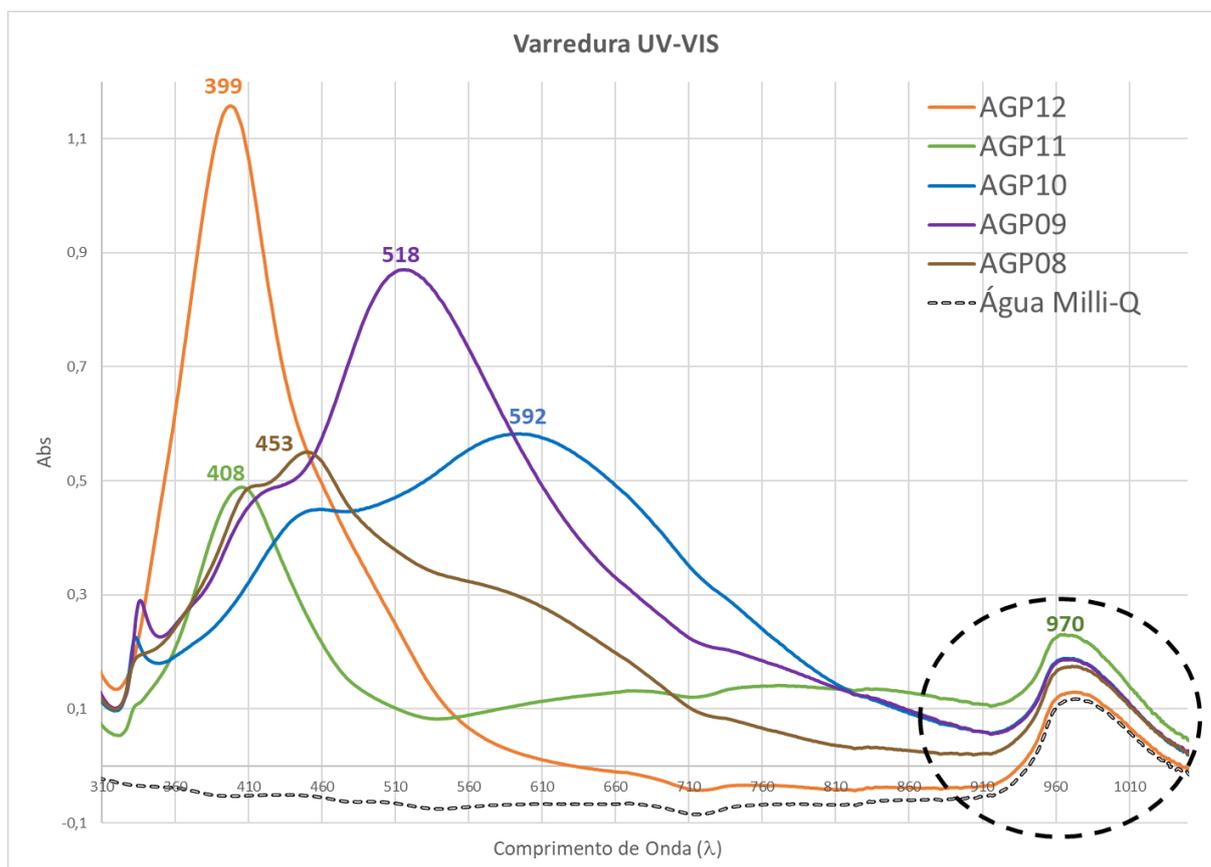
Tabela 15 – Resultados físico-químicos das amostras de prata plasmônica

Produto	COR	Conc Ag Total (ppm)	Conc AgNP (ppm)	Conc. Ag+ (ppm)	Tamanho	Zeta (mV)	PDI	pH
					Médio (nm) DLS			
AGP08	Marrom	9,46	2,50	6,97	53,4	-50,7	0,850	9,05
AGP09	Violeta	12,16	3,86	8,30	80,5	-56,7	1,000	8,85
AGP10	Azul	10,55	2,73	7,82	70,5	-47,8	1,000	9,10
AGP11	Verde	6,81	1,86	4,95	84,7	-46,4	0,722	8,90
AGP12	Laranja	12,49	1,03	11,46	57,2	-65,7	0,740	8,92

Fonte: (O autor, 2021).

Os espectros de UV-VIS, apresentados na Figura 44, mostram a RPS marcadamente diferente neste tipo de amostra em comparação com as AgNPs de formato esférico.

Figura 44 - Varredura de UV-VIS das amostras de prata plasmônicas



Legenda: Com os respectivos lotes: AGP08, AGP09, AGP10, AGP11 e AGP12. O gráfico mostra os diferentes perfis e comprimento máximo para cada cor de AgNP plasmônica. O círculo pontilhado chama atenção para o aumento de energia de absorção do infravermelho.

Fonte: (O autor, 2021).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) são frequentemente utilizadas como biossensores em marcadores biológicos e, também, em kit de diagnósticos. As nanopartículas de prata (AgNPs) podem ser convertidas em nanopratos triangulares ou hexagonais. Estes nanopratos possuem capacidade de absorver e dispersar fortemente a luz em comprimentos de onda específicos, produzindo ondas densas de elétrons que são chamadas de plásmons. Os nanopratos de prata podem possuir um amplo leque de colorações e podem ser utilizados como biossensores em substituição às AuNPs ou em novas pesquisas de kit de diagnósticos. Neste sentido, o desenvolvimento deste insumo para revelação de imunocomplexos antígeno-

anticorpo e, prioritariamente, utilização na plataforma de imunocromatografia de fluxo lateral teria uma grande importância estratégica para o desenvolvimento de novos kits de diagnósticos de Bio-manguinhos em parceria com o LATED/Bio-manguinhos.

#### 4.1.5 Síntese e AgNPs bi-metálicas Sn@Ag

A síntese da partícula bimetálica com núcleo de Sn e Camada de Ag ocorreu com sucesso e os resultados são apresentados na Tabela 16.

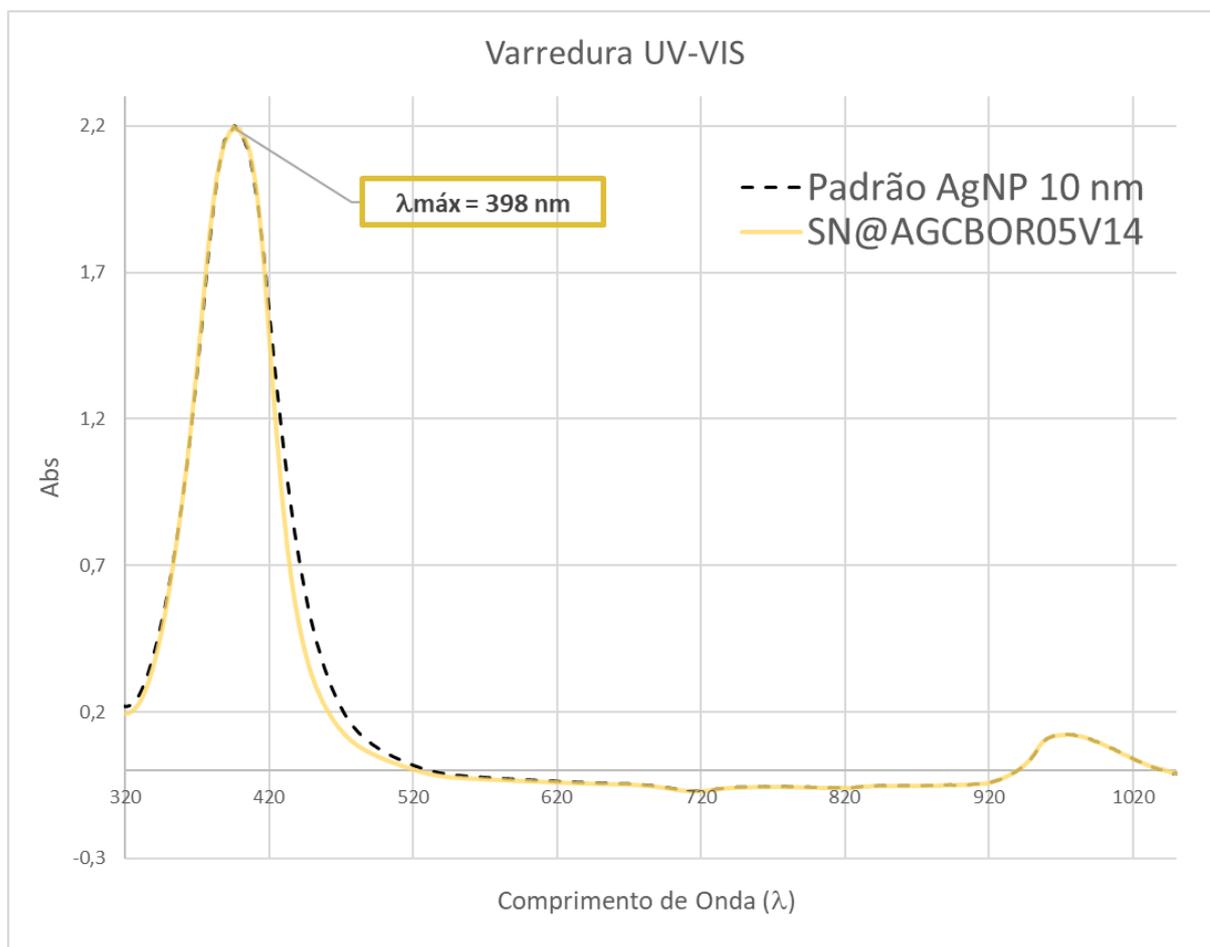
Tabela 16 – Resultados físico-químicos da AgNP bi-metálica de Sn@Ag

<b>Produto</b>	<b>Conc Ag Total (ppm)</b>	<b>Conc AgNP (ppm)</b>	<b>Conc. Ag+ (ppm)</b>	<b>Tamanho Médio (nm) DLS</b>	<b>Zeta (mV)</b>	<b>PDI</b>	<b>pH</b>
SN@AGBORO5V14	19,86	19,67	< 0,033	14,8	-31,0	0,294	9,3

Fonte: (O autor, 2021).

A população da amostra foi homodispersa, de baixo teor de íon prata cerca de 190 ppb de Ag<sup>+</sup> livre e PZ de -31,0 mV o que garante boa estabilidade. O espectro de absorção ficou praticamente igual ao do padrão de AgNP 10 nm, conforme Figura 45.

Figura 45 - Espectro UV-VIS da síntese core-shell de Sn@Ag



Legenda: Na concentração mássica de 20 ppm. A linha pontilhada representa o padrão de AgNP de 10 nm na concentração mássica de 20 ppm.

Fonte: (O autor, 2021).

## 4.2 Caracterização das AgNPs

Nas caracterizações das AgNPs realizadas ficou evidente a importância dos métodos físico-químicos. Através deles foi possível inferir sobre a estrutura, a forma, os teores de AgNPs e de  $\text{Ag}^+$ , tamanho médio das partículas e distribuição (homodispersa ou polidispersa). Tais características influenciam diretamente na atividade biológica, farmacológica, farmacocinética, bem como na toxicologia das AgNPs. A investigação físico-química é a base para a segurança de uso. Além disso, fornece dados para pesquisa de novos usos e para desvendar o mecanismo de ação das AgNPs juntamente com todo seu potencial.

## 4.2.1 Quantificação por ICP-OES

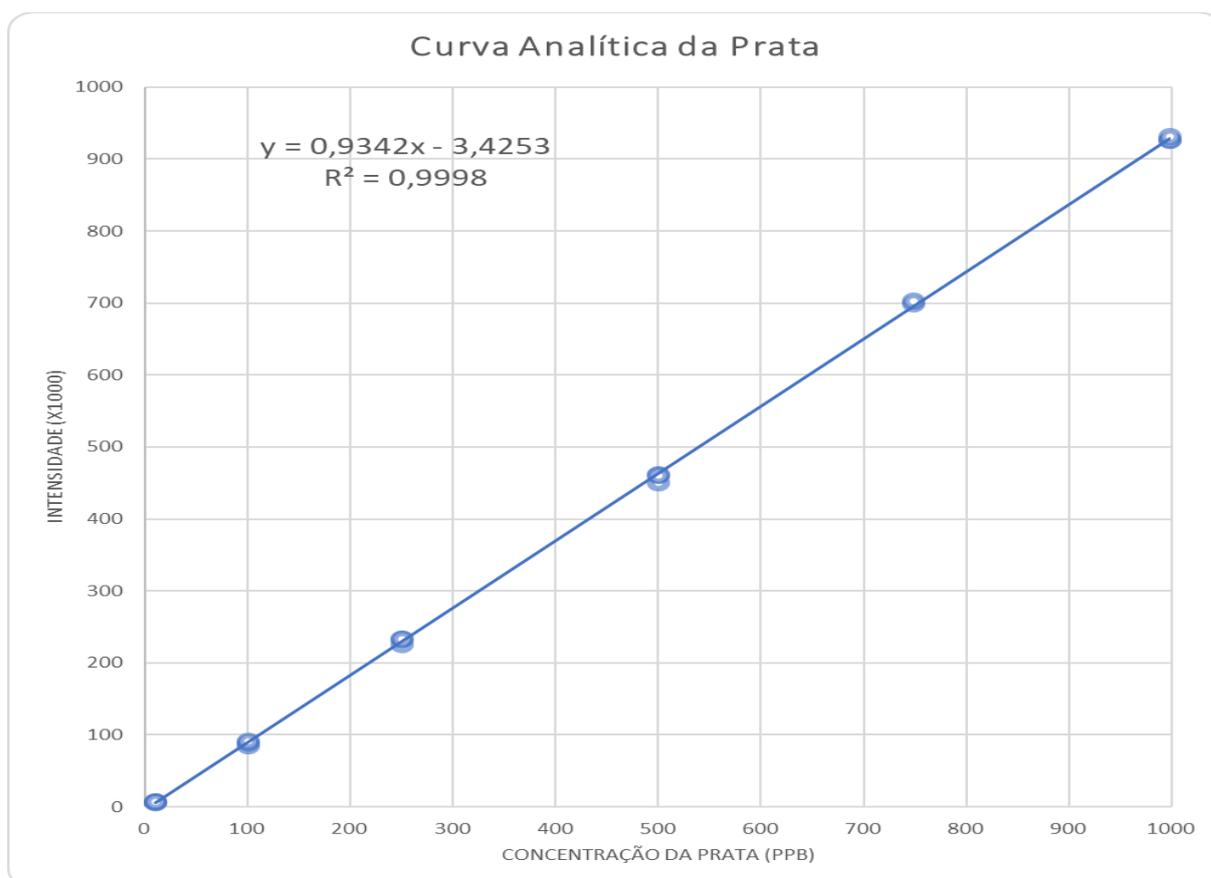
### 4.2.1.1 Validação da metodologia

#### 4.2.1.1.1 Linearidade

##### 4.2.1.1.1.1 Tratamento de valores extremos (outliers)

A observação  $i=13$  foi considerada como *outlier* e foi removida do conjunto de dados para cálculo dos parâmetros estatísticos. A Figura 46 apresenta a curva analítica final após a remoção dos valores extremos.

Figura 46 – Curva analítica da concentração de prata em ppb versus a intensidade (K) x 1000



Fonte: (O autor, 2021).

##### 4.2.1.1.1.2 Teste de normalidade

A normalidade dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste Ryan-Joiner. O valor encontrado para o coeficiente de correlação  $R_{eq}$  de 0,9600 é maior do que o valor do  $R_{crit}$  0,9437 ( $n=17$  e  $\alpha=0,05$ ) e indica que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal.

#### 4.2.1.1.1.3 Teste de homoscedasticidade

Foi verificado a homoscedasticidade dos resíduos da regressão pelo teste de Levene (1960), modificado por Brown e Forsythe (1974). Os resultados são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados da homoscedasticidade dos resíduos da regressão pelo teste de Levene

Estatística	Grupo 1	Grupo 2
$n$	9	8
Mediana	1,25	-1,16
$dm$	2,14	3,98
$SQD$	73,90	226,26
$S_p^2$	20,01	
$t_L$	-0,845	
$t_{crítico}$	2,132	

Legenda: Dados calculados pela planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012). Onde:  $n$ , número de observações no grupo;  $dm$ , média das diferenças entre cada resíduo e a mediana do seu grupo;  $SQD$ , soma dos quadrados dos desvios;  $S_p^2$ , variância combinada;  $t_L$ , estatística t calculada;  $t_{crítico}$ , estatística t Tabelada.

Fonte: (O autor, 2021).

Como o valor encontrado para a estatística  $t_L$  é menor que o valor crítico a um nível de significância de 0,05, verificamos que os resíduos são homoscedásticos.

#### 4.2.1.1.1.4 Teste de Autocorrelação dos Resíduos (independência)

O teste de Durbin-Watson foi utilizado para avaliação da autocorrelação dos resíduos. Os resultados para os limites  $d_L$  e  $d_U$  com um nível de confiança de 95%, e o valor calculado para a estatística  $d$  do teste são apresentados na Tabela 18, e a

Figura 47 apresenta o gráfico de Durbin-Watson mostrando graficamente a independência dos resíduos da regressão.

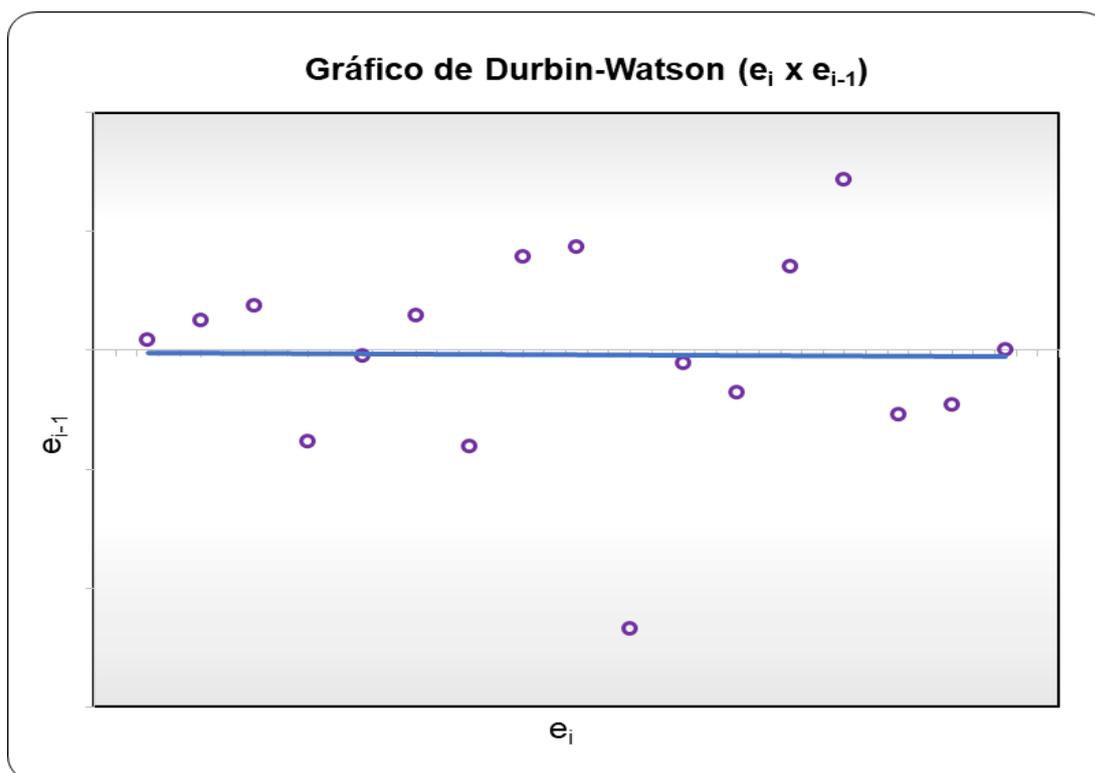
Tabela 18 - Resultados do teste de Durbin-Watson

<b>n</b>	17
<b><math>\alpha</math></b>	0,05
<b>d</b>	2,32
<b>d<sub>L</sub></b>	1,13
<b>d<sub>U</sub></b>	1,38

Legenda: Dados calculados pela planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012). Onde:  $n$ , número de observações;  $\alpha$ , é o nível de significância;  $d$ , estatística  $d$ ;  $d_L$ , limite inferior e  $d_U$ , limite superior.

Fonte: (O autor, 2021).

Figura 47 – Mostra os resíduos  $e_i$   $e_{i-1}$  obtidos no teste de Durbin-Watson



Fonte: (O autor, 2021).

O valor encontrado para a estatística  $d$  do teste de Durbin-Watson é maior que o limite superior, portanto, concluímos que existe a independência dos resíduos.

#### 4.2.1.1.1.5 Teste de significância da regressão

A significância do modelo de regressão linear foi verificada pela análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos no teste são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados da Análise da regressão e desvio da linearidade (ANOVA)

Fonte de Variação	GL	Soma dos Quadrados (SQ)	Média dos Quadrados (MQ)	F	p-Valor
Regressão	1	1,86x10 <sup>6</sup>	1,86x10 <sup>6</sup>	9,31x10 <sup>4</sup>	7,25x10 <sup>-30</sup>
Resíduo	15	3,00x10 <sup>2</sup>	2,00x10 <sup>1</sup>		
Falta de ajuste	4	1,36x10 <sup>2</sup>	3,41x10 <sup>1</sup>	2,29	0,125
Erro puro	11	1,64x10 <sup>2</sup>	1,49x10 <sup>1</sup>		
Total	16	1,86x10 <sup>6</sup>			

Legenda: Dados calculados pela planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012). Onde: GL, grau de liberdade; F, estatística da análise de variância; p-Valor, probabilidade da estatística calculada. Fonte: (O autor, 2021).

O resultado do p-Valor da regressão foi  $7,25 \times 10^{-30}$  foi inferior a 0,001 confirmando a hipótese de que a regressão é significativa, com um nível de confiança de 99,9%. Com relação ao desvio da linearidade o p-Valor foi 0,125, (valor maior que 0,05) existe evidência estatística que prova que a falta de ajuste ao modelo linear não é significativa, com um nível de significância de 0,05.

#### 4.2.1.1.2 Seletividade e Recuperação

Foram avaliadas 2 amostras para recuperação, que foram preparadas conforme item 3.2.1.3. As amostras foram analisadas sem *spike* (fortificação) e um outro preparo foi feito com o *spike* (fortificação) de 500 ppb de prata + 500 ppb de cobre. A Tabela 20 mostra os resultados obtidos e a recuperação alcançada para cada amostra fortificada.

Tabela 20 – Resultado das concentrações obtidas nas amostras fortificadas com sua respectiva recuperação

Amostra	Intensidade Corrigida (k)	DPR(%)	Conc Ag (ppb)	FD	Recuperação (%)
AGCBOR05V13	371,0	1,50	400,8	50	
AGCBOR05V13 + Spike 500 ppb Ag + 500 ppb Cu	822,1	0,38	883,6	50	96,8
Padrão AgNP 10 nm	365,7	1,34	395,1	50	
Padrão AgNP 10 nm + Spike 500 ppb Ag + 500 ppb Cu	830,0	0,42	891,9	50	99,6

Legenda: Onde: FD, fator de diluição da amostra; DPR(%), desvio padrão relativo.  
Fonte: (O autor, 2021).

Ao mesmo tempo, foi possível avaliar que o teste é seletivo para prata e que a concentração de cobre adicionada na mesma ordem de grandeza da prata, não alterou o resultado. De acordo com o critério de aceitação da AOAC, a recuperação entre 80 a 110% para a faixa de trabalho testada o método é aprovado neste quesito.

#### 4.2.1.1.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites LD e LQ foram obtidos pela regressão dos mínimos quadrados ponderados com a utilização do teste t a um nível de confiança de 95% (BAZILIO *et al.*, 2012; ZORN; GIBBONS; SONZOGNI, 1997). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados da regressão dos mínimos quadrados ponderados

Variáveis	Valor
Coef. Angular (a)	0,934207
Coef. Linear (b)	-3,42528
Y <sub>c</sub>	6,76
t <sub>(0,05,n-2)</sub>	2,13145
LD (ppb)	10,90
LQ (ppb)	32,70

Legenda: Dados calculados pela planilha elaborada por Bazilio e colaboradores (2012). Onde: Y<sub>c</sub>, é o nível crítico da resposta analítica; LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação.  
Fonte: (O autor, 2021).

Os limites de detecção deste método são para a concentração mássica de prata, independe do tamanho da partícula ou formato. As AgNps serão digeridas e dissolvida como Ag<sup>+</sup>. Representa a menor concentração mássica que pode ser detectada por este método, no caso o LD é 10,90 ppb e o LQ 32,70 ppb.

Dessa forma, a linearidade da curva analítica é adequada para a faixa de trabalho de 32,70 ppb a 1000 ppb, podendo inclusive excluir o P1 de 10 ppb pois este é menor que o LQ.

#### 4.2.1.1.4 Repetibilidade

A concentração de prata total na amostra AGCBOR05V13 foi de 0,401 ppm e a análise de suas repetições e do fator HorRat<sub>r</sub> foram colocados na Tabela 22.

Tabela 22 – Avaliação da repetibilidade

	<i>Concentração de Prata Total</i>
DPR <sub>r</sub>	1,50%
DPRP <sub>R</sub> = $2 \times (4,00 \times 10^{-7})^{-0,1505}$	18,4%
DPRPr	9,2%
HorRat <sub>r</sub>	0,163

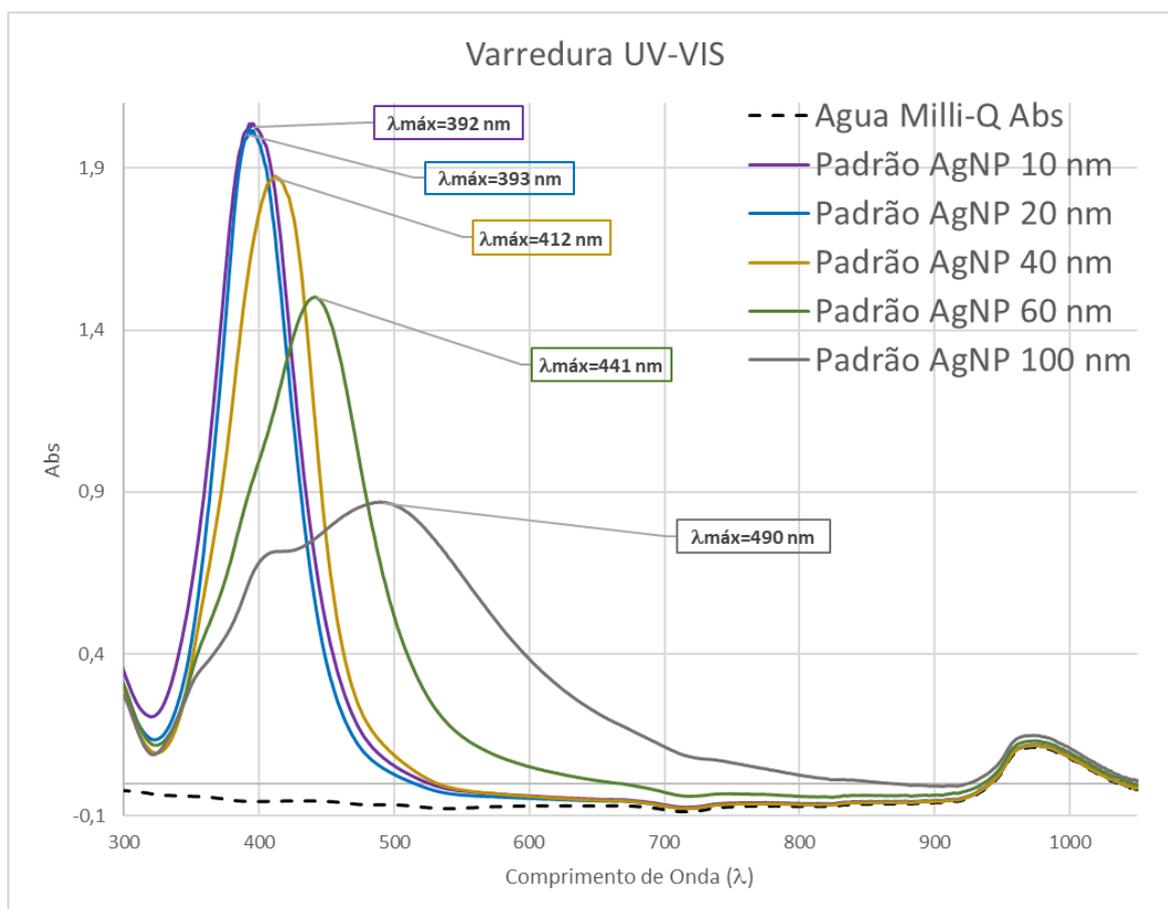
Legenda: Onde: DPR<sub>r</sub>, desvio padrão relativo; DPRP<sub>R</sub>, desvio padrão relativo previsto; HorRat<sub>r</sub>, razão de Horwitz.  
Fonte: (O autor, 2021).

Como  $\text{HorRat}_r$  é menor do que 2, indica que o método possui repetibilidade adequada.

#### 4.2.2 Espectrofotometria UV-vis

Em todas as análises de caracterização a espectrofotometria UV-VIS foi realizada para acompanhamento do processo de produção das AgNPs, caracterização e estabilidade. Através da RPS é possível avaliar de forma rápida características como o tamanho aproximado das partículas através do deslocamento do  $\lambda_{\text{máx}}$  em função do tamanho. A Figura 48 mostra a ressonância plasmônica de padrões de AgNPs em função de seu tamanho.

Figura 48 – Varredura UV-VIS de padrões de AgNPs



Legenda: Todos padrões com concentração mássica de 20 ppm e com citrato-3Na como estabilizante, para os tamanhos de 10, 20, 40, 60 e 100 nm. O gráfico mostra o deslocamento do  $\lambda_{\text{máx}}$  em função do tamanho da partícula.

Fonte: (O autor, 2021).

Pela análise de UV-VIS, também é possível acompanhar a eficiência de um processo, tempo de processo e realizar a customização da produção.

#### 4.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

##### 4.2.3.1 *Análise dos Padrões de AgNPs*

Neste ensaio foi avaliado a resposta do DLS de sua distribuição do tamanho das partículas, por intensidade, volume e número tendo os padrões de AgNPs como referência. Os padrões utilizados com seus respectivos lotes já foram descritos anteriormente na Tabela 12.

Usualmente, a leitura por intensidade é a mais utilizada e citada na literatura, mas no caso das AgNPs para tamanhos de até 60 nm observou-se que as medidas não estão coerentes com os valores de tamanho do certificado, marcado em vermelho na Tabela 23. No entanto, na medição por número estes se encontram coerentes com o certificado. Para valores maiores que 60 nm, a leitura por número, entretanto este estudo ainda não é conclusivo e são necessários mais testes para uma melhor avaliação.

Tabela 23 – Resultados de espalhamento dinâmico de luz para os padrões de AgNPs

Descrição da Amostra	Código	Diluição	Intercept	PDI	Distribuição do Tamanho							
					Por Intensidade (Média) (nm)	Por Volume (Média) (nm)	Por Número (nm)					
							Peak 1	%	Peak 2	%	Média	Desvio
AgNP 10 nm	PD10	10	0,991	0,332	94,6	55,3	14,0	100,0	-	-	14,0	4,834
AgNP 20 nm	PD20	10	0,983	0,374	95,0	187,8	20,2	100,0	-	-	20,2	4,840
AgNP 40 nm	PD40	10	0,954	0,271	164,5	483,9	29,3	100,0	-	-	29,3	8,110
AgNP 60 nm	PD60	10	0,925	0,204	76,1	56,3	45,8	100,0	-	-	45,8	11,60
AgNP 100 nm	PD100	10	0,904	0,178	110,5	91,1	64,0	100,0	-	-	64,0	19,57
50% AgNP 20 nm + 50% AgNP 60 nm	PD20_PD60	10	0,915	0,209	90,6	70,3	55,1	100,0	-	-	55,1	14,44
		50	0,950	0,253	88,4	73,1	58,5	100,0	-	-	58,5	14,39
		100	0,996	0,279	86,1	72,9	59,7	100,0	-	-	59,7	14,97
		200	0,987	0,278	133,3	612,9	14,5	20,0	-	-	46,5	2,74
							-	-	53,9	80,0		12,54

Legenda: Onde: DLS, espalhamento dinâmico da luz com medidas de tamanho da partícula por intensidade, volume e número; PDI, índice de polidispersão, Créditos da análise: Beatriz Ferreira de Carvalho Patrício (LMN/Farmanguinhos/Fiocruz).

Fonte: (O autor, 2021).

Na mistura de padrões, código da amostra: PD20\_PD60, observou-se que a partícula de maior tamanho prevalece na leitura de tamanho e a de menor tamanho não é visualizada. Isso ocorre devido movimento browniano que se baseia no espaço que a partícula irá ocupar naquele líquido. Assim, essa diferença entre elas acaba desaparecendo. Essa separação só foi observada na diluição de 200X que garantiu que as partículas estivessem bem separadas entre si, conseguindo leitura, também, na distribuição de tamanho por número.

Foi verificado que a expressão dos dados nestes três parâmetros produz três diferentes tamanhos e que para análise nas AgNPs para tamanhos de 60 nm a distribuição por número se mostrou mais precisa.

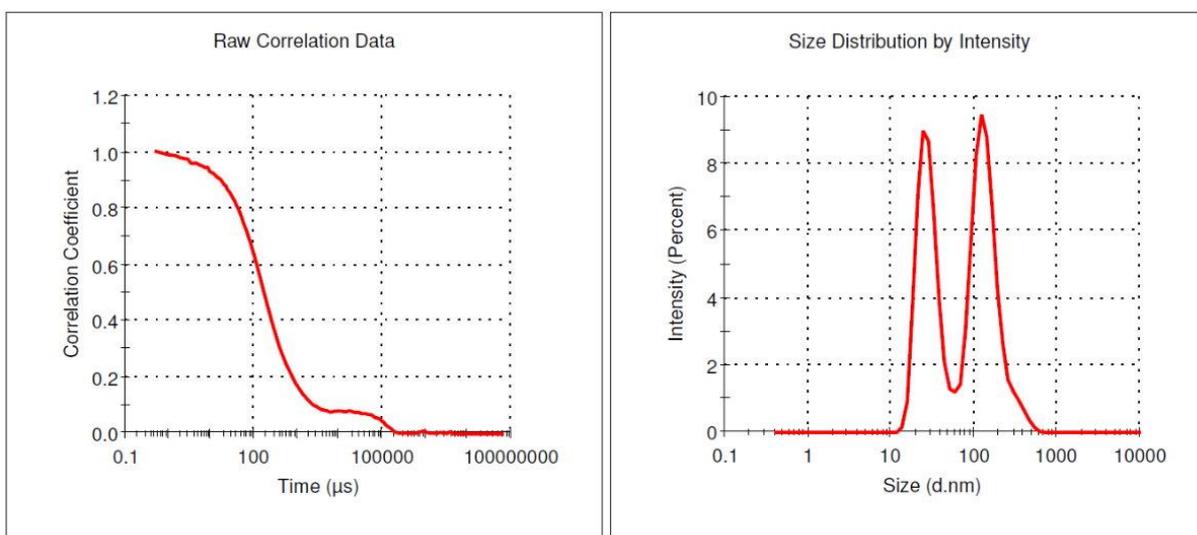
O valor de *Intercept* acima de 0,8 em todas as leituras indica boa correlação, pouco ruído na linha de base.

Os valores da distribuição por intensidade e volume (média) são a média ponderada do Peak 1, 2 e 3. O Valor Z-Average não é usado.

A média Z-Average (nm) é a correlação através de um algoritmo que reúne todos os sinais individuais das populações em um único sinal, assumido que existe um único pico aplicado à função de autocorrelação. Esse algoritmo de análise fornece a média Z ponderada da intensidade e o PDI. Não é considerado um valor consistente, uma vez que mescla todos os picos de população detectados.

A Figura 49 mostra os gráficos de função de correlação (*raw data*) e a conversão deste sinal para o gráfico de distribuição de tamanho por intensidade da amostra PD20 diluída 10X e a Figura 50 apresenta a distribuição por número da mesma amostra. O relatório desta amostra é mostrado com mais detalhes no Anexo C.

Figura 49 – Gráfico da função de correlação e gráfico da distribuição de tamanho por intensidade da amostra PD20



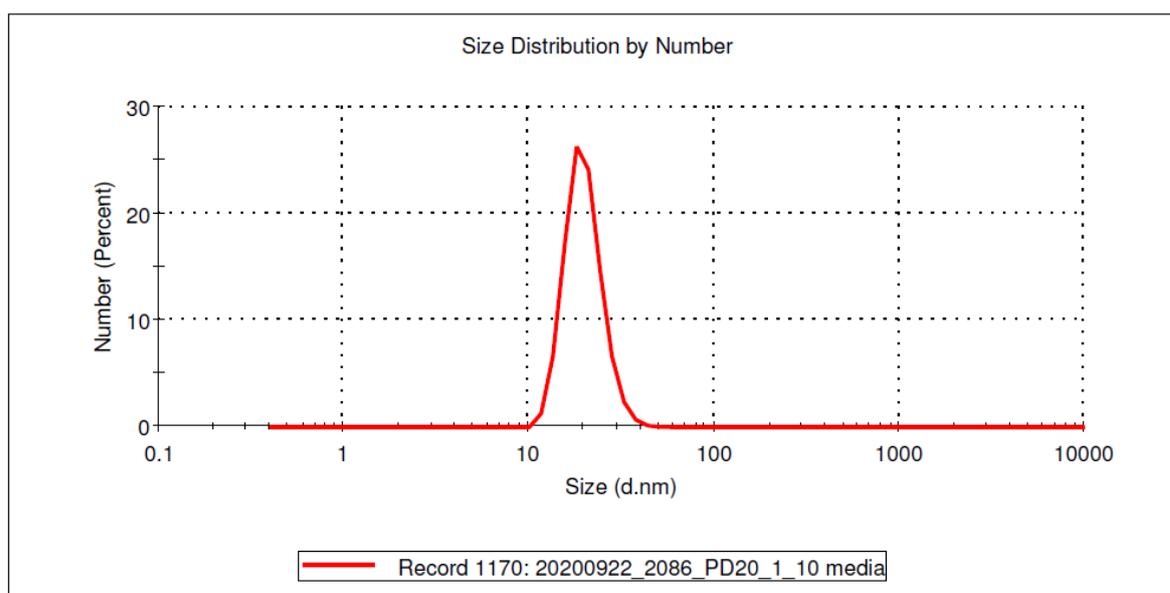
Fonte: (O autor, 2021).

Figura 50 – Resultados e gráfico da distribuição de tamanho por número da amostra PD20

### Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 74,78	<b>Peak 1:</b> 20,16	100,0	4,840
<b>Pdl:</b> 0,374	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,983	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Refer to quality report



Fonte: (O autor, 2021).

Todas as informações da difusão das partículas na amostra são incorporadas à curva de correlação medida. A dificuldade está na extração dessas informações de uma única curva.

Quanto menor o tamanho da partícula, maior é a dificuldade para obtenção de resultados representativos e maior é o erro relativo. Em nosso caso, foram realizadas 5 medições independentes para minimização do coeficiente de variação e a diluição de 10X se mostrou ser adequada com a distribuição de tamanho por número. Porém uso de água ultrapura tipo 1, geralmente não é recomendado, pois a ausência de íons diminui a proteção das interações de longa distância entre as partículas. A diluição com KCl ou NaCl não deve ser utilizada em nenhuma amostra com AgNPs, pois ocasionaria turvação devido à formação de AgCl. Por outro lado, a diluição em 10 mM KNO<sub>3</sub>, recomendada por Farrel e Brousseau (2017), não foi testada por nós em tempo hábil, e seria recomendada em estudo futuro comparativo diluindo 10X em KNO<sub>3</sub> 10 mM e avaliar os resultados (FARRELL; BROUSSEAU, 2017).

Um outro aspecto ainda sobre esta análise é o sobre o movimento browniano que depende da temperatura e da viscosidade do meio. Quanto maior a viscosidade, menor o movimento browniano e quanto maior a temperatura maior o movimento browniano. E o movimento browniano é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula. De forma geral, as amostras de AgNPs, inclusive os padrões, não apresentam viscosidade, porém em nossa proposta foi mostrado que a viscosidade aumenta a estabilidade a sedimentação. E, nestes casos, a diluição de 10X seria o suficiente para quebrar esta viscosidade e deixa-la igual a da água que é 0,9 cP (20°C). A realização dos testes a 20°C de todas as amostras uniformizou o resultado.

O potencial zeta é calculado pela mobilidade eletroforética que é determinada a partir da velocidade eletroforética. Colocando uma partícula carregada em um elétrico campo faz com que ele se mova: eletroforese.

O pH das AgNPs entre 8,5 a 9,5 favorece o aumento do PZ em módulo negativamente. No meio alcalino o PZ tende alterar a densidade de carga superficial das AgNPs, o que é interessante e desejável do ponto de vista de estabilidade elétrica. Dessa forma, por exemplos, AgNPs que possuam PZ -30 mV em pH 7,0, a mesma amostra ao ser levada para pH 9,0 pode ter um potencial de -40 mV, aproximadamente. Detectamos um aumento de cerca 30 a 40% em algumas de nossas amostras experimentais mantendo a mesma formula e simplesmente alterando o pH.

#### 4.2.3.2 Seletividade

Foram avaliados alguns dos componentes que compõem a matriz das AgNPs como coadjuvantes, ou como agente contaminante, que é o caso do  $\text{Ag}^+$ , proveniente da dissolução oxidativa. As amostras foram analisadas sem diluição e com diluição de 10X em água ultrapura tipo 1, que é a mesma diluição utilizada para as amostras de AgNPs. O Quadro 12 mostra que alguns desses componentes acusam uma resposta no DLS e outros não apresentam leitura (NA), indicando que estes não impacta diretamente o resultados das AgNPs. No entanto, a amostra AGN100 diluída 10X passa a 10 ppm de  $\text{Ag}^+$  e demonstra que o teor de  $\text{Ag}^+$  livre nas amostras de AgNPs pode impactar os resultados e o PDI. O BSA que pode ser incorporado para aumentar a estabilidade das AgNPs impacta em um resultado de grande raio hidrodinâmico medido pelo DLS.

Quadro 12 - Resultados da análise de DLS

Descrição Amostra	Cod. Amostra	Intercept	Diluição	Tamanho DLS por número (Média) nm	PDI
$\text{AgNO}_3$ 100 ppm	AGN100	1,37	10X	138,4	0,543
$\text{AgNO}_3$ 0,1Mol/L	AGN01M	1,09	10X	77,3	0,417
BSA 20 $\mu\text{g/mL}$	BSA20	0,95	-	668,2	0,483
BSA 20 $\mu\text{g/mL}$	BSA20	1,00	10X	369,2	0,614
Água ultrapura tipo 1	AGEWAT01	<b>NA</b>			
Citrato-3Na 0,02%	AGCIT01	<b>NA</b>			
Citrato-3Na 0,05%	AGCIT02	<b>NA</b>			
CMC 0,15%	AGCMC01	<b>NA</b>			
CMC 0,30%	AGCMC02	<b>NA</b>			
PEG 6000 0,10%	AGPEG01	<b>NA</b>			
PVP-K30 0,05%	AGPVP01	<b>NA</b>			

Legenda: Com as constantes: Material RI, 1,33; Coeficiente de extinção (K), 3,99 e meio dispersante água. Resultados DLS representam a média ponderada da distribuição de tamanho por número. NA, Não apresentaram leitura no equipamento nem em uso direto nem diluído a 10X. Créditos da análise: Beatriz Ferreira de Carvalho Patrício (LMN/Farmanguinhos/Fiocruz).

Fonte: (O autor, 2021).

#### 4.2.4 Potencial Zeta (PZ)

##### 4.2.4.1 Análise dos Padrões de AgNPs

Foi realizada análise de PZ nos padrões de AgNPs e verificou-se a relação de seu valor com a diluição, conforme resultados apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Resultados de PZ para os padrões de AgNPs de 10, 20, 40, 60 e 100 nm

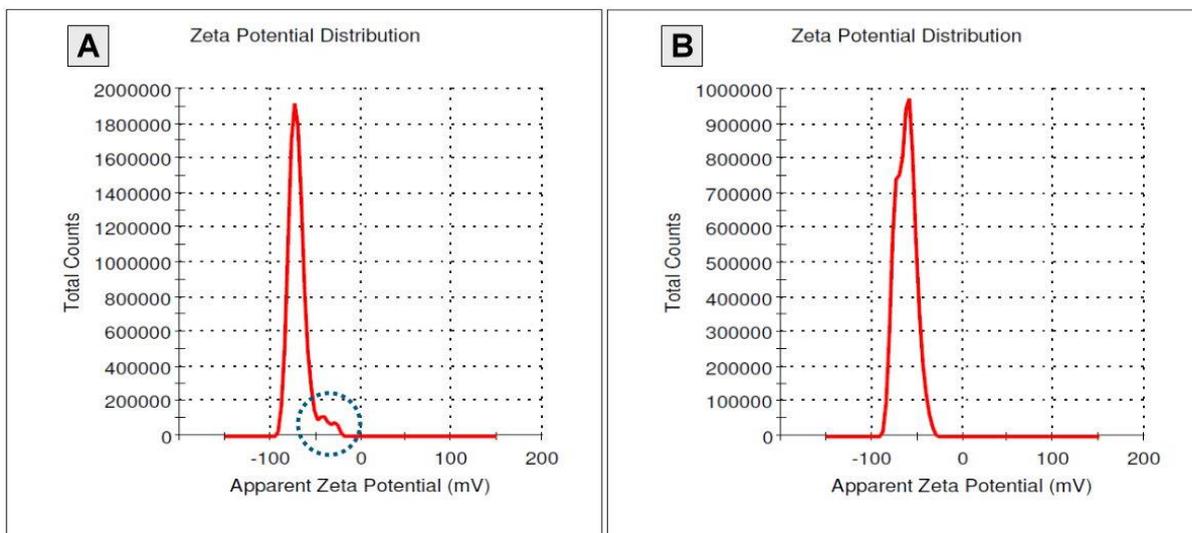
Descrição da Amostra	Código	Diluição	PZ final (mV)	Condutividade (mS/cm)
AgNP 10 nm	PD10	-	- 43,2	0,6060
		10	- 41,4	0,1020
		50	- 37,6	0,0199
		100	- 18,6	0,0093
AgNP 20 nm	PD20	10	- 69,4	0,0605
		50	- 63,6	0,0152
AgNP 40 nm	PD40	10	- 65,7	0,0649
		50	- 63,4	0,0093
AgNP 60 nm	PD60	-	- 59,3	0,6070
		10	- 44,7	0,0354
		50	- 61,6	0,0144
AgNP 100 nm	PD100	10	- 57,3	0,0639
		50	- 67,4	0,0240

Créditos da análise: Beatriz Ferreira de Carvalho Patrício (LMN/Farmanguinhos/Fiocruz).

Fonte: (O autor, 2021).

A diluição de 50X, mostrou-se adequada para AgNPs. As diluições abaixo de 50X apresentaram interferência para o teste de PZ, conforme resultado mostrado na Figura 51, fazendo um comparativo entre o resultado do PD20 na diluição de 20X e na de 50X. Os gráficos indicam que a distribuição da fase está adequada, porém a concentração da amostra diluída 20X ainda pode estar inadequada em A (muito alto).

Figura 51 – Mostra a distribuição do PZ da amostra de padrão de AgNP 20 nm. A, amostra diluída 20X; B, amostra diluída 50X. O círculo azul pontilhado em A, mostra uma interferência no sinal



Fonte: (O autor, 2021).

#### 4.2.4.2 Influência das matérias-primas no PZ

Foram avaliados alguns dos componentes que compõem a matriz das AgNPs. As amostras foram analisadas com diluição de 10X em água ultrapura tipo 1. As amostras de CMC e PVP apresentaram leitura de PZ enquanto as outras não. A Tabela 25 mostra estes resultados. Tanto o CMC como o PVP influenciam de forma positiva no aumento de PZ das AgNPs.

Tabela 25 - Resultados da análise de PZ

<b>Descrição Amostra</b>	<b>Cod. Amostra</b>	<b>Diluição</b>	<b>PZ final (mV)</b>	<b>Condutividade (mS/cm)</b>
CMC 0,15%	AGCMC01	10	- 24,1	0,0602
CMC 0,30%	AGCMC02	10	- 22,2	0,2480
PVP-K30 0,05%	AGPVP01	-	- 18,4	0,0073
AgNO <sub>3</sub> 0,1Mol/L	AGN01M		<b>NA</b>	
AgNO <sub>3</sub> 100 ppm	AGN100		<b>NA</b>	
Água ultrapura tipo 1	AGEWAT01		<b>NA</b>	
BSA 20 µg/mL	BSA20		<b>NA</b>	
PEG 6000 0,10%	AGPEG01		<b>NA</b>	

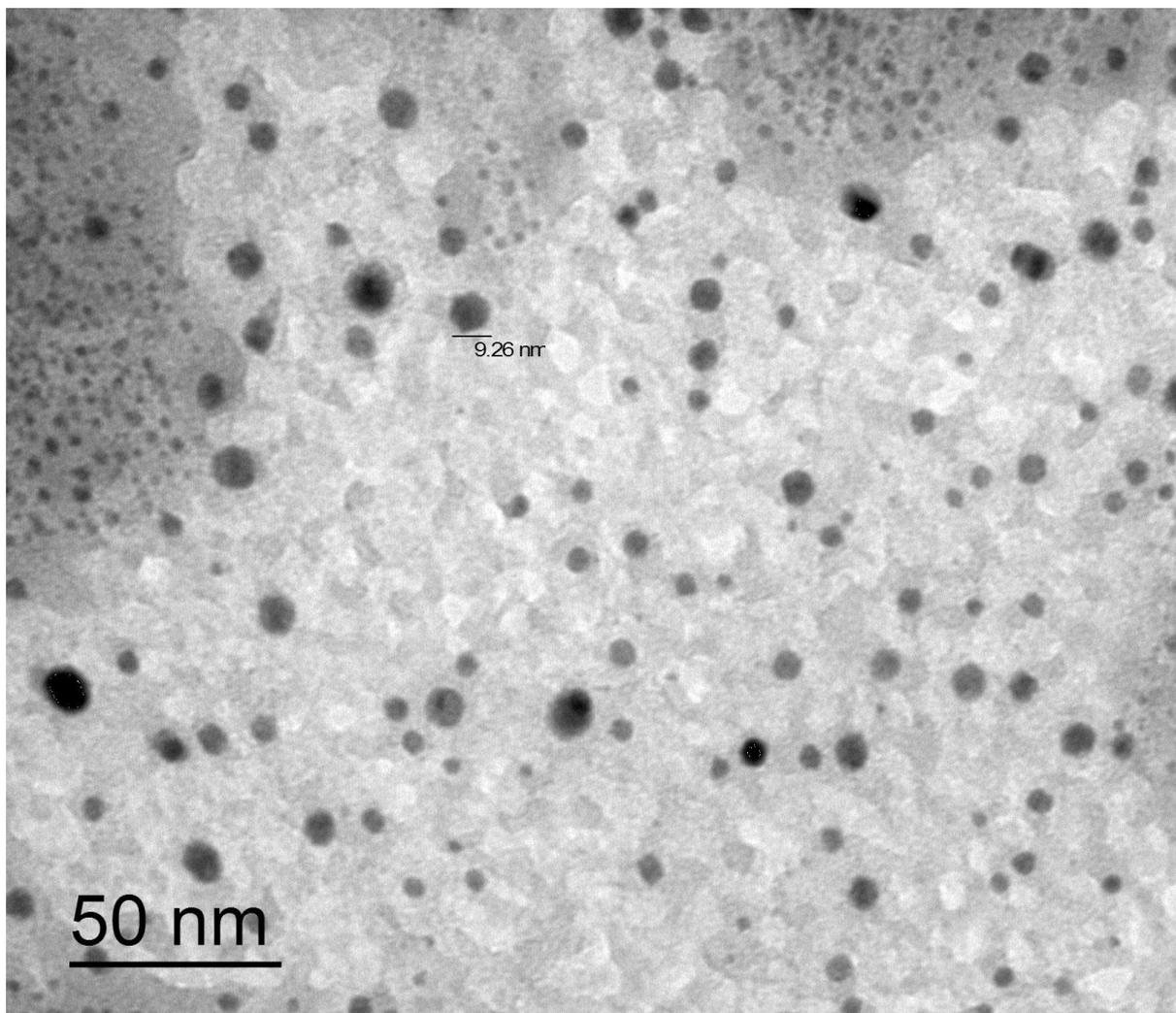
Legenda: NA, Não apresentaram leitura no equipamento nem em uso direto nem diluído a 10X. Créditos da análise: Beatriz Ferreira de Carvalho Patrício (LMN/Farmanguinhos/Fiocruz).

Fonte: (O autor, 2021).

#### 4.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Foram realizados diversos experimentos para análise por TEM conforme metodologia apresentada. A Figura 52 representa uma nanopartícula de prata plasmônica de coloração azul e é possível ver a formação de alguns nanopratos hexagonais com cerca de 10 nm aproximadamente. É possível observar as partículas mais translúcidas indicando um possível formato de nanopratos.

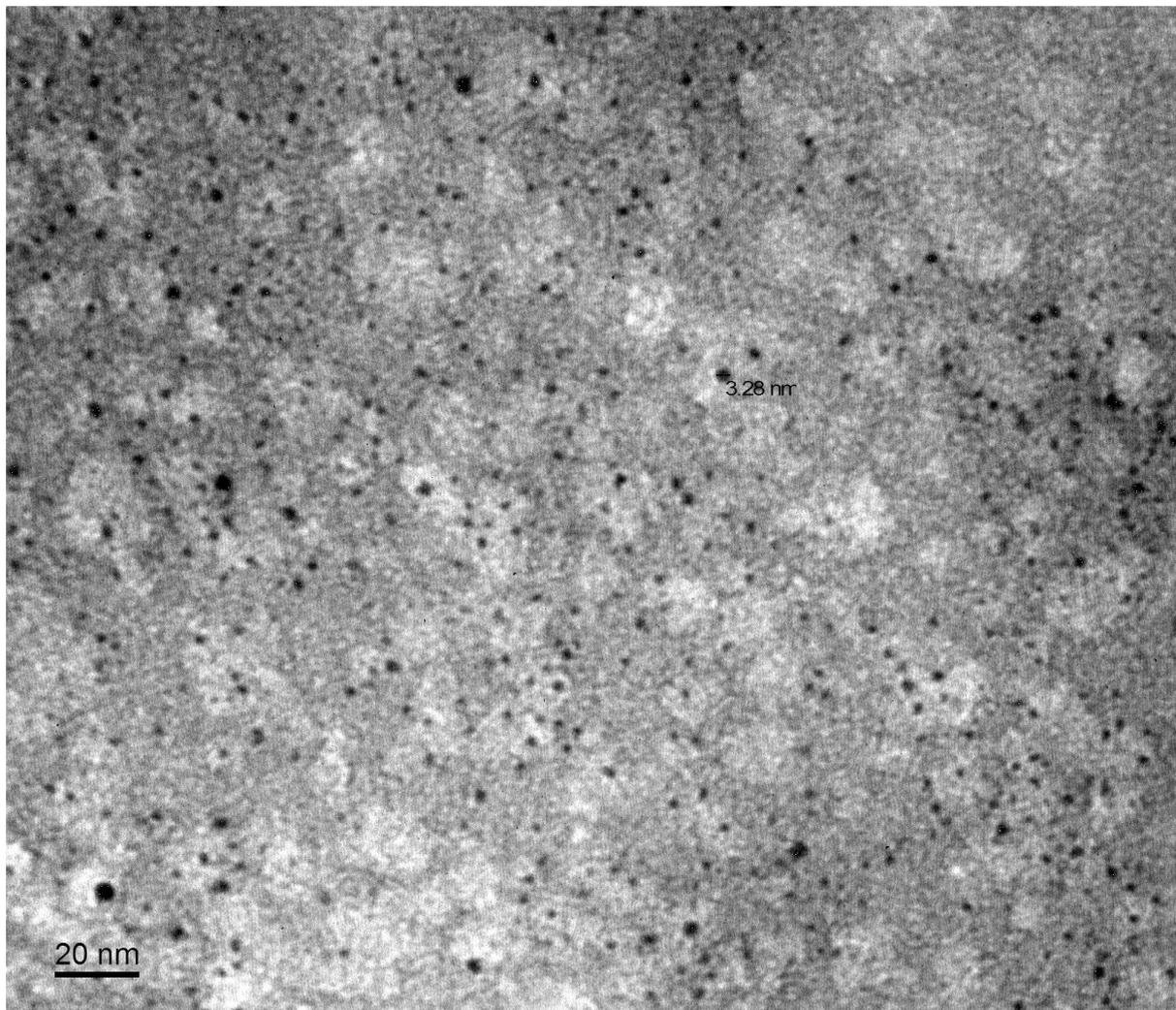
Figura 52 – Imagem por TEM da amostra de AgNP plasmônica



Nota: Lote: AGP28, na foto um prato hexagonal com cerca de 10 nm. Créditos da análise: Wendell Girard Dias (Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do IOC/FIOCRUZ).  
Fonte: (O autor, 2021).

Por outro lado, a Figura 53 mostra uma produção AgNPs obtida pelo método eletroquímico com a seguinte metodologia: 15V e 530 mA, 0,04% PVP-K-30, 0,05%  $\text{NaHCO}_3$  1M, 0,15% CMC-r, temperatura 70°C e tempo de eletrólise de 15 minutos. Neste caso as partículas se mostram como esféricas e com tamanhos entre 3 a 5 nm.

Figura 53 – Resultado obtido por TEM da amostra de AgNP



Nota: Lote: 190701AGE13, obtida pelo método eletroquímico. Apresenta formato esférico e tamanho médio em torno de 4 nm. Créditos da análise: Wendell Girard Dias (Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do IOC/FIOCRUZ).  
Fonte: (O autor, 2021).

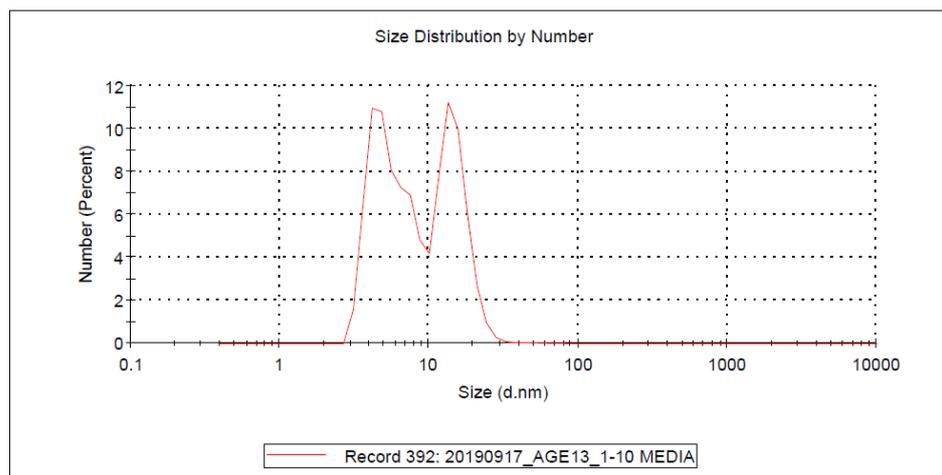
O resultado do DLS na distribuição por número se aproxima deste valor conforme apresentado na Figura 54.

Figura 54 – Resultado DLS da amostra de AgNP, Lote: 190701AGE13. A Figura mostra a distribuição por número, com o PDI, intercept e gráfico de distribuição

### Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 71,16	<b>Peak 1:</b> 5,827	58,4	1,913
<b>Pdl:</b> 0,349	<b>Peak 2:</b> 15,01	41,6	4,295
<b>Intercept:</b> 0,929	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Refer to quality report



Nota: Créditos da análise: Beatriz Ferreira de Carvalho Patrício (LMN/Farmanguinhos/Fiocruz).  
Fonte: (O autor, 2021).

Os resultados de tamanho por TEM são muito mais precisos e reais do que os resultados por DLS. Em geral os tamanhos reais das partículas são menores no TEM do que DLS, pois a técnica TEM capta através do fluxo de elétrons a exata projeção da partícula. Já no DLS, o equipamento capta o raio hidrodinâmico, que é um pouco maior do que o tamanho real da partícula. A qualidade do polímero que reveste os grids é um fator fundamental. Em nossos testes, testamos o collodium, porém o mesmo acaba agregando as partículas e o resultado não foi adequado. O Formvar que utilizamos estava antigo, e isso pode ter impactado, certamente, na qualidade dos resultados. Ao receber o fluxo do canhão de elétrons o mesmo rapidamente se desintegrava e estourava o campo.

A técnica fornece informações relevantes sobre o tamanho, distribuição e morfologia das partículas de AgNPs, no entanto, deve ser considerado o alto custo para manutenção do equipamento, compra de grids, polímeros formadores de película (Formvar).

### 4.3 Citotoxicidade das AgNPs

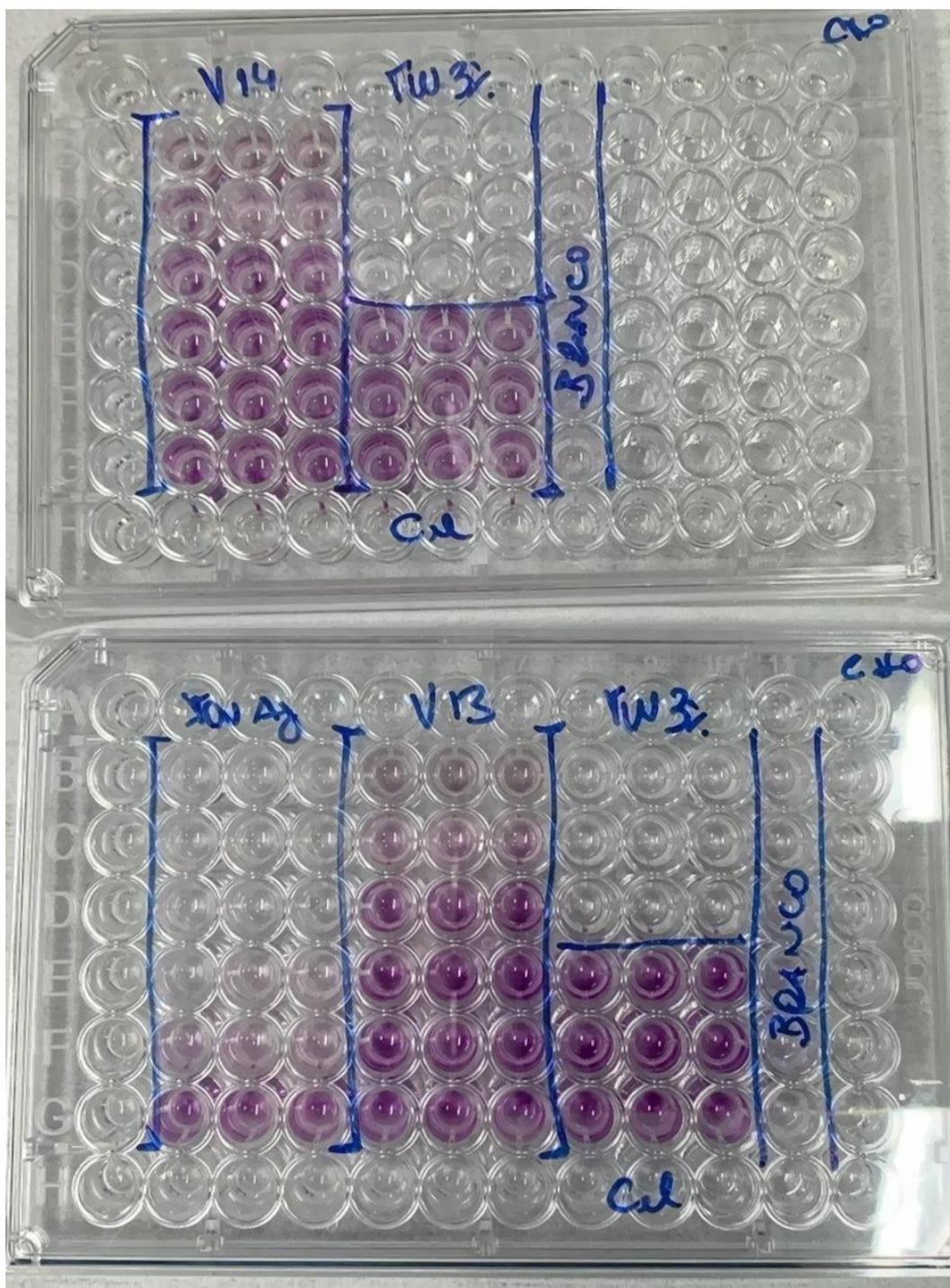
#### 4.3.1 Ensaio MTT em células CHO

Neste ensaio podemos avaliar a citotoxicidade das amostras produzidas de AgNPs lotes AGBOR05BSAV13 e SN@AGBOR05V14, e do íon prata, que foram adicionadas aos poços com células CHO, conforme Figuras 55, 56, 57 e 58. As células foram cultivadas em condições ideais para o seu crescimento conforme descrito no item 3.3.1.

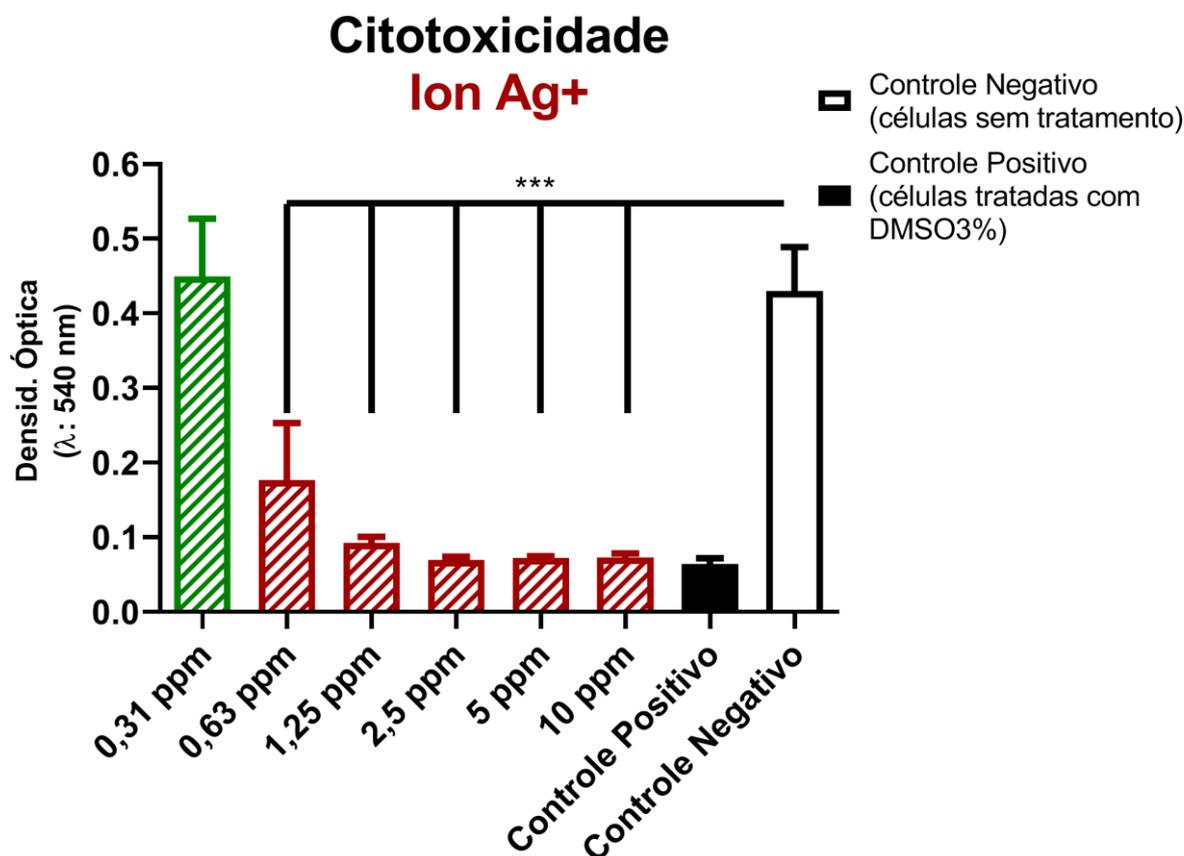
O íon prata foi testado sob a forma de nitrato de prata na faixa de concentrações de 0,31 ppm a 10 ppm, tendo como controles, células CHO sem tratamento (controle negativo ou de viabilidade celular) e células tratadas com DMSO 3% (controle positivo para verificação de morte celular). Como demonstrado na Figura 56, no caso do  $\text{Ag}^+$  apenas a concentração de 0,31 ppm não foi citotóxica para as células, apresentando o crescimento celular semelhante ao controle sem tratamento.

O lote AGBOR05BSAV13 foi testado a partir da concentração de 0,63 a 20 ppm de AgNPs, mantendo os mesmos controles descritos acima. A Figura 57 demonstra que apenas as concentrações de 10 e 20 ppm se mostraram citotóxicas, quando comparadas às células sem tratamento. Resultado semelhante ao lote AGBOR05BSAV13 foi observado para SN@AGBOR05V14, como demonstrado na Figura 58.

Figura 55 – Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT em células CHO

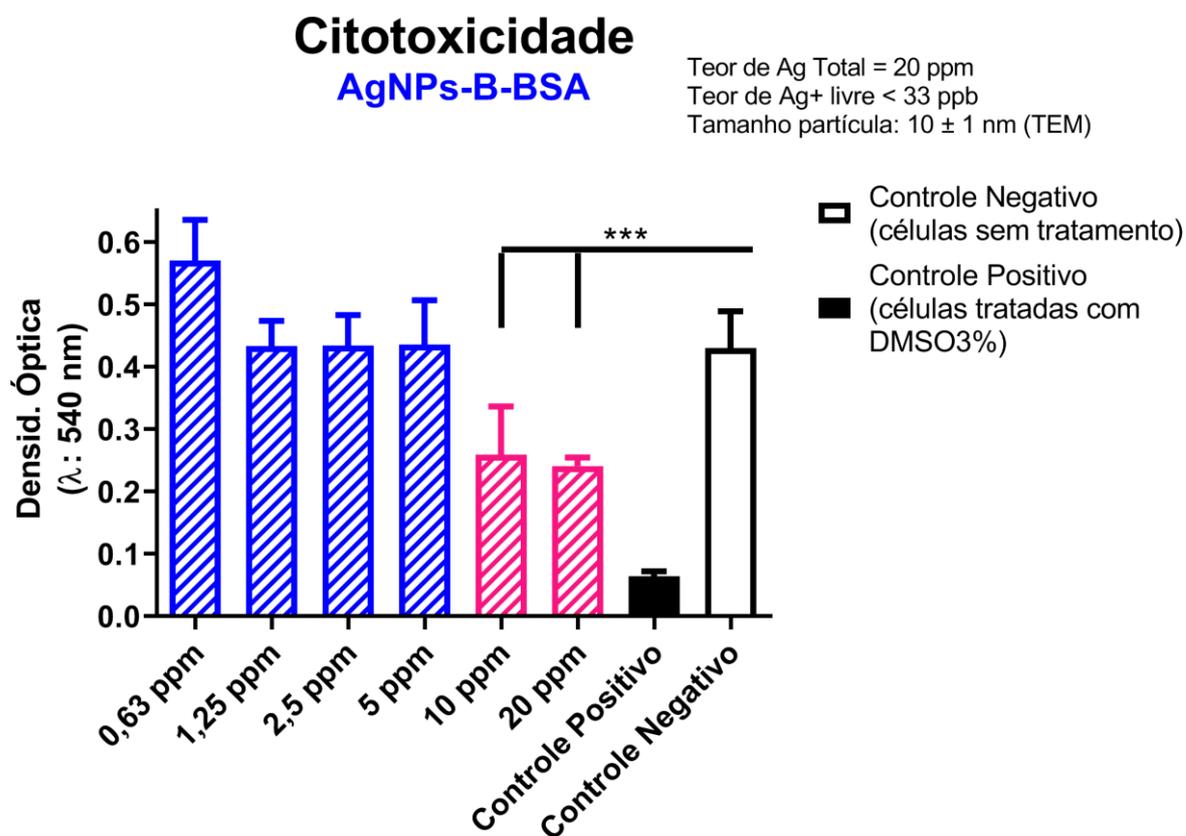


Legenda: Onde: MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. CHO: células de ovário de hamster chinês. V14: Amostra de AgNP Sn@Ag lote: SN@AGBOR05V14; V13: Amostra de AgNP-B-BSA, lote: AGBOR05BSAV13. Íon Ag: Nitrito de prata 10 ppm. TW3%: DMSO 3%. Branco: Meio + PBS sem células. Placa após incubação de 24h e adição do MTT. Créditos da imagem: Alexandre Bezerra Conde Figueiredo (LATAM/Bio-manguinhos/FIOCRUZ).  
Fonte: (O autor, 2021).

Figura 56 – Ensaio de citotoxicidade MTT do íon  $\text{Ag}^+$  em células CHO

Legenda: Onde: MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. CHO: células de ovário de hamster chinês. Resultados expressos como valores médios de absorvância  $\pm$  desvio padrão de dois ensaios independentes. Amostra de íon prata  $\text{Ag}^+$  (sob a forma de nitrato de prata): as concentrações de 0,63 a 10 ppm se mostraram citotóxicas quando comparadas ao controle negativo (células CHO sem tratamento). A concentração de 0,31 ppm não foi citotóxica apresentando valores de absorvância semelhantes ao do grupo controle negativo. Na análise estatística empregando análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas Newman-Keuls \*\*\* denota valor  $p < 0,05$ , indicando que estas concentrações de  $\text{Ag}^+$  causaram significativo decréscimo de viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle negativo, a um nível de confiança de 95%. Créditos da análise e tratamento dos dados: Alexandre Bezerra Conde Figueiredo (LATAM/Bio-manguinhos/FIOCRUZ). Fonte: (O autor, 2021).

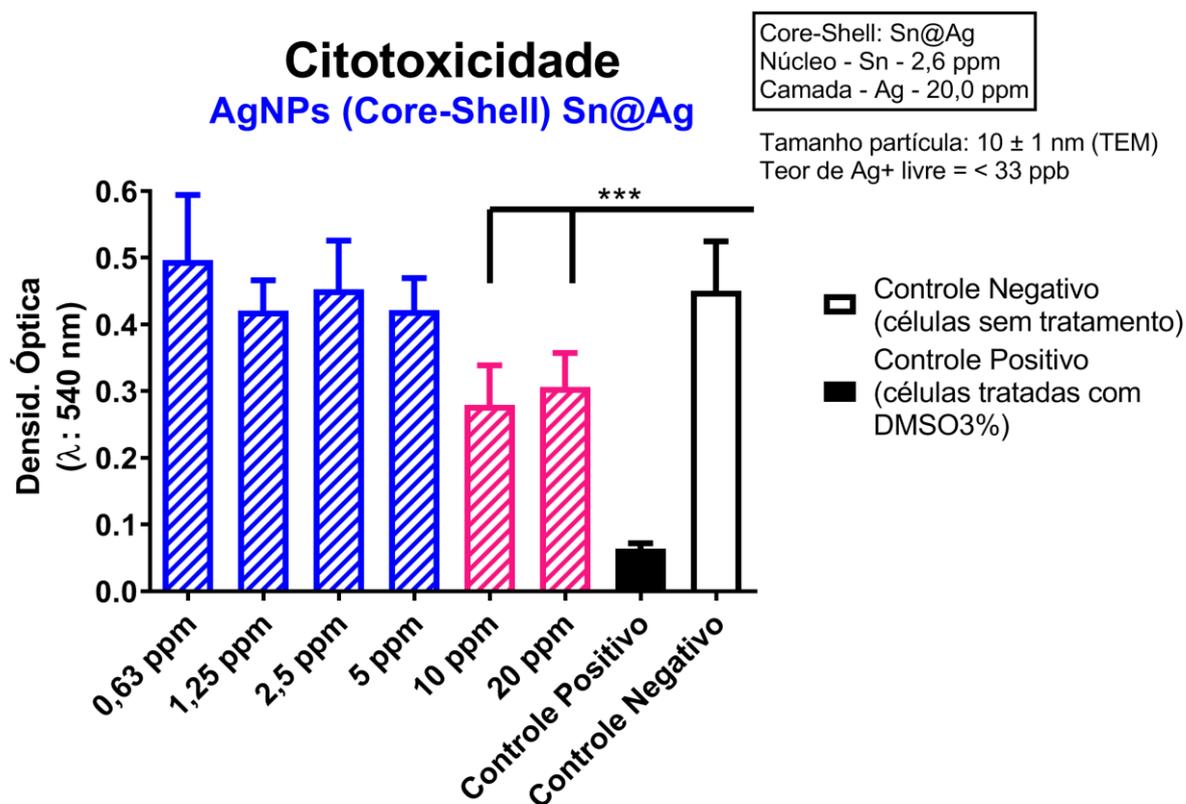
Figura 57 - Ensaio de citotoxicidade MTT de nanopartículas de prata estabilizadas com boro e BSA (AgNPs-B-BSA) em células CHO



Legenda: MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. CHO: células de ovário de hamster chinês. Resultados expressos como valores médios de absorvância ± desvio padrão de dois ensaios independentes. Amostra de AgNPs-B-BSA, lote: AGBOR05BSAV13: as concentrações de 10 e 20 ppm se mostraram citotóxicas quando comparadas ao controle negativo (células CHO sem tratamento). As concentrações iguais ou menores que 5 ppm não foram citotóxicas apresentando valores de absorvância semelhantes ao do grupo controle negativo. Na análise estatística empregando análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas Newman-Keuls \*\*\* denota valor  $p < 0,05$ , indicando que estas concentrações de AgNPs-B-BSA causaram significativo decréscimo de viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle negativo, a um nível de confiança de 95%. Créditos da análise e tratamento dos dados: Alexandre Bezerra Conde Figueiredo (LATAM/Bio-manguinhos/FIOCRUZ).

Fonte: (O autor, 2021).

Figura 58 - Ensaio de citotoxicidade MTT de nanopartículas bi-metálica com núcleo (core-shell) de Sn e camada de Ag (AgNPs (Core-Shell) Sn@Ag em células CHO



Legenda: MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. CHO: células de ovário de hamster chinês. Resultados expressos como valores médios de absorbância  $\pm$  desvio padrão de dois ensaios independentes. Amostra de AgNPs (Core-Shell) Sn@Ag, lote: SN@AGBOR05V14: as concentrações de 10 a 20 ppm se mostraram citotóxicas quando comparadas ao controle negativo (células CHO sem tratamento). As concentrações iguais ou menores que 5 ppm não foram citotóxicas apresentando valores de absorbância semelhantes ao do grupo controle negativo. Na análise estatística empregando análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas Newman-Keuls \*\*\* denota valor  $p < 0,05$ , indicando que estas concentrações de NPs Sn@Ag causaram significativo decréscimo de viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle negativo, a um nível de confiança de 95%. Créditos da análise e tratamento dos dados: Alexandre Bezerra Conde Figueiredo (LATAM/Bio-manguinhos/FIOCRUZ).  
Fonte: (O autor, 2021).

#### 4.4 Controle Sanitário

Foram analisadas 3 amostras de produtos encontrados no mercado nacional e internacional sob a forma de nanopartículas de prata todos indicados para tratamento da saúde. A Tabela 26 descreve as principais informações contidas nos rótulos destes produtos e na Tabela 27 são apresentados os resultados de controle da qualidade obtido destas amostras.

Tabela 26 – Informações sobre concentração, modo de usar e informações adicionais sobre os produtos comerciais adquiridos a base de prata coloidal com as informações tal qual descritas nos rótulos (continua)

Produto	Descrição, concentração, modo de usar e informações adicionais	Valor
A (nacional)	<p>Suspensão de prata nanoparticulada em água deionizada.</p> <p>Uso interno e externo.</p> <p>Prata 5 ppm</p> <p><b>Queimaduras, feridas e afecções da pele em geral:</b> Aplicar (A) sobre a região afetada com auxílio de uma gaze ou borrifador, repetindo com frequência.</p> <p><b>Sinusite/rinite:</b> Aplicar na narina com conta-gotas ou frasco spray.</p> <p><b>Ingestão:</b> Não ultrapassar 1 mL por Kg de peso corporal por dia. (A) deve ser ingerido em jejum. Antes de ingerir, mantenha alguns instantes sobre a língua.</p> <p>Ingredientes: Prata (5 mg, partículas &lt; 40 nm) e água esterilizada e deionizada grau farmacêutico (condutividade &lt; 0,25 microsiemens).</p> <p>Lote: 10156 Validade: 01/2021 (escrito manualmente)</p> <p>Tem CNPJ. Não apresenta registro MS. Não informa endereço. Não tem farmacêutico ou químico responsável.</p>	<p>R\$ 89,00</p> <p>Frasco de 500 mL</p>
	<p>Prata Coloidal</p> <p>Antifúngico e Antibacteriano</p> <p>Concentração: 10 ppm</p> <p>Fabricação: 12/19 (escrito manualmente). Validade 6 meses.</p> <p>Não tem CNPJ. Não apresenta registro MS. Não informa endereço. Não tem farmacêutico ou químico responsável.</p>	<p>R\$ 79,80</p> <p>Frasco de 500 mL</p>

Tabela 26 – Informações sobre concentração, modo de usar e informações adicionais sobre os produtos comerciais adquiridos a base de prata coloidal com as informações tal qual descritas nos rótulos (conclusão)

C (internacional)	(Traduzido)	
	Prata Coloidal - suplemento dietético Suporte para sistema imunológico Concentração: 500 ppm	
	<p><b>Contém:</b> prata coloidal grau farmacêutico e água grau farmacêutico.</p> <p>Fornece a maior porcentagem de partículas de prata a 2 nm para absorção ideal</p> <p>Usamos especificamente o teste NCS (espectroscópio de correlação de nano fotóns). É o teste mais preciso do tamanho geral das partículas. As partículas de prata coloidal devem variar entre 1-100 nm para fins de segurança.</p>	U\$ 79,99
	<p><b>Uso sugerido:</b></p> <p>Adultos 1/2 colher de chá, duas vezes ao dia</p> <p>Crianças (&lt;35 Kg): 1/4 colher de chá.</p> <p>Por até 14 dias.</p> <p><b>1 colher de chá (5 mL)</b></p> <p>Pode diluir com água ou suco.</p> <p>Armazenar em temperatura ambiente. Evite luz solar direta.</p> <p>Mantenha fora do alcance de crianças.</p>	Frasco de 480 mL
	<p><b>Essas declarações não foram avaliadas pelo FDA. Este produto não se destina a diagnosticar, tratar, curar ou prevenir qualquer doença.</b></p>	
	<p>Não tem CNPJ. Não apresenta registro FDA. Informa endereço.</p> <p>Não tem farmacêutico ou químico responsável.</p>	

Fonte: (O autor, 2021).

As amostras A, B e C foram analisadas quanto à concentração de prata total, concentração de AgNPs e prata iônica, além do tamanho médio por DLS, PZ, PDI e condutividade. De todas as amostras analisadas apenas a amostra C, apresentou valores aceitáveis de prata total, de acordo com as informações estabelecidas no rótulo. No entanto, a alta concentração de 485,9 ppm de prata total pode significar um

risco para o consumidor devido a possibilidade de superdosagem. Com relação a amostra A, o rótulo indica uma concentração de 5 ppm de nanopartículas, mas nos ensaios foi encontrada a concentração de 2,77 ppm de prata total e 1,41 ppm de Ag<sup>+</sup> livre o que é extremamente tóxico de acordo com os testes já apresentados. Amostra B, apresentou aproximadamente o dobro da concentração nominal da embalagem que era de 10 ppm, sendo que 14,04 ppm corresponde a Ag<sup>+</sup> livre e apenas 6,41 ppm de AgNPs. Os resultados são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 – Resultados de controle da qualidade para as amostras de prata coloidal de mercado

Produto	Conc Ag Total	Conc AgNPs	Conc. Ag+ (ppm)	Tamanho Médio DLS (by Number)	PDI	PZ (mV)	pH
<b>A</b>	2,765	1,36	1,41	243,0	1,000	-25,1	3,1
<b>B</b>	20,45	6,41	14,04	8,99	0,456	-39,2	6,7
<b>C</b>	485,9	483,42	2,46	26,95	0,231	-41,4	8,5

Legenda: Onde: DLS: Espalhamento dinâmico da luz. PDI: Índice de polidispersão. PZ: Potencial Zeta. A: Suspensão de prata nanoparticulada em água deionizada (concentração de prata 5 ppm segundo o rotulado). B: Prata Coloidal (concentração de prata 10 ppm segundo o rotulado). C: Prata Coloidal – suplemento dietético (concentração de 500 ppm segundo o rotula. Para o teste de DLS e PZ as amostras A e B foram diluídas 10X e a C diluída 25X.

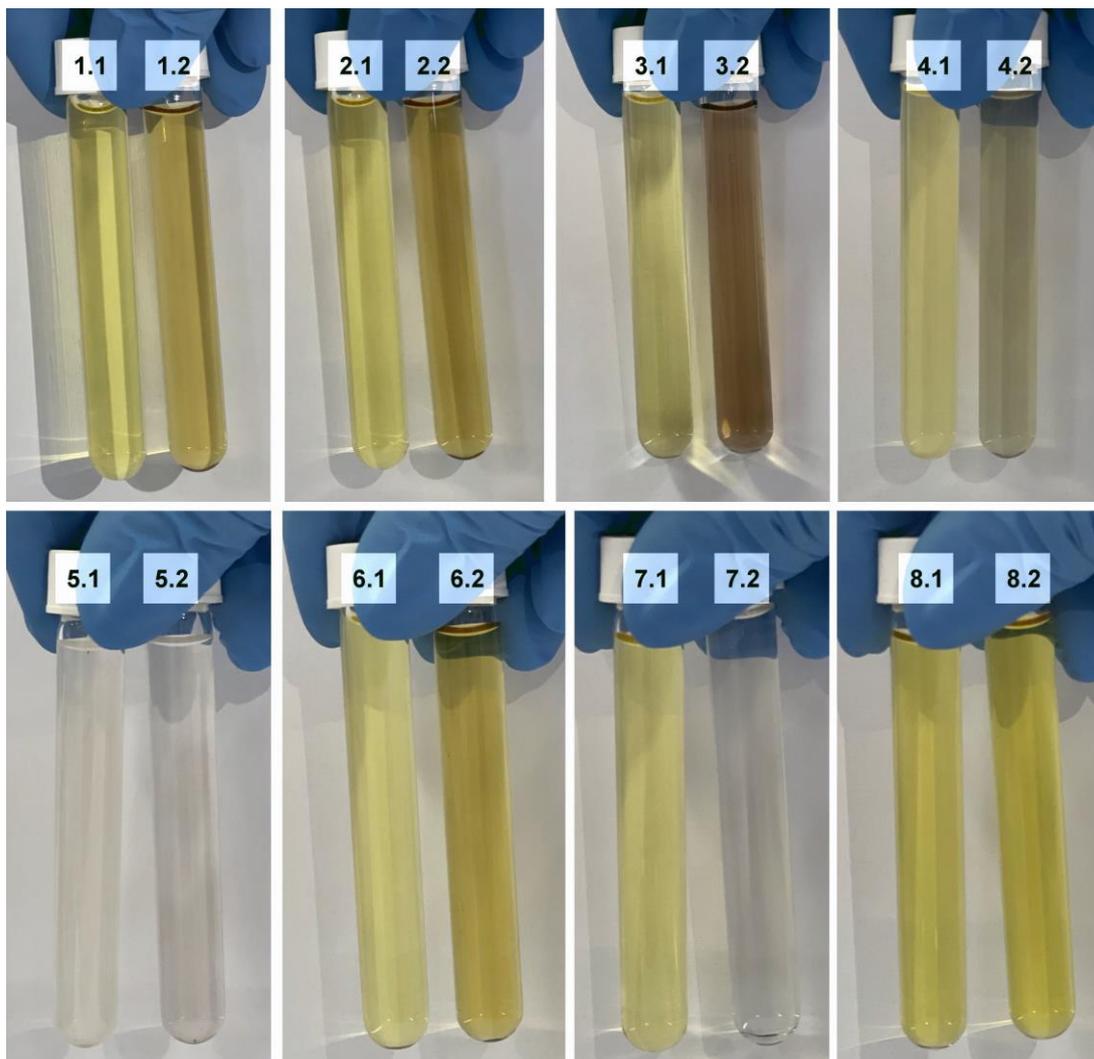
Fonte: (O autor, 2021).

## 4.5 Estabilidade das AgNPs

### 4.5.1 Estabilidade ao Congelamento

Para esta avaliação, foram utilizados padrões de AgNPs e 3 lotes de amostras produzidas por processos de síntese diferentes para avaliar seu stress frente ao congelamento. A Figura 59 mostra as imagens obtidas destas amostras antes e após o congelamento a -80°C por 7 dias.

Figura 59 - Observação experimental de congelamento de amostras de AgNPs

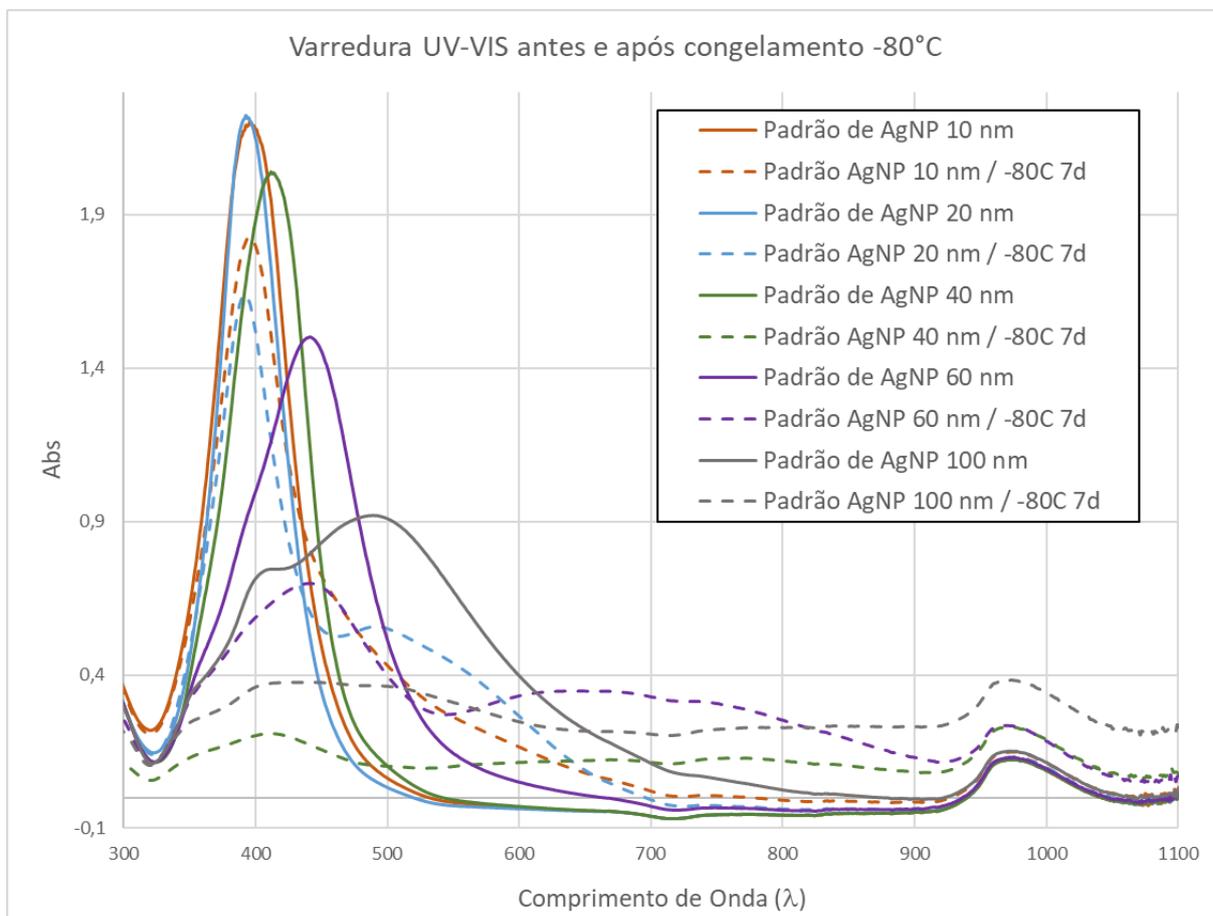


Legenda: As fotos dos tubos com final 1 foram tiradas antes do congelamento e as fotos com final 2 foram tiradas após 7 dias de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Com as respectivas identificações: 1 - Padrão de AgNP 10 nm, 2 - Padrão de AgNP 20 nm, 3 - Padrão de AgNP 40 nm, 4 - Padrão de AgNP 60 nm, 5 - Padrão de AgNP 100 nm, 6 - Amostra AgNP L:AGBOR05BSAV13, 7 - Amostra AgNP L: SN@AGBOR05V14, 8 - Amostra AgNP L: AGBOR05AROEV15. Créditos da imagem: Luiz Felipe de Melo Azevedo (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ).

Fonte: (O autor, 2021).

Visualmente foi possível observar mudanças significativas nas amostras após o congelamento. No entanto, a verificação da espectroscopia UV-VIS destas amostras antes e depois do congelamento será fundamental na análise do efeito de congelamento, conforme apresentado nas Figuras 60 e 61.

Figura 60 – Espectro UV-VIS dos padrões de AgNPs de 10, 20, 40, 60, 100 nm antes e após o congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 7 dias

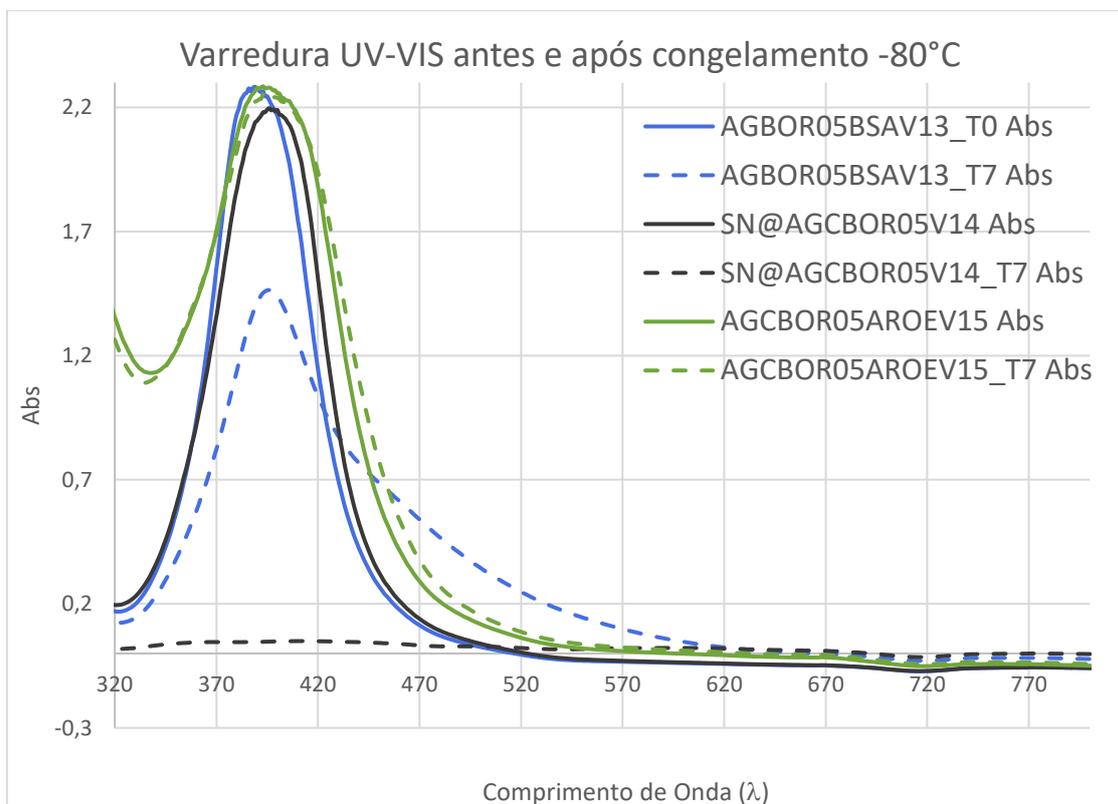


Legenda: A linha contínua representa a amostra antes do congelamento e a pontilhada representa a mesma amostra após o congelamento de  $-80^{\circ}\text{C}$  por 7 dias.

Fonte: (O autor, 2021).

Foram escolhidas 3 amostras de 3 rotas de síntese de diferentes e que se apresentaram como formulações estáveis, também, para colocar à prova a estabilidade de seus coadjuvantes e estabilizantes frente ao congelamento, conforme Figura 61.

Figura 61 - Espectro UV-VIS das amostras produzidas antes e após congelamento



Legenda: AGBOR05BSAV13 (método borohidreto com borax e BSA), SN@AGCBOR05V14 (método core-shell Sn@Ag) e AGCBOR05AROEV15 (método de síntese com NOM: Aroeira) antes e após o congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. A linha contínua representa a amostra antes do congelamento e a pontilhada representa a mesma amostra após o congelamento de  $-80^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. Fonte: (O autor, 2021).

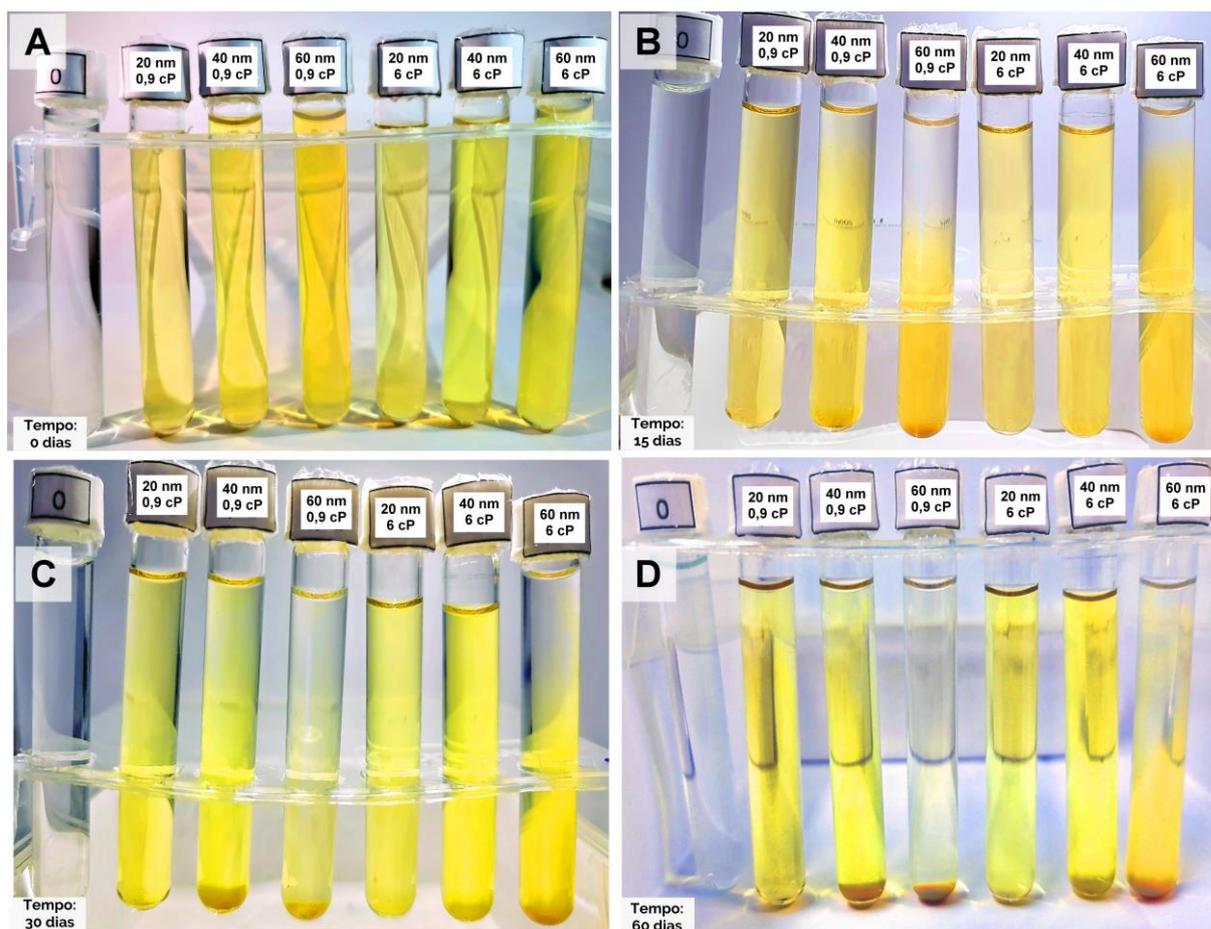
Das amostras avaliadas, a única que se manteve estável a 1 ciclo de congelamento foi a amostra AGCBOR05AROEV15, feita com extrato de aroeira.

#### 4.5.2 Estabilidade a Sedimentação

A sedimentação é um fator extrínseco que está relacionado à gravidade. O objetivo deste teste é mostrar como a viscosidade da amostra contendo AgNPs afeta a estabilidade. A Figura 62 apresenta um estudo experimental, onde padrões de AgNPs são avaliados na sedimentação natural, e estas mesmas amostras, em paralelo recebem uma quantidade de CMC-r, que deixa sua viscosidade final cerca de 6 vezes maior. Observa-se que para AgNPs de tamanho de 20 nm a sedimentação é imperceptível para os períodos estudados, tanto em água como em CMC. Entretanto, com o aumento do tempo a sedimentação começa a se formar com visualização expressiva no tempo de 60 dias, principalmente para os tamanhos de

AgNPs de 40 nm e 60 nm. Também vale a pena mencionar que, conforme o tamanho das AgNPs aumenta a sedimentação apresenta-se mais pronunciada e pelo experimento o aumento da viscosidade de 0,9 cP para 6 cP não atenuou a sedimentação.

Figura 62 - Observação experimental da sedimentação ao longo do tempo de AgNPs (20, 40, 60 nm) em água usando fotografia digital quantitativa



Legenda: A Figura A representa todas as soluções no tempo zero ( $t = 0$  dias). As Figuras B, C e D representam os tempos: 15 dias, 30 dias e 60 dias, respectivamente. O primeiro, segundo e terceiro tubo contém as AgNPs em água ultrapura tipo 1, com viscosidade de 0,9 cP a 25°C e os três últimos tubos à direita contém as mesmas AgNPs, em um meio com viscosidade de 6 cP a 25°C, e os tubos de numeração 0 contém água ultrapura tipo 1. Créditos da imagem: Luiz Felipe de Melo Azevedo (DEQUA/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) e Karolyne Barreto de la Torre Ruibal (SEAPQ/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ).

Fonte: (O autor, 2021).

## 5 CONCLUSÃO

Na análise dos estudos envolvendo as AgNPs, tanto em nível químico, farmacológico, biológico e toxicológico, observou-se que os AgNPs apresentam comportamentos e mecanismos distintos do íon prata ( $\text{Ag}^+$ ). Do ponto de vista do controle de qualidade, incluindo todos os estudos envolvendo AgNPs, deve-se considerar a identificação e quantificação dessas espécies.

A síntese que apresentou melhores resultados foi a redução por borohidreto, tendo o bórax e BSA (AgNPs-B-BSA), como agentes estabilizantes. O processo de produção mostrou-se reprodutível. A solução resultante deste processo apresentou espectros no UV-VIS inalterados, durante quatro meses, como também o teor do íon prata livre inferior a 33 ppb.

O ensaio de quantificação de prata por ICP-OES, embora não tenha passado por todas as etapas de uma validação completa, foi considerado satisfatório em todos os parâmetros avaliados para a faixa de trabalho de 32,7 a 1000 ppb, com um limite de detecção de 10,9 ppb. O método não calcula automaticamente o teor de íons prata, porém, se realizado conforme metodologia apresentada, na mesma curva é possível a quantificação da prata total e  $\text{Ag}^+$ .

Em termos de citotoxicidade demonstrou-se que o íon  $\text{Ag}^+$ , sob a forma de nitrato de prata, apresentou alta toxicidade em células CHO na faixa de 0,63 a 10 ppm não sendo tóxico na concentração de 310 ppb testada. Por outro lado, as nossas amostras de AgNPs testadas demonstraram que somente a partir da concentração mássica 10 e 20 ppm apresentaram efeitos citotóxicos nas células de mamífero.

A análise de produtos contendo prata coloidal mostrou de forma clara o risco que o consumidor corre ao ingerir um produto sem o devido controle sanitário. Algumas amostras chegaram a apresentar, cerca de 14 ppm de  $\text{Ag}^+$  livre, o que seria altamente tóxico. Dessa forma, fica muito claro que as AgNPs devem ser produzidas por profissionais capacitados e sempre passando pelo crivo do controle de qualidade e sanitário, para a prevenção de riscos à saúde. Por outro lado, não temos legislação em vigor para regulamentação da fabricação de nanopartículas.

O produto tecnológico é o Procedimento Operacional Padronizado do processo de produção das AgNPs por redução com borohidreto e estabilização da solução resultante com borax e BSA.

Equipes multidisciplinares são essenciais para comprovar e preparar o caminho para o futuro uso de AgNPs em seres vivos.

## 5.1 Perspectiva

Ao final deste projeto esperamos avançar no que tange à correta síntese e caracterização das AgNPs, que poderão ser utilizadas com segurança. A padronização deste produto com segurança sanitária gerará um material com um potencial de produto fármaco inovador, com maior eficácia terapêutica e baixa toxicidade e ausência de efeitos adversos, na dosagem adequada.

No campo das perspectivas, as AgNPs devidamente produzidas e caracterizadas poderão ser utilizadas conjugadas a anticorpos (ou seus fragmentos) e despontam como umas das grandes promessas para radioterapia e a imunoterapia contra o câncer. SANKAR e colaboradores (2013) observaram atividade anticâncer promissora das AgNPs *in vitro* contra células de câncer de pulmão humano (SANKAR *et al.*, 2013).

No cenário atual, os setores farmacêutico e biomédico enfrentam os desafios do aumento contínuo dos micro-organismos patogênicos humanos multirresistentes (MR). As infecções por bactérias MR levam a um aumento significativo na mortalidade, morbidade e custo de tratamentos prolongados. Portanto, o desenvolvimento, modificação ou pesquisa de substâncias antimicrobianas com potencial bactericida contra bactérias MR é uma área prioritária, inclusive recomendada pela OMS. As AgNPs despontam como possível solução para serem usadas no tratamento de micro-organismos resistentes a medicamentos (RAI *et al.*, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a).

A atividade bactericida de AgNPs contra bactérias MR pode ser usada em conjunto com os avanços nas técnicas de impregnação e na tecnologia de polímeros para expandir o leque de aplicações dessas nanopartículas na preservação de alimentos, desinfecção de suprimentos e equipamentos médicos e descontaminação das superfícies. As AgNPs demonstraram ser agentes bactericidas eficazes em diferentes patógenos resistentes a medicamentos de importância clínica, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, *E. coli* O157: H7 resistente à ampicilina e *Streptococcus pyogenes* resistentes à eritromicina (LARA *et al.*, 2010).

Na conclusão deste projeto pretende-se sugerir métodos e parâmetros de controle sanitário para AgNPs, com foco na prevenção de riscos à saúde humana que possam subsidiar, objetivamente, a avaliação da nanossecurança, a tomada de decisões técnicas ou a elaboração de mecanismos regulatórios e, ainda, um método de produção seguro que possibilite o uso destas AgNPs em diversas áreas.

## 6 PRODUTO TECNOLÓGICO

### **NOTA TÉCNICA:**

Este produto intitulado “Produto de produção de nanopartículas de prata seguras para uso biológico” sob o registro número: SOL.00701673.2021 foi avaliado pelo Núcleo de Gestão Tecnológica e Inovação da Fiocruz (GESTEC) e pela 154ª reunião da comissão de patentes da Fiocruz com a decisão de depositar este pedido prioritário no Brasil.

A divulgação deste trabalho deve ser mantida de modo sigiloso até a conclusão do depósito de patente.

### **PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO (POP) DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS) ESFÉRICAS COM DIMENSÃO MÉDIA DE 10 NM VOLTADOS PARA USO BIOLÓGICO**

Autores: MISIRLI, G. M.; ABRANTES, S. M. P.

#### **A. OBJETIVOS**

Padronizar e orientar o processo de fabricação das AgNPs estabilizadas com borax e albumina de soro bovino (BSA) (AgNP-B-BSA), pelo processo de redução do borohidreto em solução aquosa, com a finalidade de fornecer um produto estável, caracterizado e seguro para uso biológico. Produção de 500,00 mL com concentração mássica de 20 mgL<sup>-1</sup>.

#### **B. CAMPO DE APLICAÇÃO**

O presente procedimento aplica-se a todas as fases da produção, controle de processo e parâmetros de controle da qualidade das AgNPs.

### **C. RESPONSABILIDADES**

Cabe ao pesquisador responsável a PRODUÇÃO, CONTROLE DE PROCESSO e o CONTROLE DA QUALIDADE final. A fiel observância dos itens contidos no presente procedimento, zelando pelo cumprimento dos mesmos.

### **D. MATERIAIS E MATÉRIAS-PRIMAS**

- Béquer de 600 mL;
- Placa aquecedora com agitador magnético;
- Peixinho magnético com tamanho de 4 a 5 cm;
- Termômetro;
- Ponto de gás nitrogênio ou hélio (para desoxigenação);
- Balões volumétricos de 500,00 mL, 100,00 mL e 50,00 mL;
- Micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L;
- Borohidreto de sódio P.A. (Pureza  $\geq$  98%);
- Tetraborato dissódico decahidratado (borax) P.A.;
- Citrato de Sódio P.A.;
- Solução de hidróxido de sódio 0,1 M (NaOH 0,1 M);
- Albumina de soro bovino fração V pH 7,0 (BSA) USP ou EP;
- Solução de nitrato de prata 0,1 M ( $\text{AgNO}_3$  0,1 M) (padronizado com fatorado no dia da fabricação);
- Água ultrapura tipo 1 (tipo Milli-Q);

### **E. PROCEDIMENTO DE PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PROCESSO**

Preparar as soluções de processo antes da fabricação das AgNPs-B-BSA conforme Quadro 13:

Quadro 13 - Procedimento de preparo das soluções de processo para fabricação das AgNPs com prazo de validade

Solução	Procedimento	Validade
Borohidreto 0,1 M em NaOH 0,1 M	Pesar 0,19301 g (pureza 98%) de borohidreto em um béquer de 50 mL e dissolver em 10 mL de NaOH 0,1M. Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 50,00 mL, usando sempre NaOH 0,1 M, e avolumar. Observação: Não usar água para dissolver o borohidreto APENAS NaOH 0,1 M.	3 meses
Borax 0,1 M	Pesar 3,8132 g de borax em um béquer de 50 mL e dissolver em cerca de 40 mL de água ultrapura tipo 1. Transferir quantitativamente, para um balão volumétrico de 100,00 mL avolumando com água ultrapura tipo 1.	3 meses
Citrato de Sódio 1% (m/v)	Pesar 0,1000 g de citrato de sódio em um béquer de 10 mL e dissolver em cerca de 5 mL de água ultrapura tipo 1. Transferir quantitativamente, para um balão volumétrico de 10,00 mL avolumando com água ultrapura tipo 1.	Pronto uso (deve ser feita no dia da fabricação)
Padronização da Solução de AgNO <sub>3</sub> 0,1 M	Padronizar a solução de AgNO <sub>3</sub> pelo método de VOLHARD, FAJANS, MOHR ou potenciométrico.	1 semana (validade da padronização)

Fonte: (O autor, 2021).

## F. CALCULO DA QUANTIDADE DE NITRATO DE PRATA PARA SÍNTESE

20 mgL<sup>-1</sup> concentração mássica de prata (Ag 20 mgL<sup>-1</sup>)

Quantidade necessária em 500 mL → 10,00 mg Ag

1 mol de Ag - 107,8682 g

X mols Ag - 0,01 g

→ 9,271 x 10<sup>-5</sup> mol de Ag → 0,09271 mmol Ag

- Cálculo do Volume de AgNO<sub>3</sub> em  $\mu\text{L}$  necessário para a síntese.

$$Volume_{AgNO_3(\mu L)} = \frac{0,09271 \times 1000}{0,1 \times F(\text{Fator } AgNO_3)}$$

Exemplo para uma solução de AgNO<sub>3</sub> 0,1 M com fator de fatoraçoão = 0,9993.

$$Volume_{AgNO_3(\mu L)} = \frac{0,09271 \times 1000}{0,1 \times 0,9993} = 928 \mu\text{L}$$

## G. CALCULO DA QUANTIDADE DE BOROHIURETO (BH<sub>4</sub>)

1 Mol de Ag<sup>+</sup> - 1 Mol de BH<sub>4</sub>

0,09271 mmol Ag → 0,09271 mmol de BH<sub>4</sub>

Aplicando-se 10% a mais da quantidade molar de BH<sub>4</sub>, temos R=1,10 que é igual:

0,09271 x 1,10 = 0,1020 mmol de BH<sub>4</sub>

$$Volume_{BH_4(\mu L)} = \frac{0,1020 \times 1000}{0,1} = 1020 \mu\text{L}$$

## H. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO DE FABRICAÇÃO

Preparar as soluções de processos antes da fabricação das AgNPs, conforme item E, e calcular o volume de  $\text{AgNO}_3$  0,1 M necessário, conforme item F.

Seguir exatamente o procedimento descrito na Tabela 28.

Tabela 28 - Sequência de procedimentos operacionais para fabricação das AgNPs (continua)

Passo	Procedimento	Etapa	Quantidade
1	Lavagem do béquer com detergente para vidraria de laboratório (tipo Extran®). Após enxaguar com $\text{HNO}_3$ 2 % e depois com água ultrapura tipo 1. Deixar secar.	Preparação do Reator	NA
2	Adicionar 495 mL de água ultrapura tipo 1 no béquer de 600 mL, com agitação magnética em 100 rpm. Iniciar purga do oxigênio através de borbulhamento de gás nitrogênio ou hélio, por 15 minutos.	Desoxigenação	NA
3	Iniciar o aquecimento do sistema, até a temperatura de $80^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ , mantendo a agitação em 100 rpm.	Aquecimento	NA
4	Adicionar $\text{AgNO}_3$ 0,1M na <b><u>quantidade calculada</u></b> no item 6.	Precursor da AgNP	928 $\mu\text{L}$ (exemplo)
5	Adicionar o citrato de sódio 1%	Estabilizante das AgNPs	480 $\mu\text{L}$
6	Manter a agitação constante em 400 rpm. A Agitação deve ser intensa e constante, mas <b><u>não deve ocasionar vortex</u></b> , caso esteja, diminuir para 300 rpm a agitação.	Estabilização da Agitação	NA

Tabela 28 - Sequência de procedimentos operacionais para fabricação das AgNPs (conclusão)

<b>7</b>	Adicionar o borohidreto 0,1 M em NaOH 0,1 M- (quantidade calculada no item <b>G</b> )	Início da Formação das AgNPs	1020 $\mu$ L
<b>8</b>	Manter agitação e aquecimento constante 80°C $\pm$ 5°C. Por 30 minutos. <b>ETAPA CRÍTICA</b>	Formação das AgNPs (estado metaestável e coalescência final)	NA <b>(30 minutos)</b>
<b>9</b>	Desligar o aquecimento e manter a agitação diminuindo para 200 rpm, e deixar esfriar naturalmente. Por 30 minutos.	Estabilização das AgNPs e resfriamento gradativo	NA (30 minutos)
<b>10</b>	Adicionar o borax 0,1 M e misturar por mais 30 minutos.	Agente protetor e estabilizante	464 $\mu$ L
<b>11</b>	Com a temperatura abaixo de 35°C, adicionar o BSA com agitação em 200 rpm por 10 minutos.	Agente protetor e estabilizante	2,50 mg
<b>12</b>	Desligar agitação e aguardar esfriar até temperatura ambiente.	Resfriamento e estabilização	NA
<b>13</b>	Transferir quantitativamente todo conteúdo do béquer para um balão volumétrico 500,00 mL e avolumar com água ultrapura tipo 1.	Finalização e compensação do Volume	NA
<b>14</b>	Transferir as AgNPs-B-BSA do balão volumétrico para frasco de vidro (preferencialmente âmbar) ou envolvê-lo com papel alumínio.	Finalização	NA
<b>15</b>	Armazenar em câmara fria 2 - 8°C, <b><u>NÃO CONGELAR.</u></b>	Finalização	NA

Legenda: NA, Não aplicável.

Fonte: (O autor, 2021).

## I. PARAMETROS DE CONTROLE

É necessário, sempre, a cada lote produzido, minimamente verificar os parâmetros de nível críticos (**C**) descritos na Tabela 29.

Tabela 29 - Parâmetros críticos e recomendados de controle de qualidade para a formulação produzida

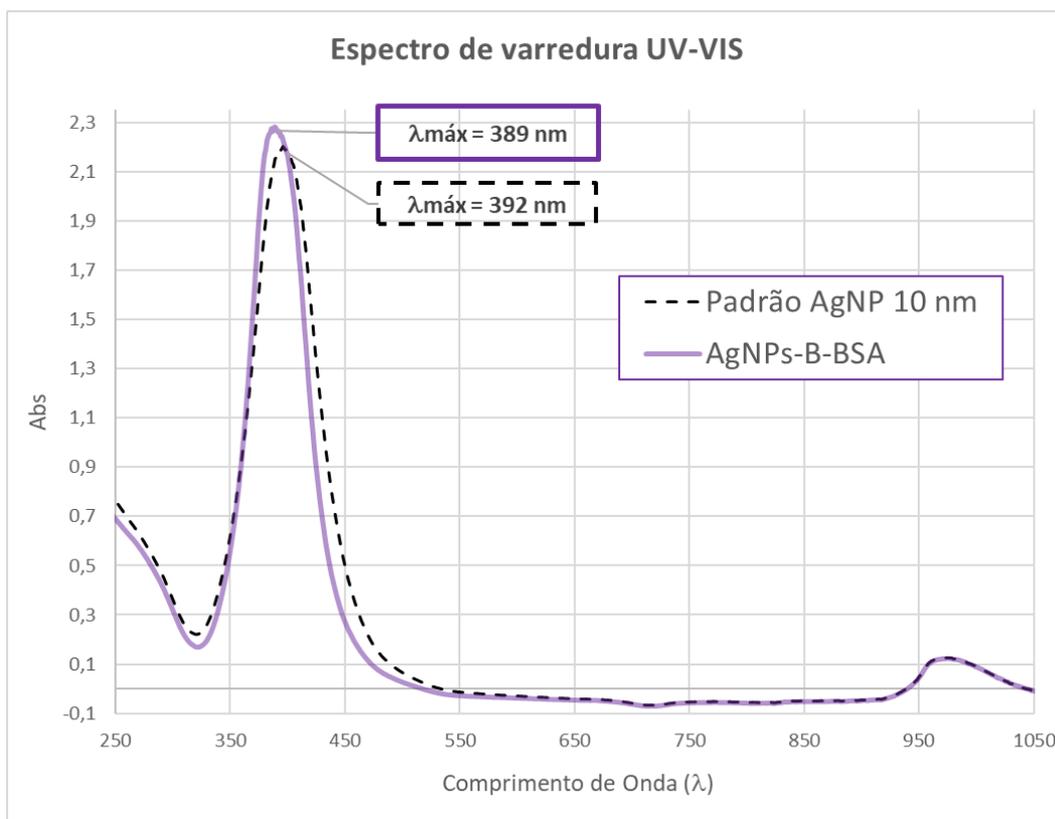
Nível	Parâmetro	Especificação	Valor
<b>C</b>	Teor de Prata Total	(19,5 a 20,5) mgL <sup>-1</sup>	19,95 mgL <sup>-1</sup>
<b>C</b>	Teor de Ag <sup>+</sup> (prata iônica)	< 200 µgL <sup>-1</sup>	< 33 µgL <sup>-1</sup>
<b>C</b>	pH	8,5 a 9,5	9,1
<b>C</b>	Densidade ótica (DO) a $\lambda=390$ nm	> 2,0	2,28
<b>C</b>	Perfil UV-VIS	Perfil correspondente ao padrão de AgNPs esférica de 10 nm com $\lambda_{\text{máx}}$ entre (385 a 395) nm	Conforme e $\lambda_{\text{máx}}= 389$ nm
R	DLS distribuição por número (diluída 10X em água)	(5 a 20) nm	16,69 nm*
R	PZ (diluída 10X em água)	-30 mV a -120 mV	-41,8 mV
R	PDI	< 0,350	0,293
R	TEM	5 a 10 nm	NA

Legenda: Onde: C, representa parâmetros críticos de controle de qualidade; R, representa parâmetros recomendados e informativos; NA, não avaliado.

Fonte: (O autor, 2021).

\* O gráfico de UV-VIS, conforme Figura 63, indica a formação de partículas plasmônicas esféricas, com tamanho menor que 10 nm.

Figura 63 - Espectro de UV-VIS da AgNP-B-BSA produzida



Fonte: (O autor, 2021).

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, D. *et al.* Shape dependent physical mutilation and lethal effects of silver nanoparticles on bacteria. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.
- AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Adv.**, Cambridge, v. 4, n. 8, p. 3974-3983, 2014.
- AJAYAN, P. M.; MARKS, L. D. Quasimelting and phases of small particles. **Physical Review Letters**, New York, v. 60, n. 7, p. 585–587, 15 fev. 1988.
- AN, C. *et al.* Plasmonic silver incorporated silver halides for efficient photocatalysis. **Journal of Materials Chemistry A**, Cambridge, v. 4, n. 12, p. 4336–4352, 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Ministério da Saúde. **RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: ANVISA, 2017. 21 p.
- ARANISHI, K. *et al.* One-step synthesis of magnetically recyclable Au/Co/Fe triple-layered core-shell nanoparticles as highly efficient catalysts for the hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane. **Nano Research**, Beijing, v. 4, n. 12, p. 1233–1241, 2011.
- ASHARANI, P. V. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, Washington, v. 3, n. 2, p. 279–290, 2009.
- BAILEY, D. H. *et al.* The Quest for Pi. **The Mathematical Intelligencer**, Berlin, v. 19, n. 1, p. 50–56, 1997.
- BALAGNA, C. *et al.* Virucidal effect against coronavirus SARS-CoV-2 of a silver nanocluster/silica composite sputtered coating. **Open Ceramics**, Faenza, v. 1, n. June, p. 100006, May 2020.
- BARAM-PINTO, D. *et al.* Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by Silver Nanoparticles Capped with Mercaptoethane Sulfonate. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 20, n. 8, p. 1497–1502, 19 ago. 2009.
- BARKER, K. F. Antibiotic resistance: a current perspective. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v. 48, n. 2, p. 109–124, 24 dez. 2001.
- BARNES, J. **Aristotle**: a very short introduction. Cambridge: Oxford University Press, 2000. v. 42
- BAZILIO, F. S. *et al.* Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**, São Paulo, v. 10, n. 59, p. 60–67, 2012.
- BAZILIO, F. S. **Controle sanitário de materiais plásticos, com ação antimicrobiana pela adição de nanopartículas de prata, destinados ao contato**

**com alimentos**. 126 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – INCQS/FIOCRUZ, 2020.

BENCHIMOL, J. L.; SILVA, A. F. C. da. Ferrovias, doenças e medicina tropical no Brasil da Primeira República. **Historia, Ciências, Saude - Manguinhos. Anais**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, jul./set. 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-59702008000300009&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702008000300009&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 19 out. 2019.

BENDAOUD, H. *et al.* Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of Schinus Molle L. and Schinus Terebinthifolius Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 75, n. 6, p. 454–463, jan. 2010.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 235, p. 337–351, 10 ago. 2016.

BUHR, E. *et al.* Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy in transmission mode. **Measurement Science and Technology**, Bristol, v. 20, n. 8, p. 084025, 1 ago. 2009.

BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES. Avogadro constant. *In*: INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **IUPAC Compendium of Chemical Terminology**, Saint-Cloud, p. 5–216. 2019.

CAI, R.; CHEN, C. The Crown and the Scepter: Roles of the Protein Corona in Nanomedicine. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 31, n. 45, p. 1805740, 27 nov. 2019.

CAPUTO, L. *et al.* Laurus nobilis: Composition of essential oil and its biological activities. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 6, p. 930, jun. 2017.

CARLSON, C. *et al.* Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 112, n. 43, p. 13608–13619, 30 out. 2008.

CASTILLO, P. M. *et al.* Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands. **Nanomedicine**, London, v. 3, n. 5, p. 627–635, out. 2008.

CEDERVALL, T. *et al.* Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 7, p. 2050–2055, 13 fev. 2007.

CHAKRABORTY, S.; PANIGRAHI, P. K. Stability of nanofluid: A review. **Applied Thermal Engineering**, Oxford, v. 174, n. December 2019, p. 115259, jun. 2020.

CHAMBERS, C. W.; PROCTOR, C. M.; KABLER, P. W. Bactericidal Effect of Low Concentrations of Silver. **Journal American Water Works Association**, Denver, v. 54, n. 2, p. 208–216, fev. 1962.

CHANG, S. *et al.* Evidence for the growth mechanisms of silver nanocubes and nanowires. **Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 115, n. 16, p. 7979–7986, 28 abr. 2011.

COLLIER, A. C.; PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 281–287, jul. 2003.

CRESPO, P. *et al.* Magnetism in nanoparticles: tuning properties with coatings. **Journal of Physics: Condensed Matter**, Bristol, v. 25, n. 48, p. 484006, 4 dez. 2013.

CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. **Chemical Reviews**, Easton, v. 104, n. 9, p. 3893–3946, set. 2004.

DANAEI, M. *et al.* **Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems** **Pharmaceutics**, Basel, maio 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4923/10/2/57>. Acesso em: 16 out. 2019.

DAVIS, J. R. (ed.). **Metals Handbook Desk Edition**. Novelty: ASM International, 1998.

DELGADO, A.; GONZÁLEZ-CABALLERO, F.; SALCED, J. On the zeta potential of spherical polystyrene particles from electrophoresis theories. **Acta Polymerica**, Beijing, v. 37, n. 6, p. 361–364, 1986.

DU, T. *et al.* Glutathione-Capped Ag<sub>2</sub>S Nanoclusters Inhibit Coronavirus Proliferation through Blockage of Viral RNA Synthesis and Budding. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 10, n. 5, p. 4369–4378, 7 fev. 2018.

DUARTE DE SOUZA, G. *et al.* Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación Química**, Coyoacán, v. 24, n. 1, p. 14–16, jan. 2013.

DURÁN, N. *et al.* Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 206–213, 2018.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression: I. **Biometrika**, London, v. 37, n. 3/4, p. 409, dez. 1950.

EHL, R. G.; IHDE, A. J. Faraday's electrochemical laws and the determination of equivalent weights. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 31, n. 5, p. 226, maio 1954.

ELECHIGUERRA, J. L. *et al.* Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 3, n. 1, p. 6, 2005.

ESMAILZADEH, N. A Comparison of Five Bootstrap and Non-Bootstrap Levene-Type Tests of Homogeneity of Variances. **Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science**, Shiraz, v. 43, n. 3, p. 979–989, 24 jun.

2019.

EUROPEAN COMMISSION. **O que são nanomateriais? Comissão Europeia abre novos caminhos com uma definição comum.** Bruxelas: European Commission, 2011. Disponível em: [https://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-11-1202\\_pt.htm](https://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_pt.htm). Acesso em: 03 nov. 2020.

FAN, X.; ZHENG, W.; SINGH, D. J. Light scattering and surface plasmons on small spherical particles Light: Science and Applications. **Light: Science & Applications**, [London], London, v. 3, p. e179, 2014.

FARMACOPEIA homeopática brasileira. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 364.

FARRELL, E.; BROUSSEAU, J.-L. **Guide for DLS sample preparation.** Holtsville: Nova Instruments, [2017].

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Nanotechnology:** a report of the U.S. food and drug administration Nanotechnology Considerations for the EPA and FDA. [Washington: FDA], 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology. **Biotechnology Law Report**, Washington, v.30, p.613-616, 2014.

FELDHEIM, D. L.; FOSS, C. A. (ed.). **Metal nanoparticles:** synthesis, characterization, and applications. New York: Marcel Dekker, 2002. v. 1. p. 22.

FIEVET, F.; LAGIER, J. P. Homogeneous and heterogeneous nucleations in the polyol process for the preparation of micron and submicron size metal particles. **Solid State Ionics**, Stuttgart, v. 32–33, p. 198–205, 1989.

FOLDBJERG, R.; DANG, D. A.; AUTRUP, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 85, n. 7, p. 743–750, 29 jul. 2011.

FROST, J. **Regression Analysis:** an intuitive guide for using and interpreting linear models. [S.l.]: Statistics By Jim Publishing, 2019.

GALDIERO, S. *et al.* Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 10, p. 8894–8918, 24 out. 2011.

GHOSH, S. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using Dioscorea bulbifera tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 7, p. 483–496, 2012.

GOGOI, S. K. *et al.* Green Fluorescent Protein-Expressing Escherichia coli as a Model System for Investigating the Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles. **Langmuir**, Washington, v. 22, n. 22, p. 9322–9328, out. 2006.

GORDON, O. *et al.* Silver coordination polymers for prevention of implant infection:

Thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 10, p. 4208–4218, 2010.

GOTO, K. *et al.* Spectrophotometric determination of manganese with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and a non-ionic surfactant. **Talanta**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 752–753, 1977.

GREULICH, C. *et al.* The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. **RSC Advances**, Cambridge, v. 2, n. 17, p. 6981, 2012.

GRILLET, N. **Réponse optique de nano-objets uniques d'argent** : couplage plasmonique et photooxydation. 2011. 215 p. Thèse (Doctorat en Physique et Astrophysique) - Université Claude Bernard Lyon I, Villeurbanne, 2011.

GRILLET, N. *et al.* Photo-Oxidation of individual silver nanoparticles: a real-time tracking of optical and morphological changes. **The Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 117, n. 5, p. 2274-2282, 7 fev. 2013.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticle technology for drug delivery**. London: Taylor & Francis Group, 2006. v. 159.

GURUNATHAN, S. *et al.* Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. **Biomaterials**, Guilford, v. 30, n. 31, p. 6341–6350, out. 2009.

HALAS, N. J. *et al.* Plasmons in Strongly Coupled Metallic Nanostructures. **Chemical Reviews**, Easton, v. 111, n. 6, p. 3913–3961, 8 jun. 2011.

HALL, J. B. *et al.* Characterization of nanoparticles for therapeutics. **Nanomedicine**, London, v. 2, n. 6, p. 789–803, dez. 2007.

HAYNES, W. M. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 97th. ed. Boca Raton: CRC Press, 2017.

HINZE, W. L.; PRAMAURO, E. A Critical Review of Surfactant-Mediated Phase Separations (Cloud-Point Extractions): Theory and Applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 24, n. 2, p. 133–177, jan. 1993.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 89, n. 4, p. 1095–109, 2006.

HUANG, H. *et al.* An evaluation of blood compatibility of silver nanoparticles. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. May, p. 1–15, 2016.

HUANG, J. *et al.* Influence of pH on the stability characteristics of nanofluids. *In*: SYMPOSIUM ON PHOTONICS AND OPTOELECTRONICS, SOPO. 2009, Wuhan. **Proceedings of a meeting held**. Wuhan: IEEE, 2009.

HWANG, I. *et al.* Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. **FEBS Journal**, Oxford, v. 279, n. 7, p. 1327–1338, abr. 2012.

IM, S. H. *et al.* Large-scale synthesis of silver nanocubes: The role of HCl in promoting cube perfection and monodispersity. **Angewandte Chemie - International Edition**, Weinheim, v. 44, n. 14, p. 2154–2157, 29 mar. 2005.

INDIANA UNIVERSITY. **Lattice Structures in Crystalline Solids**. Disponível em: <https://iu.pressbooks.pub/openstaxchemistry/chapter/10-6-lattice-structures-in-crystalline-solids/>. Acesso em: 4 nov. 2020.

INMETRO. **Doq-Cgcre-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Brasília: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2016. 31 p.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 9. ed. Brasília: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2020.

JAIN, J. *et al.* Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 6, n. 5, p. 1388–1401, 5 out. 2009.

JEREMIAH, S. S. *et al.* Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Kidlington, v. 533, n. 1, p. 195–200, nov. 2020.

JIN, R. Photoinduced Conversion of Silver Nanospheres to Nanoprisms. **Science**, New York, v. 294, n. 5548, p. 1901–1903, 30 nov. 2001.

JORTNER, J. Cluster size effects. **Zeitschrift fr Physik D Atoms, Molecules and Clusters**, Heidelberg, v. 24, n. 3, p. 247–275, set. 1992.

KALFAGIANNIS, N. *et al.* Plasmonic silver nanoparticles for improved organic solar cells. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, Amsterdam, v. 104, p. 165–174, 2012.

KASZUBA, M. *et al.* Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 10, n. 5, p. 823–829, 2008.

KASZUBA, M. *et al.* High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, London, v. 368, n. 1927, p. 4439–4451, 2010.

KEYER, K.; IMLAY, J. A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 24, p. 13635–13640, 1996.

KHANDELWAL, N. *et al.* Application of silver nanoparticles in viral inhibition: A new

hope for antivirals. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, Bucharest, v. 9, n. 1, p. 175–186, 2014.

KHAYDAROV, R. R. A. *et al.* Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 11, n. 5, p. 1193–1200, jul. 2009.

KIM, D.; JEONG, S.; MOON, J. Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. **Nanotechnology**, Bristol, v. 17, n. 16, p. 4019–4024, 28 ago. 2006.

KITTLER, S. *et al.* Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 22, n. 16, p. 4548–4554, 24 ago. 2010.

KLIPPSTEIN, R. *et al.* Silver Nanoparticles Interactions with the immune system: implications for health and disease. *In*: POZO. David (ed.). **Silver Nanoparticles**. [London]: InTech, 2010. Cap. 16. p. 309–324.

KODURU, J. R. *et al.* Phytochemical-assisted synthetic approaches for silver nanoparticles antimicrobial applications: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 256, n. 2017, p. 326–339, 2018.

KORANI, M. *et al.* Effects of silver nanoparticles on human health. **European Journal of Nanomedicine**, Basel v. 7, n. 1, p. 51–62, 1 jan. 2015.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, Huntington, v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095505, 1 jun. 2018.

KUPCSIK, L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. **Methods in molecular biology**, Clifton, v. 740, p. 13–19, 2011.

LARA, H. H. *et al.* Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 615–621, 22 abr. 2010.

LAXMINARAYAN, R. *et al.* Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 13, n. 12, p. 1057–1098, dez. 2013.

LEVARD, C. *et al.* Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 46, n. 13, p. 6900–6914, 16 jul. 2012.

LI, M. *et al.* Simultaneous reduction of nitrate and oxidation of by-products using electrochemical method. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 171, n. 1–3, p. 724–730, nov. 2009.

LIANG, H. *et al.* Controlled Synthesis of Uniform Silver Nanospheres. **The Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 114, n. 16, p. 7427–7431, 29 abr. 2010.

LIN, P.-C. *et al.* Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 711–726, jul. 2014.

LIU, J. *et al.* Chemical Transformations of Nanosilver in Biological Environments. **ACS Nano**, Washington, v. 6, n. 11, p. 9887–9899, 27 nov. 2012a.

LIU, J. F. *et al.* Triton X-114 based cloud point extraction: A thermoreversible approach for separation/concentration and dispersion of nanomaterials in the aqueous phase. **Chemical Communications**, Washington, n. 12, p. 1514–1516, 2009.

LIU, J. F. *et al.* Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. **TRAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 33, p. 95-106, 2012b.

LIU, J.; HURT, R. H. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 44, n. 6, p. 2169–2175, 15 mar. 2010.

LIU, J.; JIANG, G. **Silver Nanoparticles in the Environment**. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2015. v. 1. p 44.

LIU, W. *et al.* Interaction of silver nanoparticles with metallothionein and ceruloplasmin: impact on metal substitution by Ag(i), corona formation and enzymatic activity. **Nanoscale**, Cambridge, v. 9, n. 19, p. 6581–6594, 2017.

LOWRY, G. V. *et al.* Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. **Environmental Science: Nano**, London, v. 3, n. 5, p. 953–965, 2016.

LUO, W.; PENNYCOOK, S. J.; PANTELIDES, S. T. S-electron ferromagnetism in gold and silver nanoclusters. **Nano Letters**, Washington, v. 7, n. 10, p. 3134–3137, 2007.

LUO, Y.-H.; CHANG, L. W.; LIN, P. Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, n. Figure 1, p. 1–12, 2015.

MA, H. *et al.* Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by a Novel Electrochemical Method. **ChemPhysChem**, Weinheim, v. 5, n. 1, p. 68–75, 23 jan. 2004.

MANNI, L. S. *et al.* Beyond freezing: Amorphous water in biomimetic soft nanoconfinement. **arXiv**, Ithaca, p. 11–13, 2018.

MARCATO, P. D. *et al.* In Vivo Evaluation of Complex Biogenic Silver Nanoparticle and Enoxaparin in Wound Healing. **Journal of Nanomaterials**, New York, v. 2015, p. 1–10, 2015.

MARKOWSKA, K. *et al.* The Effect of Silver Nanoparticles on *Listeria*

monocytogenes PCM2191 Peptidoglycan Metabolism and Cell Permeability. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 67, n. 3, p. 315–320, 2018.

MARKOWSKA, K.; GRUDNIAK, A. M.; WOLSKA, K. I. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 60, n. 4, p. 523–530, 1 jan. 2013.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F. *et al.* Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. **Biofouling**, Abingdon, v. 29, n. 6, p. 651–660, jul. 2013.

MATHUR, P. *et al.* Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, London, v. 46, n. sup1, p. 115–126, 31 out. 2018.

MATSUMURA, Y. *et al.* Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 4278–4281, jul. 2003.

MEI, L. *et al.* Bioconjugated nanoparticles for attachment and penetration into pathogenic bacteria. **Biomaterials**, Guilford, v. 34, n. 38, p. 10328–10337, dez. 2013.

MERGHNI, A. *et al.* Antibacterial and antibiofilm activities of Laurus nobilis L. essential oil against Staphylococcus aureus strains associated with oral infections. **Current Research in Translational Medicine**, Issy-les-Moulineaux, v. 64, n. 1, p. 29–34, jan. 2016.

MIDELET, J. *et al.* The Sedimentation of Colloidal Nanoparticles in Solution and Its Study Using Quantitative Digital Photography. **Particle and Particle Systems Characterization**, Weinheim, v. 34, n. 10, p. 1700095, out. 2017.

MIE, G. Sättigungsstrom und Stromkurve einer schlecht leitenden Flüssigkeit. **Annalen der Physik**, Weinheim, v. 331, n. 8, p. 597–614, 1908.

MISIRLI, G. M.; SRIDHARAN, K.; ABRANTES, S. M. P. A review on nanostructured silver as a basic ingredient in Medicine: Physico-chemical parameters and characterization. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, Frankfurt, v. 12, p. 440–461, 2021.

MITRANO, D. M. *et al.* Silver nanoparticle characterization using single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) and asymmetrical flow field flow fractionation ICP-MS (AF4-ICP-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 27, n. 7, p. 1131, 2012.

MOHR, P. J.; NEWELL, D. B.; TAYLOR, B. N. CODATA recommended values of the fundamental physical constants: 2014. **Reviews of Modern Physics**, New York, v. 88, n. 3, p. 035009, 26 set. 2016.

MOLLEMAN, B.; HIEMSTRA, T. Surface Structure of Silver Nanoparticles as a Model for Understanding the Oxidative Dissolution of Silver Ions. **Langmuir**, Washington, v.

31, n. 49, p. 13361–13372, 15 dez. 2015.

MOORES, A.; GOETTMANN, F. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. **New Journal of Chemistry**, Cambridge, v. 30, n. 8, p. 1121, 2006.

MORGAN, H.; GREEN, N. G. **AC Electrokinetics: colloids and nanoparticles**. Baldock: Research Studies Press, 2003.

MORI, Y. *et al.* Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus. **Nanoscale Research Letters**, New York, v. 8, n. 1, p. 93, 2013.

MORONES, José; GALLEGOS, S. Plata, metal con brillante futuro en la medicina. **Ciencia y Desarrollo**, Lima, p. 18–23, 2014.

MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, Bristol, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 1 out. 2005.

MORONES, R. R. El uso de la plata en los antibióticos del futuro. **Revista Digital Universitaria**, Coyoacán, v. 10, n. 10, p. 1–10, 2009.

MORRIS, D. *et al.* Antiviral and Immunomodulatory Activity of Silver Nanoparticles in Experimental RSV Infection. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 8, p. 732, 8 ago. 2019.

MUHS, A. *et al.* Virulence Inhibitors from Brazilian Peppertree Block Quorum Sensing and Abate Dermonecrosis in Skin Infection Models. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 42275, 10 set. 2017.

MUNGER, M. A. *et al.* In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, New York, v. 10, n. 1, p. 1–9, jan. 2014.

NEAGU, M. *et al.* Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 91, n. 3, p. 1031–1048, 2017.

NEWNHAM, R. E. Essentiality of boron for healthy bones and joints. **Environmental Health Perspectives**, North Carolina, v. 102, n. suppl 7, p. 83–85, nov. 1994.

NICNAS. **Nano Silver - NICNAS Nanomaterial health hazard review: health effects of silver nanoparticles**. Disponível em: <https://www.nicnas.gov.au/chemical-information/factsheets/chemical-name/Nano-Silver>. Acesso em: 9 out. 2019a.

NICNAS. **Nanomaterials and nanotechnology**. Disponível em: <https://www.nicnas.gov.au/chemical-information/Topics-of-interest2/subjects/nanomaterials-nanotechnology>. Acesso em: 9 nov. 2019b.

OMS. Boron in Drinking-water Background. **Health criteria and other supporting information**, Geneva, v. 2, p. 1–17, 2003.

PACIONI, N. L. *et al.* Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. *In*: ALARCON, E. I.; GRIFFITH, M.; UDEKWU, K. I. (ed.). **Silver Nanoparticle Applications**. 1. ed. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 15–26.

PADILHA, A. F. **Microscopia eletrônica de transmissão**. EPUSP: São Paulo 2001.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 6, p. 1712–1720, 15 mar. 2007.

PAREEK, V.; GUPTA, R.; PANWAR, J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. **Materials Science and Engineering: C, Materials for biological applications**, Amsterdam, v. 90, n. April, p. 739–749, set. 2018.

PARK, E.-J. *et al.* Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 872–878, abr. 2010.

PARK, H.-J. *et al.* Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. **Water Research**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 1027–1032, mar. 2009.

PAUNOVIC, M. Electrochemical deposition. *In*: BARD, A.J.; STRATMANN, M. (ed.). **Encyclopedia of Electrochemistry**. Weinheim: Wiley VCH, 2007. v. 5

PERETYAZHKO, T. S.; ZHANG, Q.; COLVIN, V. L. Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 48, n. 20, p. 11954–11961, 21 out. 2014.

PIAO, M. J. *et al.* Silver nanoparticles down-regulate Nrf2-mediated 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 through inactivation of extracellular regulated kinase and protein kinase B in human Chang liver cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 207, n. 2, p. 143–148, nov. 2011.

PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 108, n. 3, p. 945–951, 1 jan. 2004.

PINES, D. Collective Energy Losses in Solids. **Reviews of Modern Physics**, New York, v. 28, n. 3, p. 184–198, 1 jul. 1956.

POLTE, J. *et al.* Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: Analogies and differences to the growth of gold nanoparticles. **ACS Nano**, Washington, v. 6, n. 7, p. 5791–5802, 2012.

RAI, M. K. *et al.* Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 112, n. 5, p. 841–852, maio 2012.

RAKIC', A. D. *et al.* Optical properties of metallic films for vertical-cavity optoelectronic devices. **Applied Optics**, Easton, v. 37, n. 22, p. 5271, ago. 1998.

RAO, C. N. R. *et al.* Metal nanoparticles and their assemblies. **Chemical Society Reviews**, London, v. 29, n. 1, p. 27–35, 2000.

REVERBERI, A. P. *et al.* Systematical analysis of chemical methods in metal nanoparticles synthesis. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, New York, v. 50, n. 1, p. 59–66, 25 jan. 2016.

RIAZ AHMED, K. B. *et al.* Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 38, p. 179–192, fev. 2017.

RIHN, B. (ed.). **Biomedical application of nanoparticles**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2018.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, London, v. 35, n. 7, p. 583, 2006.

ROGERS, J. V. *et al.* A Preliminary Assessment of Silver Nanoparticle Inhibition of Monkeypox Virus Plaque Formation. **Nanoscale Research Letters**, New York, v. 3, n. 4, p. 129–133, 9 abr. 2008.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B. Antimicrobial activity and action of silver. *In*: ELLIS, G. P.; LUSCOMBE, D.K. (ed.). **Progress in Medicinal Chemistry**. Amsterdã: Elsevier Science, 1994. v. 31. p. 351–370. Cap. 7.

RYAN, B. F.; JOINER, B. L.; JNR., T. A. R. **MINITAB Handbook**. 2. ed. Boston: Duxbury Press, 1985.

SABARATNAM, V. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 8, n. 5, p. 4399, nov. 2013.

SADEGHI, B. *et al.* Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates. **Advanced Powder Technology**, Utrecht, v. 23, n. 1, p. 22–26, jan. 2012.

SANKAR, R. *et al.* *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 108, p. 80–84, 1 ago. 2013.

SARTORI, E. R. ; SANTOS, V. B. ; TRENCH, A. B. ; FATIBELLO, O. Construção de uma célula eletrolítica a partir de materiais de baixo custo para o ensino de eletrólise. **Química Nova Escola**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 107–111, 2013.

SHU, L. *et al.* Effect of multiple cations in the feed solution on the performance of forward osmosis. **Desalination and Water Treatment**, Hopkinton, v. 54, n. 4-5, p. 845-852, 1 maio 2015.

SHU, L.; WU, S.; JEGATHEESAN, V. Directly observe sodium chloride aggregates waltzing through dilute solutions. *In*: SHU, L. *et al.* (ed.). **Solutions to environmental challenges through innovations in research**. New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 2013. p. 213–223.

SILVA, A. L. *et al.* Nanoparticle impact on innate immune cell pattern-recognition receptors and inflammasomes activation. **Seminars in Immunology**, London, v. 34, n. August, p. 3-24, dez. 2017.

SINGH, M. *et al.* Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, Bucharest, v. 3, n. 3, p. 115–122, 2008.

SONG, J. G.; LEE, S. H.; HAN, H.-K. The stabilization of biopharmaceuticals: current understanding and future perspectives. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, Dordrecht, v. 47, n. 6, p. 475-496, 26 nov. 2017.

SPERONI, E. *et al.* Gastroprotective effect and antioxidant properties of different laurus nobilis L. Leaf extracts. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 14, n. 5, p. 499–504, maio 2011.

SPESHOCK, J. L. *et al.* Interaction of silver nanoparticles with Tacaribe virus. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 8, p. 1-9, 2010.

SRIDHARAN, K. *et al.* Single step synthesis and optical limiting properties of Ni–Ag and Fe–Ag bimetallic nanoparticles. **Optical Materials**, Amsterdam, v. 35, n. 5, p. 860–867, mar. 2013.

STAMPLECOSKIE, K. G.; SCAIANO, J. C. Light Emitting Diode Irradiation Can Control the Morphology and Optical Properties of Silver Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 132, n. 6, p. 1825–1827, 17 fev. 2010.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, New York, v. 358, n. 9276, p. 135–138, 2001.

THOMAS, A.; TORRES TAPIA, E. C.; RAMIREZ, A. Las nanopartículas – Nanomateriales de tantas aplicaciones asombrosas en nanomedicina y nanotecnología biomédica. **J. Nanocs. Moletrón**, Puebla, v. 13, n. 1, p. 2315–2326, 2015.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, London, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TILLEY, R. J. D. **Crystals and Crystal Structures**. [Hoboken] John Wiley and Sons Inc., 2006. v. 1.

TODAR, K. Structure and Function of Bacterial Cells. *In*: TODAR, K. **Text book of bacteriology**. Madison: Kenneth Todar, PhD, [2020] Disponível em:

[http://www.textbookofbacteriology.net/structure\\_7.html](http://www.textbookofbacteriology.net/structure_7.html). Acesso em: 21 ago. 2020.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, London, v. 11, n. 2, p. 55, 1951.

TYNER, K.; SADRIEH, N. Considerations When Submitting Nanotherapeutics to FDA/CDER for Regulatory Review. *In*: MCNEIL, S. E. (ed.). **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**. Totowa: Humana Press, 2011. (Methods in Molecular Biology, v. 697).

VALVERDE, R. Doenças Negligenciadas. **Agência Fiocruz de Notícias**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doencas-negligenciadas>. Acesso em: 21 dez. 2020.

VAN DONG, P. *et al.* Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. **International Nano Letters**, Kermanshah, v. 2, n. 1, p. 9, 21 dez. 2012.

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

VEJA. **Planta brasileira pode desarmar bactéria resistente a antibiótico**. 2017. Disponível em: <https://veja.abril.com.br/ciencia/planta-brasileira-pode-desarmar-bacteria-resistente-a-antibiotico/>. Acesso em: 12 dez. 2020.

WAKSHLAK, R. B.-K.; PEDAHZUR, R.; AVNIR, D. Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the “zombies” effect. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 1, p. 9555, 23 ago. 2015.

WANG, M. *et al.* Ag@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles for multi-modal imaging-guided chemo-photothermal synergistic targeting for cancer therapy. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1086, p. 122–132, dez. 2019.

WANG, Z. L. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 104, n. 6, p. 1153–1175, fev. 2000.

WEINBERG, H.; GALYEAN, A.; LEOPOLD, M. Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 1, jan. 2011.

WEINER, B. B.; TSCHARNUTER, W. W.; FAIRHURST, D. Zeta Potential: a new approach. *In*: CANADIAN MINERAL ANALYSTS MEETING, 1993, Winnipeg. [Anais]... Winnipeg: Brookhaven Instruments Corporation Holtsville, 1993. p. 1–12.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis**. Geneva: WHO, 2017. Disponível em:

[https://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/prioritization-of-pathogens/en/](https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en/). Acesso em: 15 ago. 2020.

WILEY, B. *et al.* Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. **Chemistry - A European Journal**, v. 11, n. 2, p. 454–463, 2005.

WILEY, B. J. *et al.* Maneuvering the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanostructures through Shape-Controlled Synthesis. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 110, n. 32, p. 15666–15675, ago. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. 4. ed. Geneva: WHO Press, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. No time to wait. **Artforum International**. Geneva, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization model list of essential medicines**. 21st ed. Geneva: WHO Press, 2019.

WU, C. Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 6, p. 2873, nov. 2011.

WUITHSCHICK, M. *et al.* Size-Controlled Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticles Based on Mechanistic Understanding. **Chemistry of Materials**, v. 25, n. 23, p. 4679-4689, 10 dez. 2013.

YASMIM ALMEIDA LIMA *et al.* **Potencial antimicrobiano da Schinus terebinthifolius raddi (Aroeira da praia) e sua utilização para aplicações biomédicas**. In: INTERNATIONAL NURSING CONGRESS, 2017, Hong Kong. [Anais]... Hong Kong: PolyU, 2017. em: <https://eventos.set.edu.br/index.php/cie/article/viewFile/5794/2011>. Acesso em: 15 ago 2020.

YEN, C.-W. *et al.* Multicolored silver nanoparticles for multiplexed disease diagnostics: distinguishing dengue, yellow fever, and Ebola viruses. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 15, n. 7, p. 1638-1641, jul. 2015.

ZHANG, Q. *et al.* A Systematic Study of the Synthesis of Silver Nanoplates: Is Citrate a “Magic” Reagent? **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 133, n. 46, p. 18931-18939, 23 nov. 2011a.

ZHANG, W. *et al.* Modeling the Primary Size Effects of Citrate-Coated Silver Nanoparticles on Their Ion Release Kinetics. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 45, n. 10, p. 4422–4428, 15 maio 2011b.

ZHANG, X.-F. *et al.* Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1534, 13 set. 2016.

ZORN, M. E.; GIBBONS, R. D.; SONZOGNI, W. C. Weighted Least-Squares Approach To Calculating Limits of Detection and Quantification by Modeling Variability as a Function of Concentration. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 15, p. 3069–3075, ago. 1997.

## ANEXO A – CERTIFICADO DO PADRÃO DE PRATA 1000 ppm MRC

**Certificate of Analysis**

**Certipur® Certified Reference Material**

**Producer:** Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany

**Accreditation:** Merck KGaA, Darmstadt, Germany is accredited by the German accreditation authority DAkkS as registered reference material producer D-RM-15185-01-00 in accordance with **ISO Guide 34** and registered calibration laboratory D-K-15185-01-00 according to **DIN EN ISO/IEC 17025**.



**Description of CRM:** Silver ICP Standard 1000 mg/l Ag

**Ordering number:** 1.70352.0100

**Lot number:** HC98849452

**Composition:** AgNO<sub>3</sub> in HNO<sub>3</sub> 2-3% Suprapur®

**Certified value and uncertainty:** **986 mg/kg Ag ± 5 mg/kg Ag**  
Mass fraction  $w(t_0)$  of element with expanded uncertainty  $U_{CRM}$

**Method of analysis:** Inductively coupled plasma optical emission spectrometry ICP-OES

**Traceability:** This reference material is directly traceable to the corresponding primary **NIST SRM® 3151, lot 160729**.  
NIST: National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA

**Preparation:** This reference material is prepared gravimetrically from high purity silver nitrate dissolved in nitric acid Suprapur® and diluted with filtered (0.22 µm) high purity water (18 MΩcm). All balances are regularly calibrated.

**Storage:** Store at +15 °C to +25 °C tightly closed in the original container.

**Application and correct use:** This reference material is intended for use as a calibration standard in element analysis. Shake well before use and never pipet directly from the original container. Details concerning the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken are provided in the material safety data sheet accompanying the material.

**Date of release:** 2018/04/18

**Expiry date:** 2022/04/30

**Certificate Version:** 1 issued on 2018/04/18



*A. Yildirim*  
Dipl.-Ing. Ayfer Yildirim  
(Laboratory Manager)

Fonte: (O autor, 2021).

## ANEXO B – PLANILHA PARA AVALIAÇÃO DE PREMISSAS BAZILIO ET AL (2012)

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
2	Ministério da Saúde <b>FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ</b> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde										
3											
4	<b>AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA</b>										
5											
6											
7	AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA										
8											
9	<b>Dados da Curva Analítica</b>										
10	Análise:					Prata por ICP-OES					
11	Data de Confeção da Curva:					05/01/2021		Curva N°:		AGNP-009	
12	Replicatas por Nível (k):					3		N° de Níveis (n):		6	
13	Equipamento:					Perkin Optima 7000DV		Responsável:		Gabriel Mustafá Misirli	
14											
15	<b>Tabela de dados originais</b>										
16	<b>Nível (k)</b>	<b>i</b>	<b>Conc. ppb</b>	<b>Resposta Intensidade</b>							
17	1	01	9,98	6,352	<b>Avaliação de Valores Extremos</b> (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos) Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.						
18		02	9,98	7,146							
19		03	9,98	7,75							
20	2	04	99,8	85,954							
21		05	99,8	89,564							
22		06	99,8	91,297							
23	3	07	249,5	225,631							
24		08	249,5	233,577							
25		09	249,5	234,008							
26	4	10	499	451,017							
27		11	499	462,209							
28		12	499	460,965							
29	5	13	748,5	673,9							
30		14	748,5	699,326							
31		15	748,5	703,023							
32	6	16	998	926,232							
33		17	998	926,596							
34		18	998	932,078							
35											
36											
37											
38											
39											
40	<b>Normalidade dos Resíduos</b>										
41	(Teste de Ryan-Joiner)										
42	Req			0,96							
43	Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )			0,94							
44											
45	<b>Autocorrelação dos Resíduos</b>										
46	(Teste de Durbin-Watson)										
47	d (calculado)			2,32							
48	dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$			1,13							
49	dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$			1,38							
50											
51	<b>Homogeneidade da Variância dos Resíduos</b>										
52	(Teste de Brown-Forsythe)										
53	Variância Combinada			2,00E+01							
54	$t_i$ calculado			-8,45E-01							
55	$t_{tabelado}$ ( $\alpha = 0,05$ )			2,13E+00							
56	p			4,12E-01							
57											
58	<b>Resumo da Avaliação</b>										
59	Homogeneidade de variância										
60	Há Homocedasticidade			$p > 0,05$							
61	Regressão e Teste de Desvio de Linearidade										
62	A regressão é significativa			$p < 0,001$							
63	Não há desvio de Linearidade			$p > 0,05$							
64	Autocorrelação dos Resíduos ( $\alpha = 0,05$ )										
65	Não há autocorrelação			$d > dU$							
66	Teste de Normalidade ( $\alpha = 0,05$ )										
67	Segue a Normal			$Req > Rcrit$							
68											
69											
70											
71											
72											
73											
74											
75											
76											
77											
78											
79											
80											
81											
82											
83											
84											
85											
86											
87											
88											
89											
90											
91											
92											
93											
94											
95											
96											
97											
98											
99											
100											

**Curva Analítica Final**

**Gráfico de Resíduos**

<b>Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX)</b>			
Coeficiente Angular (b):	9,34E-01	Coeficiente Linear (a):	-3,43E+00
r	0,9999	R <sup>2</sup>	0,9998
N	17	Graus de Liberdade	15

<b>Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)</b>			
Limite de Detecção	1,09E+01	Limite de Quantificação	3,27E+01

<b>ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)</b>					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,86E+06	1,86E+06	9,31E+04	7,25E-30
resíduos	15	3,00E+02	2,00E+01		
Ajuste	4	1,36E+02	3,41E+01	2,29E+00	1,25E-01
erro puro	11	1,64E+02	1,49E+01		
total	16	1,86E+06			

**Observações**

Fonte: (O autor, 2021).

## ANEXO C – RELATÓRIO DE DISTRIBUIÇÃO POR INTENSIDADE DA AMOSTRA PD10

### Size Distribution Report by Intensity

v2.2



#### Sample Details

Sample Name: 20200922\_2086\_PD20\_1\_10 media

SOP Name: mansettings.nano

General Notes: Average result created from record number(s): 1387 1388 1389 1390 1391

File Name:	Gabriel_NPprata.dts	Dispersant Name:	ÁGUA (NANO PRATA)
Record Number:	1405	Dispersant RI:	1,332
Material RI:	1,33	Viscosity (cP):	1,0005
Material Absorbtion:	3,990	Measurement Date and Time:	quinta-feira, 10 de dezembr...

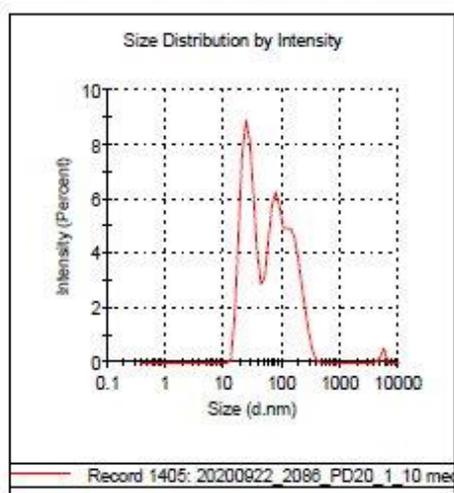
#### System

Temperature (°C):	20,0	Duration Used (s):	60
Count Rate (kcps):	53,1	Measurement Position (mm):	4,65
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	Attenuator:	11

#### Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 92,46	<b>Peak 1:</b> 118,4	56,0	63,25
<b>PdI:</b> 0,396	<b>Peak 2:</b> 27,07	43,2	7,441
<b>Intercept:</b> 1,01	<b>Peak 3:</b> 5301	0,8	401,3

Result quality **Refer to quality report**



Size d.nm	Intensity Percent	Size d.nm	Intensity Percent	Size d.nm	Intensity Percent
0,4000	0,0	13,54	0,1	456,7	0,0
0,4632	0,0	15,69	1,8	531,2	0,0
0,5365	0,0	18,17	4,8	615,1	0,0
0,6213	0,0	21,04	7,6	712,4	0,0
0,7195	0,0	24,36	8,9	825,0	0,0
0,8332	0,0	28,21	8,2	955,4	0,0
0,9649	0,0	32,67	6,2	1106	0,0
1,117	0,0	37,84	4,0	1281	0,0
1,294	0,0	43,82	2,9	1484	0,0
1,499	0,0	50,75	3,1	1718	0,0
1,736	0,0	58,77	4,4	1990	0,0
2,010	0,0	68,06	5,8	2305	0,0
2,328	0,0	78,82	6,3	2669	0,0
2,696	0,0	91,28	5,7	3091	0,0
3,122	0,0	105,7	5,0	3580	0,0
3,615	0,0	122,4	4,9	4145	0,0
4,187	0,0	141,8	4,9	4801	0,2
4,849	0,0	164,2	4,6	5560	0,5
5,615	0,0	190,1	3,8	6439	0,0
6,503	0,0	220,2	2,8	7456	0,0
7,531	0,0	255,0	1,8	8635	0,0
8,721	0,0	295,3	1,0	1,000e4	0,0
10,10	0,0	342,0	0,4		
11,70	0,0	396,1	0,1		

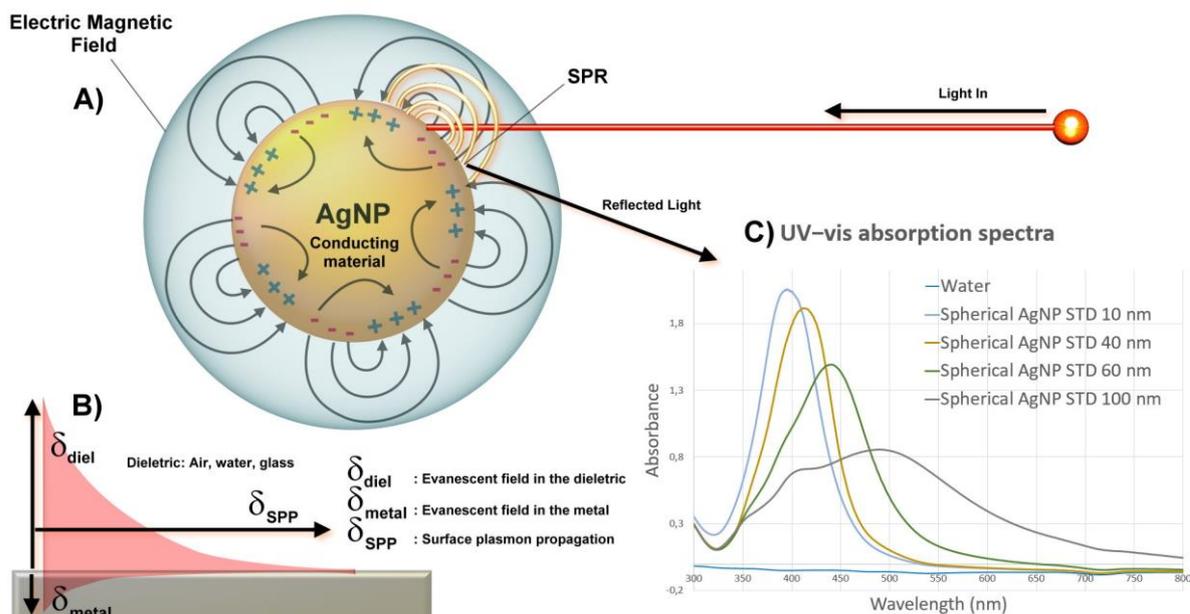
Fonte: (O autor, 2021).

## APENDICE A – EXPLICAÇÃO COMPLEMENTAR SOBRE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (RPS)

O termo "plasmon" foi introduzido por Pines e Bohm (1952), que significa de forma resumida, que os elétrons se movem como um grupo dentro de um metal. Juntos, os elétrons fluem alternadamente para a frente e para trás enquanto são atraídos pelos íons positivos, que compõem a estrutura do cristal, e são repelidos quando estão muito próximos um do outro (PINES, 1956).

A forte interação de AgNPs com a luz leva ao efeito de ressonância plasmônica de superfície (RPS), enquanto a frequência da luz incidente coincide com a frequência dos elétrons oscilantes na superfície. A superfície dos AgNPs armazena os elétrons condutores dentro da partícula e estabelece uma força restauradora, que cria uma frequência de plasmon de superfície dipolar (HALAS *et al.*, 2011; KALFAGIANNIS *et al.*, 2012). A RPS pode ser modulada controlando a forma de AgNPs, que por sua vez controla as formas em que os elétrons oscilam, a luz é espalhada e absorvida dentro da nanoestrutura e intensifica os campos elétricos locais. Em geral, nanopartículas menores induzem a produção de elétrons quentes, a partir de metais plasmônicos, enquanto tamanhos maiores favorecem o espalhamento da luz (HALAS *et al.*, 2011; WILEY *et al.*, 2006). O tipo de metal, tamanho, forma, as moléculas ligadas à superfície e o grau de agregação das partículas determinam a faixa de energia (frequência) da luz, que pode excitar plasmons (teoria de Mie). Por exemplo, a absorção principal (dipolo) de AgNPs de formato esférico é de cerca de 400 nm. AgNPs maiores e aqueles com formas diferentes, por outro lado, absorvem diferentes comprimentos de onda de luz, devido a outros modos de absorção, geralmente superiores a 400 nm (MIE, 1908; STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2010), a Figura 63-C apresenta a este respeito, os elétrons podem ser descritos como ondas, conforme ilustrado na Figura 64-A e 64-B.

Figura 64 - A) Propagação da ressonância plasmônica na superfície AgNPs de formato esférico e interação com a radiação eletromagnética. B) Variação da energia de propagação do plasma de superfície (PPS) C) Espectro de absorção UV-vis de padrões de AgNPs esféricas com tamanhos 10, 40, 60 e 100 nm respectivamente, concentração mássica de 0,02 mg/mL.



Fonte: (MISIRLI; SRIDHARAN; ABRANTES, 2021)

## APENDICE B – CÁLCULO DE PARTÍCULAS/ML PARA AGNPS

Dado o exemplo abaixo:

Forma: Esférica

Tamanho: 20 nm

Concentração: 30 mg / L (concentração de massa).

Volume de uma esfera:

$$V = \frac{4\pi}{3} r^3 \text{ substituindo, temos: } r = \frac{d}{2} \quad V = \frac{4\pi}{3} \frac{d^3}{2^3} \quad (1)$$

Onde d = diâmetro da esfera (cm), r = raio da esfera.

$$V = \frac{m}{\rho} \quad (2)$$

Onde,  $\rho$  = densidade (g / cm<sup>3</sup>), m = massa de partícula (g). Substituindo na equação 28, temos

$$\frac{m}{\rho} = \frac{4\pi}{3} \frac{d^3}{8} \text{ e } d^3 = \frac{6m}{\pi\rho}$$

$$m = \frac{d^3 \times \pi \times \rho}{6} \quad (3)$$

A equação 30 é a fórmula para determinar a massa de uma nanopartícula de Ag de forma esférica, onde  $\rho$  = densidade de prata 10,49 g /cm<sup>3</sup> (DAVIS, 1998),  $\pi$  = 3,14159 (BAILEY *et al.*, 1997), m = massa da partícula (g) e d = diâmetro da partícula (cm).

Aplicando a equação 3 ao nosso exemplo, temos a massa de cada partícula.

$$m = \frac{(20 \times 10^{-7})^3 \times 3.14159 \times 10.49}{6}$$

$$m = 4.39 \times 10^{-17} \text{ g (massa de 1 partícula)}$$

Como a concentração de massa encontrada foi de 30 mg / L ou 0,030 mg / mL, temos:

$$\text{N}^\circ \text{ Partículas} = \frac{30 \times 10^{-6} \text{ g AgNP}}{4.39 \times 10^{-17} \text{ g}}$$

$$\text{N}^\circ \text{ Partículas} = 6.83 \times 10^{11} \text{ Partículas / mL}$$

Conversão do número de partículas / mL para pM / mL (Picomolar)

$$\text{AgNP Conc. (pM/mL)} = \left( \frac{6.83 \times 10^{11} \text{ partículas}}{6.02214076 \times 10^{23}} \right) \times 10^{12}$$

$$\text{AgNP Conc.} = 1.13 \text{ pM/mL}$$

A mesma concentração de prata encontrada no exemplo anterior teria uma concentração de partícula totalmente diferente se o tamanho médio de partícula fosse 5 nm. Neste caso, o resultado seria  $4,37 \times 10^{13}$  partículas / mL e 72,58 pM / mL. Por esse motivo, a correlação analítica é essencial para uma avaliação precisa dos resultados.

## APENDICE C – TABELAS DE CONVERSÃO PARA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS

As Tabelas 30 e 31 mostram a correlação entre a concentração de massa e a concentração de partículas em função do tamanho esférico dos AgNPs.

Tabela 30 - Tabela de conversão de concentração de massa (mg/L) para concentração de partícula em pM / mL dependendo do tamanho dos AgNPs de formato esférico

Concentração de massa (mg / L)	10	20	30	40	50
<b>Diâmetro de AgNPs esféricos (nm)</b>	<b>Concentração em pM / mL</b>				
<b>2,5</b>	193,6	387,1	580,7	774,2	967,8
<b>5.0</b>	24,19	48,39	72,58	96,78	121,0
<b>7,5</b>	7.169	14,34	21,51	28,68	35,84
<b>10</b>	3.024	6.049	9.073	12,10	15,12
<b>20</b>	0,378	0,756	1.134	1.512	1.890
<b>30</b>	0,112	0,224	0,336	0,448	0,560
<b>40</b>	0,047	0,095	0,142	0,189	0,236
<b>50</b>	0,024	0,048	0,073	0,097	0,121
<b>60</b>	0,014	0,028	0,042	0,056	0,070
<b>70</b>	0,009	0,018	0,026	0,035	0,044
<b>80</b>	0,006	0,012	0,018	0,024	0,030

Fonte: (O autor, 2021).

Multiplicando a concentração picomolar por  $10^{-12}$  e pelo número constante de Avogadro ( $NA = 6,02214076 \times 10^{23} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), (BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES, 2019) temos o número de partículas / mL, conforme mostrado na Tabela 29.

Tabela 31 - Tabela de conversão de concentração de massa (mg / L) para concentração em número de partículas por mL, dependendo do tamanho dos AgNPs de formato esférico

Concentração de massa (ppm)	10	20	30	40	50
Tamanho esférico de AgNPs (nm)	Concentração em número de partículas / mL				
2,5	$1,17 \times 10^{14}$	$2,33 \times 10^{14}$	$3,50 \times 10^{14}$	$4,66 \times 10^{14}$	$5,83 \times 10^{14}$
5,0	$1,46 \times 10^{13}$	$2,91 \times 10^{13}$	$4,37 \times 10^{13}$	$5,83 \times 10^{13}$	$7,29 \times 10^{13}$
7,5	$4,32 \times 10^{12}$	$8,63 \times 10^{12}$	$1,30 \times 10^{13}$	$1,73 \times 10^{13}$	$2,16 \times 10^{13}$
10	$1,82 \times 10^{12}$	$3,64 \times 10^{12}$	$5,46 \times 10^{12}$	$7,29 \times 10^{12}$	$9,11 \times 10^{12}$
20	$2,28 \times 10^{12}$	$4,55 \times 10^{11}$	$6,83 \times 10^{12}$	$9,11 \times 10^{11}$	$1,14 \times 10^{12}$
30	$6,75 \times 10^{10}$	$1,35 \times 10^{11}$	$2,02 \times 10^{11}$	$2,70 \times 10^{10}$	$3,37 \times 10^{11}$
40	$2,85 \times 10^{10}$	$5,69 \times 10^{10}$	$8,54 \times 10^{10}$	$1,14 \times 10^{11}$	$1,42 \times 10^{11}$
50	$1,46 \times 10^{10}$	$2,91 \times 10^{10}$	$4,37 \times 10^{10}$	$5,83 \times 10^{10}$	$7,29 \times 10^{10}$
60	$8,43 \times 10^9$	$1,69 \times 10^{10}$	$2,53 \times 10^{10}$	$3,37 \times 10^{10}$	$4,22 \times 10^{10}$
70	$5,31 \times 10^9$	$1,06 \times 10^{10}$	$1,59 \times 10^{10}$	$2,12 \times 10^{10}$	$2,65 \times 10^{10}$
80	$3,56 \times 10^9$	$7,11 \times 10^9$	$1,07 \times 10^{10}$	$1,42 \times 10^{10}$	$1,78 \times 10^{10}$

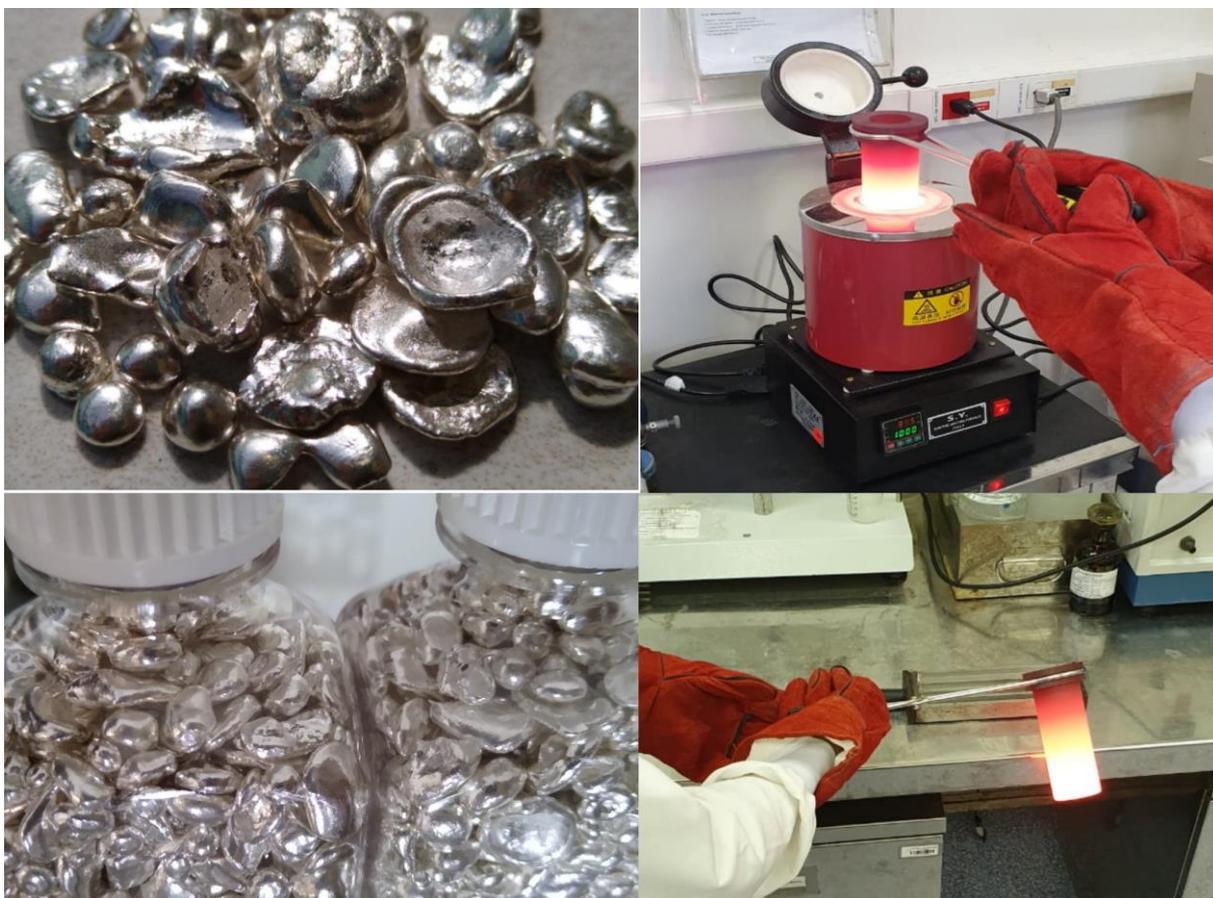
Fonte: (O autor, 2021).

## APENDICE D – OBTENÇÃO DOS ELETRODOS POR FUNDIÇÃO E MODALGEM

Uma vez calculado o tamanho dos eletrodos e dimensionado o tamanho ideal, realizamos a compra de prata 1000 através de empresa legalizada.

Derretemos cerca de 100 g da prata 1000 em forno de fundição elétrico, com cadinho de grafite a 1000°C, e em seguida despejamos a prata fundida no lingote retangular, com 20 cm comprimento por 5 mm de largura conforme Figura 65.

Figura 65 – Mostra do lado esquerdo a prata 1000, e no lado direito a fundição em forno de resistência elétrica a 1000°C, com posterior moldagem em lingote



Legenda: Créditos da imagem: (Prata 1000 granulada, o autor, 2021); (Forno de fundição e lingote: Luiz Felipe de Melo Azevedo, 2020) (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ). Prata 1000 granulada.  
Fonte: (O autor, 2021).