

PATRÍCIA ÉRICA FERNANDES

**NOVO MÉTODO DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO ANTIMICROBIANO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F363n
2010

Fernandes, Patrícia Érica, 1981-
Novo método de síntese de nanopartículas de prata e
avaliação de seu efeito antimicrobiano / Patrícia Érica
Fernandes. – Viçosa, MG, 2010.
xi, 59f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 49-59.

1. Nanopartículas de prata - Síntese. 2. Nanopartículas de
prata - Efeito antimicrobiano. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 620.18923

PATRÍCIA ÉRICA FERNANDES

**NOVO MÉTODO DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO ANTIMICROBIANO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 03 de fevereiro de 2010.

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)

Prof. Alvaro Vianna N. de. C. Teixeira
(Coorientador)

Prof^a Ana Clarissa dos Santos Pires

Prof. Maurilio Lopes Martins

Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

Dedico

Aos meus pais Sebastião e Rita,

Aos meus irmãos André e Leandro,

Ao meu esposo André e aos meus queridos filhos Lucas e Gabriel,
fontes de amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Aos meus pais Sebastião e Rita, pela força, pelo amor e pelo incentivo.

Aos meus irmãos André e Leandro, pela amizade e pela força.

Ao meu esposo André, pelo companheirismo e amor durante todos esses anos.

Aos meus amados filhos Lucas e Gabriel, pelo amor, pelo carinho e pela existência.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo financiamento desta pesquisa.

Ao Professor Nélio José de Andrade, pela amizade, orientação, confiança, pelo apoio e pelos ensinamentos proporcionados.

Ao Professor Luis Henrique Mendes da Silva, pela simpatia, pelos ensinamentos e pela colaboração preciosa e fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Professor Alvaro Vianna N. de C. Teixeira, pelos ensinamentos, pela simpatia e pela ajuda preciosa em várias etapas deste trabalho.

Ao Professor Fabyano Fonseca e Silva, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À minha sogra e ao meu sogro, pela ajuda e pelo incentivo.

Às minhas cunhadas Ana Paula, Carolina, Fabiana e Virgínia, pela amizade e pelos momentos de alegria.

Às minhas amigas Pati e Emiliane, pela amizade, pelos conselhos e pela paciência em me ouvir nas horas de dificuldades.

Aos meus estagiários João, Larissa e Dani, pela amizade e preciosa ajuda durante a execução deste trabalho.

Às minhas amigas Júnia e Roberta, pela amizade durante todos esses anos.

Aos meus colegas do Laboratório Juninho, Carini, Larissa, Evenly, Flávio, Gabriel, André, Thaís, Cléber e Ricardo, pela amizade e convivência agradável.

À Geany, do Laboratório de Embalagens, pela ajuda prestada em uma das etapas deste experimento.

A toda equipe do Centro de Microscopia da UFMG, pela realização das análises de microscopia, pelos esclarecimentos e pela simpatia.

A Cláudia Vanetti e Carla do Núcleo de Microscopia da UFV, pela colaboração e simpatia.

Aos funcionários do DTA, pelo auxílio na concretização deste trabalho.

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

BIOGRAFIA

PATRÍCIA ÉRICA FERNANDES, filha de Sebastião Fausto Fernandes e Rita Maria Lopes da Silva Fernandes, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 27 de janeiro de 1981.

Em março de 2003, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em agosto de 2007.

Nesse mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 3 de fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Síntese de Nanopartículas Metálicas	4
2.2. Uso de Surfactantes na Síntese de Nanopartículas	7
2.3. Estabilidade das Nanopartículas	9
2.4. Técnicas Empregadas na Caracterização de Nanopartículas .	12
2.4.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	12
2.4.1.1. Sistema de Equações para Obtenção do Raio Hidrodinâmico	13
2.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	15
2.4.2.1. Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (HRTEM) ...	16
2.5. Surfactantes	18
2.5.1. Surfactantes Catiônicos	19
2.6. Prata	22
2.6.1. Propriedades Antimicrobianas e Mecanismo de Ação	22
2.6.2. Aplicações das Nanopartículas de Prata (AgNPs)	25

	Página
2.7. Teste de Inibição da Multiplicação Microbiana por Difusão em Ágar	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Preparo das Dispersões Coloidais Contendo Nanopartículas de Prata (AgNPs).....	28
3.2. Medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Espectroscopia de Fluorescência	30
3.2.1. Medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	30
3.2.2. Espectroscopia de Fluorescência	32
3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	33
3.4. Teste de Inibição da Multiplicação Microbiana por Difusão em Ágar	34
3.4.1. Preparo do Meio	34
3.4.2. Preparo do Inóculo.....	34
3.4.3. Inoculação das Placas-Teste	35
3.4.4. Determinação dos Halos de Inibição das Dispersões Diante das Bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas ..	36
3.5. Análise Estatística.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Obtenção das Dispersões Coloidais Contendo Nanopartículas de Prata	37
4.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	38
4.3. Avaliação da Presença de Nanopartículas nas Dispersões Coloidais por Espectroscopia de Fluorescência	40
4.4. Determinação do Tamanho e Espaçamentos Interplanares das Nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	41
4.5. Teste de Inibição da Multiplicação Microbiana por Difusão em Ágar	43
5. CONCLUSÃO	48
6. REFERÊNCIAS	49

RESUMO

FERNANDES, Patrícia Érica, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Novo método de síntese de nanopartículas de prata e avaliação de seu efeito antimicrobiano.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva, Alvaro Vianna N. de C. Teixeira e Nilda de Fátima Ferreira Soares.

Neste trabalho, é apresentado um novo método de síntese de dispersões coloidais de nanopartículas de prata (AgNPs) com efeito antimicrobiano. A formação das AgNPs foi conseguida pela dispersão de sulfadiazina de prata (SP) 1% m/v em brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) nas concentrações de 15,6 mM e 31,2 mM, o que corresponde à concentração crítica micelar (1 x CMC) e duas vezes a concentração crítica micelar (2 x CMC), respectivamente. A formação das nanopartículas (NPs) foi verificada por espalhamento dinâmico de luz (DLS), espectroscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O tamanho médio das partículas por espalhamento dinâmico de luz foi de 3 ± 1 nm e de $2,8\pm 0,4$ nm para cada uma das dispersões preparadas a partir de DTAB, nas concentrações de 1 x CMC e 2 x CMC, respectivamente. Foi verificada a emissão de fluorescência pela irradiação das amostras com luz UV, comprimento de onda de 369,7 nm, apenas nas dispersões coloidais obtidas pela dispersão de SP em DTAB, indicando a formação de NPs. Nas

dispersões contendo somente SP 1% m/v ou DTAB 1 x CMC e 2 x CMC não foi verificada a emissão de fluorescência. A formação das AgNPs foi confirmada por TEM, em que a análise cristalográfica da imagem revelou espaçamentos interplanares próximos de 2,3 Å, característicos da prata na orientação {111} (2,359 Å). O efeito antimicrobiano das dispersões coloidais de AgNPs e dos reagentes foi avaliado pela técnica de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. A dispersão coloidal de AgNPs utilizando-se DTAB 1 x CMC apresentou maior efeito antimicrobiano ($p < 0,05$) contra *E. coli* em relação aos reagentes utilizados, que foram SP 1 % m/v e DTAB 1 x CMC. Já a dispersão coloidal de AgNPs obtida pelo uso de DTAB 2 x CMC apresentou maior efeito antimicrobiano ($p < 0,05$) sobre *P. aeruginosa* em relação aos reagentes utilizados, que foram SP 1 % m/v e DTAB 2 x CMC. Essa maior eficiência foi atribuída à presença das AgNPs. Ambas as dispersões coloidais de AgNPs apresentaram o mesmo efeito antimicrobiano ($p > 0,05$) para cinco das seis bactérias estudadas, com exceção da *S. epidermidis*, em que a dispersão coloidal contendo a maior concentração do surfactante (2 x CMC) foi melhor ($p < 0,05$). Nesse caso, o maior efeito antimicrobiano deve ser atribuído à maior concentração de surfactante e não à presença das AgNPs, pois a dispersão contendo AgNPs em DTAB 2 x CMC não foi diferente ($p > 0,05$) daquela com apenas DTAB 2 X CMC sobre essa bactéria.

ABSTRACT

FERNANDES, Patrícia Érica, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2010. **New method for synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antimicrobial effect.** Adviser: Nélcio José de Andrade. Co-Advisers: Luis Henrique Mendes da Silva, Alvaro Vianna N. de C. Teixeira and Nilda de Fátima Ferreira Soares

In this work, we present a new synthesis method of colloidal dispersions of silver nanoparticles (AgNPs) with antimicrobial effect. The formation of AgNPs was achieved by the dispersion of silver sulfadiazine (SS) 1% w/v in dodecyltrimetil ammonium bromide (DTAB) at concentrations of 15.6 mM and 31.2 mM, which corresponds to the critical micellar concentration (1 x CMC) and twice the critical micelle concentration (2 x CMC), respectively. The formation of nanoparticles (NPs) was measured by dynamic light scattering (DLS), fluorescence spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM). The average particle size by dynamic light scattering was 3 ± 1 nm and 2.8 ± 0.4 nm for each of the dispersions prepared from DTAB at concentrations of 1 x CMC and 2 x CMC, respectively. The fluorescence emission of the samples was verified by irradiation with UV light, wavelength of 369.7 nm, only in colloidal dispersions obtained by the dispersion of SS in DTAB, indicating the formation of NPs. In the dispersion containing only SS 1% w/v or DTAB 1 x CMC and 2 x CMC

there was no fluorescence emission. The formation of AgNPs was confirmed by TEM, where the crystallographic analysis of the image revealed interplanar distances near 2.3 Å, characteristic of silver in the orientation {111} (2.359 Å). The antimicrobial effect of colloidal dispersions of AgNPs and reagents was analyzed by inhibition of microbial growth by agar diffusion against Gram-positive *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and against Gram-negative *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, ATCC 10031 *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. The colloidal dispersion of AgNPs using DTAB 1 x CMC showed greater antimicrobial effect ($p < 0.05$) against *E. coli* in relation to the used reagents, which were SS 1% w/v and DTAB 1 x CMC. However, the colloidal dispersion of AgNPs obtained by using DTAB 2 x CMC showed a greater antimicrobial effect ($p < 0.05$) on *P. aeruginosa* in relation to the reagents used, which were SS 1% w/v and DTAB 2 x CMC. This increased efficiency was attributed to the presence of AgNPs. Both colloidal dispersions of AgNPs showed the same antimicrobial effect ($p > 0.05$) for five of the six bacteria studied, except *S. epidermidis*, in which the colloidal dispersion containing the highest concentration of surfactant (2 x CMC) was better ($p < 0.05$). In this case, the greatest antimicrobial effect should be attributed to the higher concentration of surfactant and not the presence of AgNPs, because the dispersion containing AgNPs in DTAB 2 x CMC was not different ($p > 0.05$) of dispersion containing only DTAB 2 X CMC to *S. epidermidis*.

1. INTRODUÇÃO

Com a seleção no ambiente de bactérias resistentes aos antimicrobianos convencionais, faz-se necessária a busca por novas alternativas de controle antimicrobiano. Nesse contexto, a nanotecnologia mostra-se como importante ferramenta, uma vez que na escala nanométrica os compostos passam a exercer propriedades distintas dos seus similares na escala macrométrica. Uma das explicações para tal fato é que os compostos em menor escala possuem maior área superficial por volume, tornando-se mais reativos. Isso pode implicar no aumento do efeito desejado com menor gasto de material ou com menor alteração das propriedades do meio em que esses compostos serão inseridos.

A nanotecnologia oferece oportunidades para re-explorar as propriedades biológicas dos compostos antimicrobianos já conhecidos, manipulando seu tamanho para alterar-lhes o efeito. Há muito tempo são conhecidas sobre as propriedades antimicrobianas da prata, entretanto houve declínio na sua utilização com a descoberta dos antibióticos (LARA et al., 2010). Porém, o uso indiscriminado dos antibióticos tem levado à seleção de estirpes bacterianas resistentes. Assim, houve novo interesse pela utilização da prata, que passou a ser intensamente estudada nos últimos anos, principalmente na forma de nanopartículas, pois acredita-se que esse metal oferece menos riscos de desenvolvimento de resistência pelas bactérias por agir de forma complexa, ao contrário dos antibióticos, que

geralmente exercem seu efeito antimicrobiano em locais específicos nas células (GOGOI et al., 2006).

Os trabalhos científicos mais recentes têm focado o uso da prata na forma de nanopartículas (AgNPs), e muitos autores sugerem que nessa forma a prata apresenta melhor efeito antimicrobiano. Entretanto, o mecanismo pelo qual as AgNPs atacam as células microbianas não está totalmente compreendido. Sabe-se que o efeito antimicrobiano das AgNPs está relacionado com seu tamanho e forma, sendo mais eficientes aquelas com menor tamanho e com maior número de facetas nessas partículas (MORONES et al., 2005).

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Propor um novo método de síntese de AgNPs, utilizando como reagentes a sulfadiazina de prata (SP) e o surfactante catiônico brometo de dodecitrimetil amônio (DTAB).
- 2) Determinar o tamanho médio das AgNPs sintetizadas por espalhamento dinâmico de luz.
- 3) Confirmar a formação de nanopartículas pela emissão de fluorescência.
- 4) Determinar o tamanho das AgNPs sintetizadas por mais uma técnica e observar detalhes de nível atômico (espaçamentos interplanares) por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução .
- 5) Avaliar o efeito antimicrobiano das dispersões coloidais de AgNPs sintetizadas e dos reagentes utilizados na síntese contra as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; e Gram-negativas, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, pelo teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A palavra “nanotecnologia” está relacionada às tecnologias que permitem a construção de materiais ou estruturas, numa escala muito reduzida: a do nanômetro (nm), o que corresponde à bilionésima parte do metro (10^{-9} m) (RIBOLDI, 2009).

Materiais na escala nanométrica são aqueles formados por poucos átomos, encontrando-se numa escala intermediária entre as moléculas e o material na forma estendida (*bulk*). Esses materiais apresentam propriedades únicas devido ao efeito de superfície e de confinamento (MURRAY et al., 2000). Por isso, há crescente interesse por materiais nanoestruturados pelo potencial de aplicação no desenvolvimento de novas tecnologias. Na escala nanométrica, as propriedades magnéticas, ópticas, catalíticas e de transporte dos metais dependem fortemente do tamanho e da forma. Nas últimas décadas, as propriedades relacionadas ao tamanho foram intensivamente estudadas, no entanto a dependência da forma passou a ser explorada apenas recentemente (ROCHA, 2008). Com o aprimoramento de métodos de síntese, especialmente a síntese coloidal de NPs, amostras com alta qualidade foram obtidas, motivando estudos experimentais dos efeitos da forma e desenvolvimento de novas aplicações (XIA; HALAS, 2005).

Na escala nanométrica, a superfície passa contribuir na determinação das características dos nanossistemas. A razão superfície/volume em NPs

esféricas aumenta com o inverso do raio. Em NPs com 1 nm de diâmetro, mais de 75 % dos átomos encontram-se na superfície, enquanto essa porcentagem é menor que 0,5 % em NPs de 20 nm de diâmetro (LEITE, 2003).

As NPs podem ser sintetizadas pela abordagem “Top down” (de cima para baixo) e estão relacionadas com o desgaste de materiais macroscópicos, ou “Bottom up” (de baixo para cima), que possibilita a construção de estruturas átomo a átomo, necessitando de um controle muito rigoroso e fino da matéria (RIBOLDI, 2009).

Uma das linhas mais promissoras para o desenvolvimento de novas tecnologias é a exploração e caracterização de fenômenos em nanomateriais, pois nesses materiais a natureza quântica da matéria claramente se manifesta e as interfaces se tornam importantes. Entender detalhadamente os mecanismos que regem esses efeitos viabilizará a aplicação desses nanossistemas (TIZEI, 2008).

2.1. Síntese de Nanopartículas Metálicas

Na síntese coloidal, as NPs são produzidas na fase líquida. A primeira síntese coloidal de NPs metálicas documentada foi realizada por Faraday, em meados do século XIX. Desde então, um amplo conjunto de métodos foi desenvolvido para a produção de NPs coloidais. Entretanto, apenas nos últimos 30 anos os modernos métodos de síntese e as técnicas de caracterização foram aprimorados. Assim, foi possível a obtenção de amostras de NPs de diferentes materiais com alta qualidade e fino controle de suas características, como tamanho, composição química e formas (prismas, bastões, cubos, cilindros e discos, entre outros) (ZHAO et al., 2007).

A síntese coloidal é um método extremamente versátil, de custo relativamente baixo e que pode, a princípio, ser adaptado para produção em larga escala. Há diversos métodos relatados na literatura para a síntese de NPs em fase líquida. Apesar de cada método possuir características específicas, de modo geral a síntese coloidal de NPs se baseia em quatro componentes: meio, precursor, agente redutor e estabilizante. Assim, o meio

é a fase líquida onde a reação irá ocorrer. O composto químico que irá fornecer o metal é o precursor, geralmente o sal do metal, no caso de NPs metálicas. O agente redutor é geralmente um composto químico que fornece elétrons, diretamente por meio de uma reação química ou sob efeito de um agente externo como luz, temperatura ou raios gama. O agente redutor irá reduzir o íon, transformando-o na espécie metálica. O agente estabilizante é a molécula que recobre a superfície das NPs, mantendo-as afastadas e dispersas no meio (ROCHA, 2008).

Diferentes dispersões coloidais podem ser preparadas por diversas metodologias, entretanto algumas características são comuns entre elas. A formação de colóides normalmente implica em reação química (hidrólise, redução, polimerização ou policondensação) ou em transformação física (desestabilização de *Ostwald*, separação de fase espontânea ou gelificação). Quando a reação se inicia, a partir de uma solução de pequenas moléculas, engloba os seguintes passos: reação química; formação de núcleos ou nucleação; crescimento dos núcleos para formar as partículas e estabilização das partículas finais, que pode ser conseguida pela adição de um polímero ou por surfactantes (ELAISSARI, 2008).

De acordo com Evanoff e Chumanov (2005), o método mais popular para sintetizar nanopartículas de ouro é o método de Turkevich, que envolve a redução do ácido cloráutico com citrato de sódio, produzindo partículas de 10 nm e com estreita distribuição de tamanho. E um método comum para obtenção de AgNPs é o método de Lee e Meisel, em que nitrato de prata (AgNO_3) é usado como fonte do metal. Esse método é uma variação do método de Turkevich, porém produz partículas com ampla distribuição de tamanhos. Outro método comum para a síntese de AgNPs é proposto por Creighton, em que AgNO_3 é reduzido utilizando-se boro-hidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor (EVANOFF; CHUMANOV, 2005). Esse procedimento de síntese permite a obtenção de partículas de aproximadamente 10 nm e com estreita distribuição de tamanho. Esse procedimento pode ser empregado para sintetizar nanopartículas de outros metais, como Pt, Pd, Cu, Ni, entre outros, entretanto o protocolo específico depende do potencial de redução de cada fonte do íon (SCOTT et al., 2003).

Numerosos métodos para a síntese de AgNPs têm sido reportados na literatura e podem ser arbitrariamente divididos em métodos tradicionais e não tradicionais; os tradicionais são aqueles baseados nas diversas modificações dos métodos de Lee e Meisel e de Creighton, descritos anteriormente (EVANOFF; CHUMANOV, 2005).

Métodos de síntese não tradicionais incluem redução à alta temperatura em matrizes sólidas porosas (WANG et al., 2002), condensação fase-vapor (MALYNYCH; CHUMANOV, 2003), laser ablação (MAFUNÉ et al., 2000), fotorredução dos íons Ag^+ (ABID et al., 2002), eletrólise de solução contendo sal de prata (KOTOV et al., 1993), sonochemical (TALEBI et al., 2010), sonoelectrochemical (ZHU et al., 2000), entre outros.

Além dos métodos químicos, têm sido reportados nos últimos anos métodos biológicos para a síntese de AgNPs. A biossíntese de nanopartículas metálicas é classificada como biossíntese intracelular e extracelular (MOGHADDAM, 2010).

Joerger et al. (2001) reportaram a biossíntese intracelular de AgNPs utilizando a bactéria *Pseudomonas stutzeri* AG259 isolada de uma mina de prata. Quando colocada em contato com solução de AgNO_3 concentrada, essa bactéria desempenhou importante papel na redução dos íons Ag^+ em AgNPs com tamanho bem definido e distinta topografia, dentro do espaço periplasmático.

Fayaz et al. (2009) observaram que, a princípio, a síntese intracelular pode fornecer melhor controle sobre o tamanho e forma das nanopartículas, entretanto a recuperação destas é mais trabalhosa e cara. A biossíntese extracelular de AgNPs a partir de AgNO_3 utilizando o fungo *Trichoderma viride* foi reportada por esses autores. Os resultados obtidos por TEM indicaram que as AgNPs foram polidispersas e com tamanho variando de 5 nm a 40 nm, e 85 % das AgNPs encontravam-se na faixa de 5 nm a 20 nm e apresentavam morfologia variada. As AgNPs também foram testadas quanto ao efeito antimicrobiano e mostrou-se que a concentração mínima inibitória (MIC) foi de 30 $\mu\text{g/mL}$, 35 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$ e 65 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*, *Salmonella typhi*, *S. aureus* e *Micrococcus luteus*, respectivamente.

2.2. Uso de Surfactantes na Síntese de Nanopartículas

Surfactantes, ou tensoativos, são moléculas que possuem cabeça polar hidrofílica e cadeia de hidrocarbonetos hidrofóbica. Quando esses compostos são adicionados na água, as cadeias de hidrocarbonetos tendem a se autoagregar para minimizar o contato com as moléculas de água, formando vários agregados.

Se as moléculas do surfactante possuem a cabeça polar grande e a cadeia de hidrocarbonetos pequena, formando um cone (Figura 1a), as cadeias tendem a se automontar para formar um agregado esférico chamado de micela normal (Figura 1b), em que as cadeias ficam inseridas no interior da micela e a cabeça polar, na superfície externa. Em baixas concentrações de surfactantes, as micelas são esféricas e o diâmetro determinado pelo comprimento da cadeia de hidrocarbonetos e pelo tamanho da cabeça polar. Se as moléculas do surfactante possuem a cabeça polar pequena e a cadeia de hidrocarbonetos ramificada, com formato de rolha de champanhe (Figura 1c), são formadas micelas reversas (Figura 1d), com a cabeça polar voltada para o interior da micela e a cadeia de hidrocarbonetos para a superfície externa. Diferentemente das normais, o tamanho das micelas reversas aumenta linearmente com a quantidade de água adicionada no sistema (PILENI, 2003).

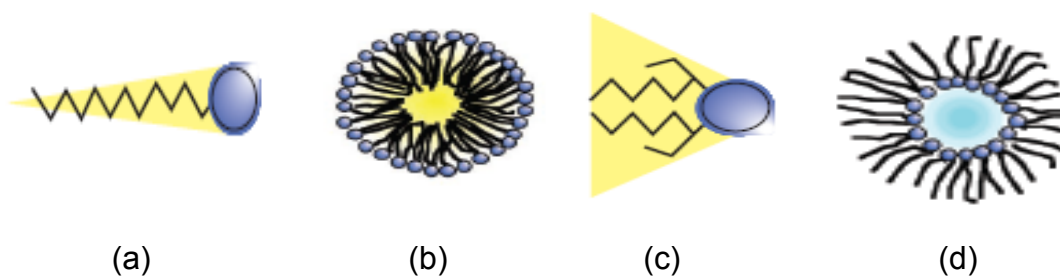


Figura 1 – Formas e autoagregados de surfactantes em solução. Surfactante com forma de cone (a) resultando em micelas normais (b) e surfactante com forma de rolha de champanhe (c) resultando em micelas reversas (d).

Fonte: PILENI, 2003.

Essa capacidade que os tensoativos possuem de se automontar em estruturas bem definidas tem sido aproveitada para a síntese de materiais inorgânicos com dimensões nanométricas, pois essas estruturas são utilizadas como um tipo de molde para a síntese de nanomateriais (HOLMBERG, 2004). De acordo com Pileni (1993), os agregados de surfactantes, especialmente micelas, micelas reversas e macroemulsões, apresentam vantagem sobre os outros estabilizantes.

Alguns surfactantes têm sido utilizados como estabilizantes de superfícies (PILENI, 1993) e, ou, como moldes (HOLMBERG, 2004) na síntese de nanopartículas metálicas. Por se ligarem na superfície das nanopartículas metálicas, as moléculas dos surfactantes diminuem a energia livre de superfície, controlam o crescimento e forma das nanopartículas do metal e agem como estabilizante contra a precipitação (HARADA et al., 2009).

Tensoativos não iônicos ou anfífilos sintéticos, como alcanotiós (CHEN et al., 2000) e aminas (YANG et al., 2004), têm sido utilizados como estabilizantes na síntese de várias nanopartículas metálicas. Além disso, surfactantes com cargas como cloreto de cetiltrimetil amônio (CTAC) (KAMEO et al., 2001), brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) (CHEN et al., 2000), cloreto de dodeciltrimetil amônio (DTAC) (TOSHIMA; TAKAHASHI, 1992), bis-(2-etilhexil)-sulfosuccinato de sódio (AOT) (SOSA et al., 2010; PILENI, 2003) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (SONG et al., 2008; YANG et al., 2007) têm sido usados como estabilizantes e moldes para a síntese de uma variedade de semicondutores, nanobastões e nanopartículas metálicas. Isso porque, quando a concentração do surfactante selecionado é maior do que a concentração crítica micelar (CMC), o surfactante pode formar micromicelas que agem como moldes flexíveis para controlar o tamanho e formato das nanopartículas (TAN et al., 2010).

Tem sido reportada a influência da concentração do surfactante na forma e tamanho das nanopartículas sintetizadas, porém houve poucos estudos com concentrações abaixo da CMC (TAN et al., 2010). Esses autores, entretanto, estudaram a síntese de AgNPs, em que a forma das nanopartículas foi controlada por SDS em concentrações abaixo da CMC em água.

De acordo com Holmberg (2004), o número de trabalhos utilizando surfactantes como moldes para a síntese de materiais inorgânicos aumentou muito nos últimos anos. E tem sido postulado que a estrutura da partícula obtida é governada pela estrutura do molde. Como exemplo, cita-se o trabalho realizado por Pileni (2003), em que nanopartículas de cobre são obtidas por microemulsões com várias estruturas internas. Em microemulsões em que gotículas esféricas de água estavam presentes, houve o fornecimento de partículas esféricas, cujo diâmetro aumentou com o aumento do conteúdo de água. Em microemulsões consistindo de cilindros de água ocorreu a formação de nanocristais de cobre cilíndricos, juntamente com algumas partículas esféricas. Há, no entanto, muitos exemplos de ausência de correlação entre a estrutura do molde e a forma da partícula. Outros fatores devem influenciar esse processo. A presença de sal e ânions, em particular, pode influenciar fortemente o comportamento de cristalização em alguns casos (HOLMBERG, 2004). A forma de nanocristais de cobre obtidos a partir de bis-(2-etilhexil) sulfocinato de cobre como molde mudou drasticamente com o tipo de sal adicionado (FILANKEMBO; PILENI, 2000). A adição de sal não afetou tanto a estrutura interna da microemulsão, de modo que o efeito não foi diretamente devido ao molde. O controle da morfologia deve estar relacionado com a adsorção seletiva dos íons nas diferentes facetas durante o crescimento do cristal (HOLMBERG, 2004).

2.3. Estabilidade das Nanopartículas

Em fase aquosa, as nanopartículas tendem a formar agregados, por isso, em alguns métodos de preparação, as nanopartículas são transferidas para solventes orgânicos, com a finalidade de aumentar a estabilidade (SABATINI, 2007). A estabilidade de soluções coloidais depende fortemente da natureza e da magnitude da interação entre as partículas constituintes e o meio. As NPs coloidais podem ser estabilizadas por repulsão eletrostática, em que as NPs se repelem devido à presença de moléculas carregadas na superfície e estabilização estérica, em que a aproximação das nanopartículas é impedida pela presença de moléculas de cadeias longas ou polímeros (ROCHA, 2008).

Os polímeros agem como estabilizantes ou agentes de nivelamento de superfície. Quando as nanopartículas são incorporadas ou encapsuladas em um polímero, estes paralisam o crescimento das partículas pelo controle de sua nucleação (COURROL et al., 2007). Os polímeros também podem controlar a agregação dos átomos de metal em solução. Na prática, o processo de redução pode ocorrer antes ou depois da interação do metal com o polímero. Quando ocorre depois, é formado um complexo entre íons do metal e o polímero, seguido pela redução dos íons metálicos no polímero, mantendo a interação entre eles. Entretanto, se essa redução se dá antes da interação, não ocorre a formação do complexo entre os íons do metal e o polímero. Assim, o crescimento das partículas não será devidamente controlado, e o efeito protetor somente será obtido após a formação das partículas (PASTORIZA-SANTOS; LIZ-MARZÁN, 2002).

Nanopartículas com forma esférica são as mais termodinamicamente estáveis, e várias outras formas podem ser obtidas, dependendo da natureza do material e do processo de preparação. Particularmente em coloides inorgânicos, partículas com várias formas (elipsoidal, cúbica e de bastões, entre outras), podem ser obtidas. O controle do tamanho e da distribuição de tamanho é requerimento muito importante, pois define a área superficial disponível das partículas (ELAISSARI, 2008).

A formação de nanopartículas pode ser explicada pelo mecanismo proposto por La Mer (1952). Nesse mecanismo, a etapa de nucleação ocorre quando os monômeros presentes na solução (átomos, íons ou complexos moleculares que formarão as nanopartículas) alcançam concentração supersaturada, também conhecida por concentração crítica de nucleação, levando à formação de pequenos agregados chamados de núcleos ou sementes. Após essa etapa, a concentração dos monômeros pode ficar abaixo da concentração crítica de nucleação, ocorrendo apenas o crescimento dos núcleos pré-formados pela incorporação de monômeros, sendo essa fase conhecida por etapa de crescimento. Em alguns casos, quando a concentração de monômeros está baixa pode ocorrer o processo de desestabilização de *Ostwald*, em que há dispersão de partículas menores e crescimento das maiores, bem como aglomeração e coalescência (ROCHA, 2008).

O controle do tamanho médio das nanopartículas pode ser feito variando-se as quantidades do precursor metálico e ligante. Para obter muitas NPs com tamanho reduzido são necessárias altas quantidades de ligante em relação ao precursor. Entretanto, se a quantidade de ligante disponível for baixa em relação ao precursor, serão formadas menos nanopartículas de maior tamanho (ROCHA, 2008). Partículas mais estáveis e com menor distribuição de tamanho também podem ser conseguidas, aumentando-se a massa molar do estabilizante (PASTORIZA-SANTOS; LIZ-MARZÁN, 2002). A escolha do estabilizante é crítica, pois ele determina a estabilidade, solubilidade, reatividade e, até mesmo, o tamanho e forma das nanopartículas durante a síntese. No entanto, os estabilizantes como surfactantes e polímeros iônicos não podem ser removidos facilmente da superfície das partículas e inevitavelmente afetam as propriedades físico-químicas delas. Assim, as aplicações práticas podem ser prejudicadas devido à dificuldade de separação do estabilizante das partículas (BALAN et al., 2007).

Durante a síntese de nanopartículas é desejável obter partículas com estreita distribuição de tamanhos. Para isso, é necessário que haja separação temporal das etapas de nucleação e crescimento. Entretanto, essa separação não é tão simples e envolve a escolha adequada dos reagentes e do procedimento de síntese. Outro fator importante para obtenção de nanopartículas com estreita distribuição de tamanhos é a homogeneidade da nucleação, que pode ser conseguida por meio de redução rápida, utilizando-se agente redutor forte, com agitação vigorosa. A agitação é importante para minimizar gradientes de concentração (ROCHA, 2008).

2.4. Técnicas Empregadas na Caracterização de Nanopartículas

2.4.1. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A espectroscopia de correlação de fótons, também conhecida por DLS (do inglês *Dynamic Light Scattering*), é técnica útil e versátil para medição *in situ* do tamanho, da distribuição de tamanho e, em alguns casos, das formas das nanopartículas em líquidos (PECORA, 2000; CHU, 1991), mas não identifica a natureza química da nanopartícula.

Importantes técnicas concorrentes incluem a secagem da amostra e utilização de métodos de imagem como a microscopia eletrônica. Entretanto, a secagem da amostra pode causar mudanças no sistema, como formação de agregados, o que pode não refletir a natureza da espécie na dispersão líquida. Outras técnicas de dimensionamento de soluções líquidas incluem espalhamento estático de radiação, cujo comprimento de onda é comparável ao tamanho da partícula. Para nanopartículas, por exemplo, isso inclui, principalmente, espalhamento de raios-X e espalhamento de nêutrons a baixos ângulos (CHU; LIU, 2000).

DLS é técnica-padrão amplamente usada em laboratórios de biofísica, coloides e polímeros. Pode ser utilizada na rotina de caracterização de partículas, bem como em estudos sobre a natureza das interações de moléculas e partículas em dispersões líquidas. Essa técnica se baseia no fato de que a intensidade da luz espalhada de uma dispersão de partículas em dado ângulo de espalhamento é o resultado da interferência da luz espalhada de diferentes partículas no meio ao atingir o detector (PECORA, 2000).

O total de intensidade espalhada em determinado ângulo de espalhamento depende das posições das partículas. As partículas, no entanto, estão executando constantemente movimento browniano, o que leva a mudanças nas suas posições. Assim, a intensidade da luz espalhada flutua no tempo. Essas flutuações de intensidade espalhada ocorrem na escala de tempo que leva uma partícula para mover fração significativa do comprimento de onda da luz. Para extrair informações úteis a partir das flutuações de intensidade, uma função de correlação temporal é computada.

Isso é feito geralmente usando-se correlacionador, computador equipado com placas especiais para permitir rápido cálculo em tempo real da função correlação da intensidade espalhada (PECORA, 2000).

No espalhamento de luz, a interação da radiação com a matéria é dada pela interação do campo elétrico da luz com as cargas presentes nos átomos e nas moléculas. A oscilação do campo elétrico deforma a nuvem eletrônica dos átomos que oscila na mesma frequência da radiação. Assim, os átomos podem ser vistos como dipolos elétricos oscilantes que atuam como fontes de radiação de mesma frequência da radiação incidente. Para realizar medidas de DLS, é necessário haver contraste entre as partículas e o meio em que elas estão dispersas (partículas e meio espalhando de forma diferente). O fator de contraste no espalhamento de luz relaciona-se com a diferença da constante dielétrica dos meios, que está associada com a resistência de material em conduzir eletricidade ou, ainda, dos seus índices de refração (DHONT, 1996).

2.4.1.1. Sistema de Equações para Obtenção do Raio Hidrodinâmico

Em experimentos de DLS, a intensidade da luz espalhada flutua com o tempo, devido ao movimento browniano das partículas dispersas em meio líquido. Para a dispersão de partículas esféricas, em meio com viscosidade (η) e sob temperatura constante (T), o coeficiente de difusão (D) é inversamente proporcional ao raio hidrodinâmico R_h das partículas, como mostrado na equação 1, de Stokes-Einstein (CARDOSO, 2001).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{equação 1}$$

em que k_B é a constante de Boltzmann e equivale a $1,381 \times 10^{-23}$ J/K.

É possível detectar a flutuação da intensidade da luz espalhada utilizando-se janela de dimensão reduzida, através da qual a luz espalhada pelas partículas alcança o detector. Para dispersões líquidas que contêm partículas pequenas, essa flutuação de intensidade da luz espalhada ocorre

com maior velocidade, pois as partículas pequenas se movimentam mais rapidamente e passam diante da janela um número maior de vezes dentro de um intervalo de tempo. Assim, existe relação entre a velocidade da flutuação da intensidade da luz espalhada e o coeficiente de difusão das partículas, pois as partículas menores se movimentam mais rápido que partículas maiores, apresentando, portanto, maior coeficiente de difusão (CARDOSO, 2001).

As flutuações são medidas pelo cálculo da função de autocorrelação $C(t)$ da intensidade de luz espalhada, conforme a equação 2.

$$C(t) = \langle I(t_0) \times I(t_0 + t) \rangle \quad \text{equação 2}$$

em que $I(t_0)$ e $I(t_0 + t)$ são as intensidades de luz espalhada nos instantes t_0 e $(t_0 + t)$, respectivamente. No tempo $t = 0$, a intensidade de espalhamento $I(t_0)$ é igual a $I(t_0 + t)$, e a função de autocorrelação possui valor máximo. Com o passar do tempo, a intensidade de espalhamento em um tempo $(t_0 + t)$ terá cada vez menos correlação com a intensidade de espalhamento inicial, e a média sobre os produtos das intensidades, que é $C(t)$, tende a um valor assintótico constante. Para partículas pequenas, essa função de autocorrelação entre as intensidades diminui mais rapidamente com o tempo do que no caso de partículas grandes.

Para partículas esféricas e monodispersas, $C(t)$ decai exponencialmente e é expresso pela equação 3.

$$C(t) = Ae^{-2\Gamma t} + B \quad \text{equação 3}$$

em que A e B são constantes e Γ é a taxa de decaimento da curva exponencial gerada pela função de autocorrelação. O valor de Γ é relacionado ao coeficiente de difusão das partículas, D , e o vetor de espalhamento q pela equação 4.

$$\Gamma = Dq^2 \quad \text{equação 4}$$

O vetor de espalhamento é dado pela equação 5.

$$q = (4\pi n / \lambda_0) \text{sen}(\theta / 2) \quad \text{equação 5}$$

em que n é o índice de refração do líquido que dispersa as partículas, θ é o ângulo de detecção da luz espalhada e λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente.

Um esquema simplificado do experimento de DLS se encontra na Figura 2.

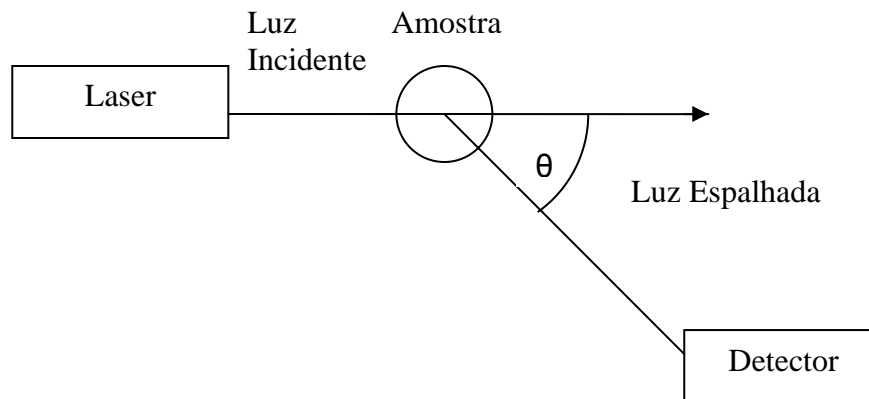


Figura 2 – Diagrama simplificado do equipamento DLS utilizado para medir o tamanho das partículas.

2.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

TEM (do inglês *Transmission Electron Microscopy*) trata-se de importante técnica usada na caracterização de materiais nanoestruturados, podendo fornecer informações subnanométricas sobre estrutura, defeitos de materiais, composição química e porosidade, entre outros. Quando operado no modo convencional, o microscópio é usado na determinação do tamanho médio e da forma das nanopartículas, enquanto detalhes de nível atômico são obtidos pelo modo de alta resolução (LEITE, 2003).

A preparação da amostra é um ponto crucial para que a análise de TEM seja bem-sucedida. A amostra deve ser muito fina, com poucos nanômetros de espessura, para permitir a passagem de 50-90 % dos elétrons (MEEK, 1976); e homogênea, para que a região analisada seja representativa. As amostras devem ser preparadas de forma adequada para que não haja problemas de contaminação, alteração da composição e amorfização durante o processo de preparação (ZANCHET, 1999). Se a amostra encontra-se em suspensão, no caso mais simples, uma gota é depositada sobre a película de carbono amorfo montada sobre a grade de cobre (Figura 3c). Deixa-se secar a amostra para posterior observação no microscópio, pois amostras úmidas podem contaminar o sistema de vácuo do equipamento (KITAJIMA, 1998).

Um esquema simplificado do microscópio eletrônico de transmissão pode ser visto na Figura 3ab. Nela está representado um canhão, que gera um feixe de elétrons de alta energia, 100 – 300 kV ($\lambda = 0,01-0,004$ nm); um conjunto de lentes condensadoras (C1, C2 e C3), que transmitem o feixe até a amostra; a lente objetiva, que recombina os feixes difratados e transmitidos para a formação da imagem; e um conjunto de lentes intermediárias que projetam a imagem em uma tela, ou detector. A recombinação dos feixes difratados e transmitidos com diferentes intensidades resulta na diferença de contraste da imagem formada (WILLIAMS; CARTER, 1994).

2.4.2.1. Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (HRTEM)

HRTEM (do inglês *High Resolution TEM*) trata-se de importante técnica no estudo da estrutura cristalina de NPs. A principal diferença para o modo TEM convencional são a resolução e o tipo de contraste que domina a formação da imagem (WILLIAMS; CARTER, 1994).

Entende-se por resolução a menor distância entre dois pontos do material nitidamente distinguível. Em microscópio de luz, a resolução é cerca de 200 nm, enquanto em microscópio de transmissão, por volta de 0,1-0,2 nm (KITAJIMA, 1998).

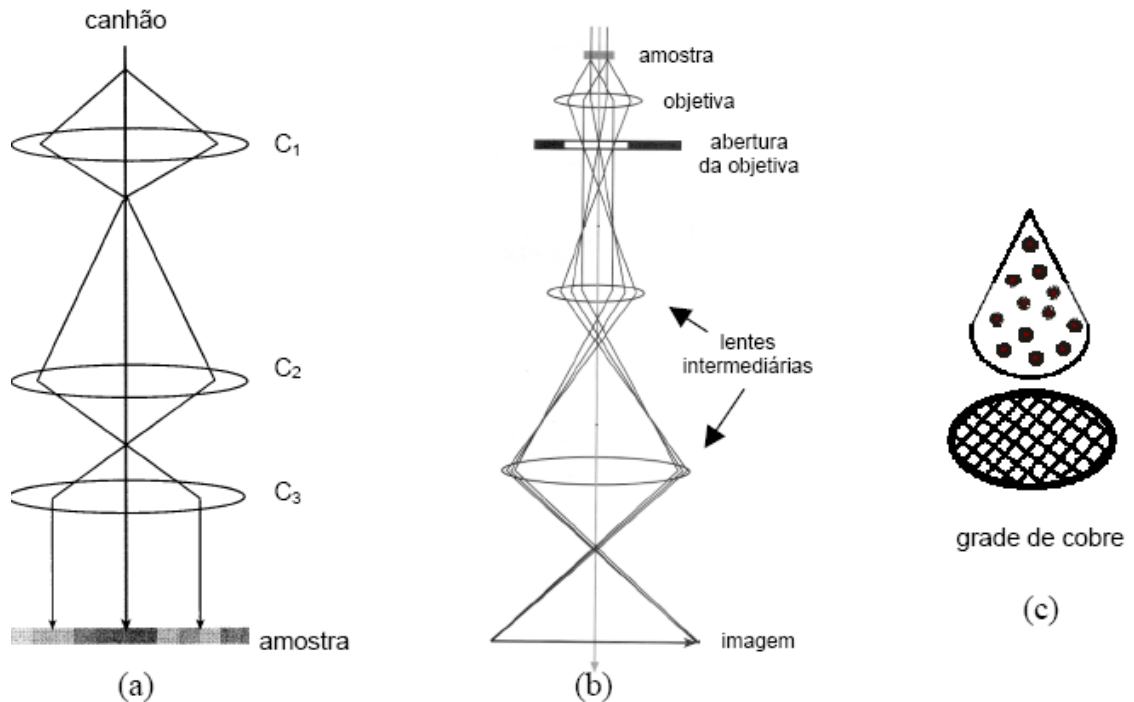


Figura 3 – (a) e (b) esquema simplificado de um microscópio eletrônico de transmissão (WILLIAMS; CARTER, 1994) e (c) método de preparação das amostras para TEM.

Para determinar o arranjo atômico das nanopartículas é necessário que elas estejam bem orientadas em relação ao feixe de elétrons. Entretanto, não é possível controlar a orientação das nanopartículas ao depositá-las no substrato de carbono amorfo. Assim, é muito importante observar várias regiões da grade de microscopia e tentar registrar o maior número de nanopartículas orientadas (LEITE, 2003). Entretanto, alguns microscópios permitem pequeno ajuste do porta-amostras, dentro de uma faixa de ângulos que permite obter partículas orientadas em relação ao feixe de elétrons.

Durante a observação das nanopartículas no microscópio de transmissão no modo de alta resolução, é comum que elas se movimentem consideravelmente e, até mesmo, se reestruturem. Nesses casos, em que há efeitos de interação entre as nanopartículas e o feixe de elétrons, é necessário irradiar a região com um feixe de baixa intensidade e trabalhar rápido. Além dessas interações, a degradação do material pode acontecer

quando as amostras são formadas por átomos muito leves (LEITE, 2003). A Figura 4 mostra imagens de HRTEM e representações gráficas de AgNPs orientada, parcialmente orientada e desorientada com relação ao feixe de elétrons. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio eletrônico de transmissão com resolução de 0,17 nm (JEM-300kV do LME/LNLS) (LEITE, 2003).

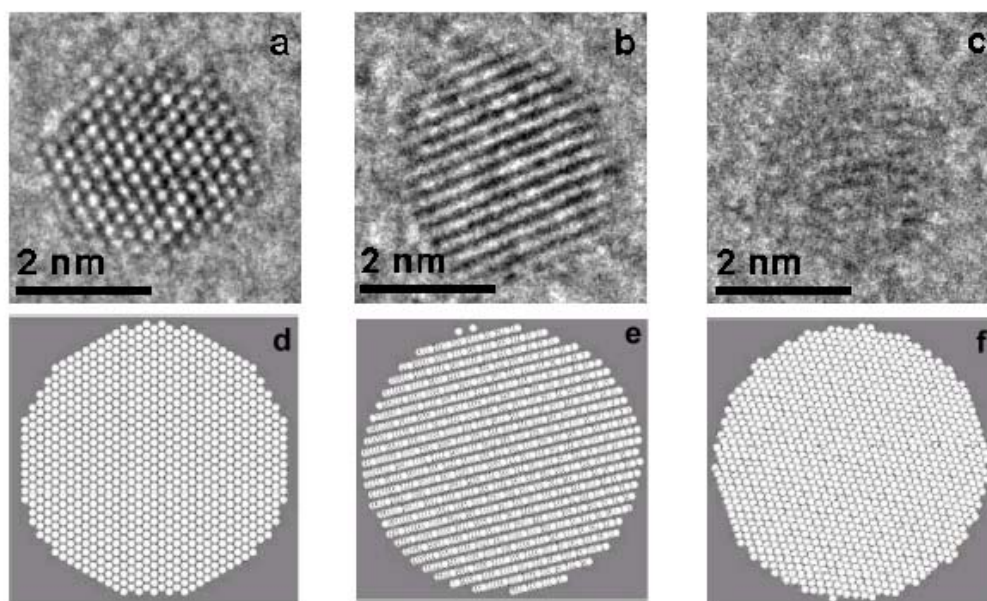


Figura 4 – Imagem de HRTEM de AgNPs: (a) orientada, (b) parcialmente orientada e (c) desorientada; e visualização gráfica de AgNPs: (d) orientada, (e) parcialmente orientada e (f) desorientada com relação ao feixe de elétrons.

Fonte: LEITE, 2003.

2.5. Surfactantes

Surfactantes, ou tensoativos, são agentes capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial do meio em que se encontram dispersos e determinam propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de emulsões, lubrificação, capacidade molhante, solubilização e detergência (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). Apresentam região apolar e outra polar ou

iônica e podem ser divididos em neutros ou iônicos. Os tensoativos iônicos podem ser catiônicos ou aniônicos ou, ainda, anfóteros, quando ambas as cargas estão presentes no surfactante. São moléculas anfífilas, que se associam espontaneamente em solução aquosa, a partir de determinada concentração, formando estruturas denominadas micelas. A concentração a partir da qual se inicia o processo de formação das micelas é chamada de Concentração Micelar Crítica (CMC) que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante (RIZZATTI; ZANETTE, 2009). Em concentrações abaixo da CMC, os surfactantes estão predominantemente na forma de monômeros (Figura 5) (MANIASSO, 2001). A CMC depende da estrutura do tensoativo como tamanho da cadeia do hidrocarboneto e das condições experimentais, como força iônica, contraíons e temperatura, entre outras. As micelas são termodinamicamente estáveis e facilmente reprodutíveis, sendo também destruídas pela diluição com água se a concentração do tensoativo ficar abaixo da CMC (PELIZZETTI; PRAMAURO, 1985).

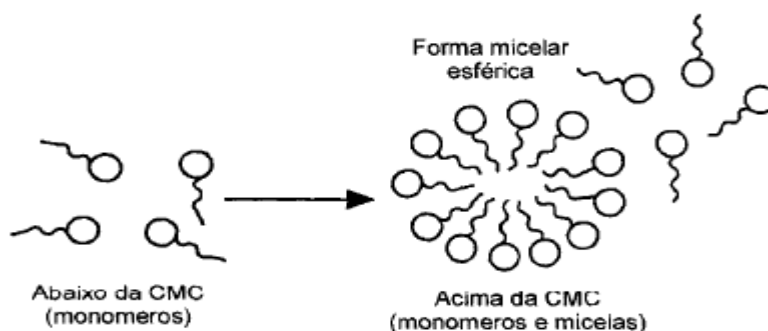


Figura 5 – Formação de agregado micelar.
Fonte: MANIASSO, 2001.

2.5.1. Surfactantes Catiônicos

Um tensoativo típico possui a estrutura R-X, em que R é uma cadeia de hidrocarboneto, normalmente linear, que varia de 8 a 18 átomos de

carbono, e X é o grupo polar ou iônico. A classificação em não iônicos, catiônicos, aniônicos e anfóteros depende da característica do grupo X. Um tensoativo catiônico possui, em geral, a fórmula $R_nX^+Y^-$, em que R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X é um elemento capaz de formar uma estrutura catiônica e Y é um contraíon. Em princípio, X pode ser N, P, S, As, Te, Sb, Bi ou um halogênio (MANIASSO, 2001).

Os agentes tensoativos catiônicos são aqueles que liberam carga elétrica positiva em solução aquosa e são representados pelos compostos quaternários de amônia, em que a função bactericida é mais importante do que a ação como detergente (ANDRADE, 2008).

Os compostos quaternários de amônia são utilizados em várias áreas, como desinfecção ambiental, hospitalar e de superfícies de equipamentos. Em concentrações adequadas, são usados como conservantes de negativos fotográficos, soluções oftalmológicas, cosméticos, tratamento de madeira contra ataque de fungos e várias aplicações farmacêuticas (MASSI et al., 2003). Tanto os surfactantes aniônicos quanto os catiônicos possuem papel importante na desinfecção, pois podem alterar as propriedades superficiais da superfície de adesão e inativar células vivas (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Os surfactantes catiônicos reagem quimicamente com a carga negativa dos íons associados à parede celular. A força eletrostática estabelecida entre o surfactante e a célula cria um estresse na parede celular, causando sua lise e, conseqüentemente, danos à membrana pela reação com os fosfolipídios que a compõem, podendo causar a morte da célula (LUTEY, 1995).

As propriedades antimicrobianas dos surfactantes catiônicos têm sido amplamente relatadas, entretanto seu mecanismo de ação não é totalmente compreendido. De acordo com Vieira et al. (2008), a parte hidrofóbica desses surfactantes fica inserida na membrana bacteriana, como consequência do efeito hidrofóbico. A inserção de surfactantes com uma única cadeia hidrofóbica através da membrana é um processo extremamente rápido. Após a inserção, o surfactante pode-se translocar através da membrana e estabilizar um equilíbrio entre o meio extracelular e o citoplasma. O processo de inserção e a translocação juntos ocorrem em torno de 20 min (SAMPAIO et al., 2005), o que é compatível com o tempo

observado de toxicidade para *Escherichia coli*. Quando presentes no citoplasma, os surfactantes podem interagir com os componentes citoplasmáticos e alterar suas funções. Em particular, os surfactantes catiônicos podem interagir com polímeros carregados negativamente, como DNA e RNA, os quais têm muita afinidade e formam estruturas compactas (DIAS et al., 2005).

A interação dos compostos quaternários de amônia com a membrana citoplasmática da bactéria diminui sua permeabilidade. Esses compostos interferem na cadeia respiratória e na síntese de ATP; quando utilizados em concentrações adequadas, causam extravasamento na membrana, com liberação de componentes celulares e morte (DENYER, 1998; MERIANOS, 1991).

A membrana celular dos microrganismos é composta de várias camadas de lipídeos e proteínas, dispostas em arranjo específico, que é chamada de bicamada, ou multicamada lipoproteica. O caráter hidrofóbico da membrana celular é devido à presença de lipídeos (PRZESTALSKI et al., 2000). A permeabilidade seletiva da membrana celular representa a principal função no controle de reações biológicas no interior da célula. Assim, qualquer interferência na permeabilidade da membrana conduz a grandes prejuízos para os microrganismos, podendo levá-los à morte. A carga positiva dos surfactantes catiônicos facilita sua interação com a membrana bacteriana, que é negativamente carregada, o que lhes confere boa atividade antimicrobiana (BRUNT, 1987).

Os compostos quaternários de amônia são largamente utilizados como agentes antimicrobianos na área médica e de alimentos, entretanto tem sido relatada em vários países a seleção de bactérias resistentes devido à exposição continuada a esses compostos (SUNDHEIM et al., 1998). Em bactérias Gram-negativas, a modificação no seu perfil de ácidos graxos leva a alterações na membrana externa, protegendo-as contra muitos produtos químicos (JONES et al., 1989). Em geral, bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos compostos quaternários de amônia, porém foram relatadas algumas estirpes de *Staphylococcus* que continham genes de resistência a esses compostos (SUNDHEIM et al., 1998).

2.6. Prata

2.6.1. Propriedades Antimicrobianas e Mecanismo de Ação

A seleção de estirpes de bactérias resistentes aos atuais antibióticos (KYRIACOU et al., 2004) é um problema sério de saúde pública e, portanto, há forte incentivo para desenvolver novos bactericidas (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004). Assim, as atuais pesquisas com nanomateriais antimicrobianos são particularmente oportunas (MORONES et al., 2005). Entre os nanomateriais, as AgNPs são as mais promissoras devido à sua propriedade antimicrobiana e produção econômica. A prata é conhecida há décadas como eficiente bactericida, ligando-se ao DNA e impedindo a replicação celular (SILVER, 2003; WRIGHT et al., 1994).

Os íons prata atacam as células microbianas de maneira complexa, atingindo vários sítios celulares, sendo o risco de seleção de bactérias resistentes menor, em comparação com os antibióticos (DAMM et al., 2007), que geralmente exercem o seu efeito antimicrobiano em local específico (GOGOI et al., 2006).

Além da prata, outros metais pesados podem ser germicidas, como o mercúrio e o cobre, e a capacidade desses metais, especialmente a prata, em exercer atividade antimicrobiana em quantidades extremamente pequenas é chamada de ação oligodinâmica (*olígos* = pequeno e *dinamikós* = poder) (PELCZAR et al., 1997).

A prata, em seus muitos estados de oxidação (Ag^0 , Ag^+ , Ag^{2+} e Ag^{3+}), tem sido reconhecida como elemento com forte ação biocida contra muitos microrganismos. Acredita-se que a alta afinidade da prata com enxofre ou fósforo é o elemento-chave de sua propriedade antibacteriana (LANSDOWN, 2002). Mastsumure et al. (2003) propuseram que os íons Ag^+ , liberados das NPs (Ag^0), podem interagir com o fósforo no DNA, resultando na inativação de sua replicação, ou reagir com proteínas contendo enxofre para inibir sua função enzimática, sendo este e o fósforo encontrados em abundância em toda a membrana celular (MORONES et al., 2005).

A atividade antibacteriana das AgNPs é influenciada pelo tamanho das partículas. Assim, as AgNPs com tamanho reduzido e sem agregação

são preferíveis nessa aplicação, demonstrando ação contra as bactérias Gram-negativas, aquelas com o tamanho por volta de 5 nm. Outro fator importante é a estrutura cristalina que as nanopartículas apresentam. Estudos mostram que, quanto maior o número de facetas nas partículas, maior a sua reatividade (MORONES et al., 2005), sendo o tamanho e microestrutura das NPs altamente dependentes da temperatura e concentração do precursor e das propriedades de síntese (JING et al., 2009).

Acredita-se que o efeito inibitório dos íons Ag^+ é devido à adsorção na parede celular carregada negativamente, desativando enzimas celulares, destruindo a permeabilidade da membrana (PERCIVAL et al., 2005) e, por último, levando a uma lise celular e morte (SAMBHY et al., 2006; RATTE, 1999). Entretanto, o mecanismo de ação das AgNPs não é bem conhecido (MORONES et al., 2005).

A interação da prata iônica, a qual pode ser liberada por nanopartículas, com grupos tiols e formação de S-Ag ou formação de pontes dissulfeto, pode danificar as proteínas bacterianas, interromper a cadeia de transporte de elétrons e dimerizar DNA (FENG et al., 2000); de forma similar, íons prata possuem atividade antiviral pela sua interação com DNA e grupos tiols em proteínas (KIM et al., 2008).

O principal problema na aplicação de AgNPs está relacionado com a sua estabilidade e prevenção da formação de agregados, que levam a uma menor atividade antimicrobiana (SHRIVASTAVA et al., 2007). O aumento na estabilidade de dispersões aquosas de AgNPs pode ser obtido por duas maneiras. A primeira é baseada na repulsão estérica, em que o efeito estabilizante é conseguido com o emprego de polímeros ou surfactantes não iônicos, que são adsorvidos na interface (KVIÍTEK et al., 2008). Os surfactantes não iônicos são adsorvidos de forma mais compacta na superfície das nanopartículas do que os polímeros, apresentando excelente efeito antimicrobiano (SHRIVASTAVA et al., 2007). O segundo mecanismo é baseado na repulsão eletrostática, em que a carga superficial da nanopartícula pode ser aumentada pela adição do surfactante iônico, fornecendo uma proteção eletrostática contra a agregação de umas com as outras. As NPs sem agregação são capazes de interagir fortemente com a

parede celular devido à alta energia superficial e mobilidade não afetada pela formação de agregados (KVÍTEK et al., 2008).

Nanopartículas com 100 nm ou menos de dimensão têm propriedades físico-químicas únicas, como alta capacidade catalítica e capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (LIMBACH et al., 2007). A prata na forma de nanopartículas poderia ser, portanto, mais reativa com seu aumento de propriedades catalíticas e tornar-se mais tóxica do que seu equivalente na forma macroscópica. Além disso, presume-se que a toxicidade é dependente do tamanho e forma (PAL et al., 2007), pois partículas de tamanho reduzido (10 nm) podem passar através da membrana celular, e o acúmulo intracelular de nanopartículas pode levar a uma deficiência no funcionamento da célula (KLOEPFER et al., 2005; MORONES et al., 2005).

O mecanismo de ação pelo qual as nanopartículas são capazes de penetrar na bactéria não é totalmente compreendido, mas sugere-se que, no caso de *E. coli* submetida a AgNPs, a mudança ocorrida na morfologia da membrana pode aumentar sua permeabilidade e afetar as propriedades de transporte da membrana (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004).

Estudos realizados por Lara et al. (2010) sugeriram que o modo de ação das AgNPs é semelhante ao modo de ação dos íons de prata, os quais complexam com grupos contendo átomos de enxofre, oxigênio ou nitrogênio, que estão presentes em aminoácidos e ácidos nucleicos, assim como os grupos tiols ou fosfatos.

Há relatos na literatura de que as interações eletrostáticas entre as cargas negativas presentes na superfície bacteriana com nanopartículas carregadas positivamente são fundamentais para a atividade antimicrobiana das nanopartículas (STOIMENOV et al., 2002). No entanto, alguns trabalhos têm indicado que as NPs com cargas negativas também apresentaram efeito antimicrobiano (FAYAZ et al., 2009; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004).

De acordo com Sondi e Salopek-Sondi (2004), o mecanismo de interação dessas partículas, carregadas negativamente com os constituintes da membrana, não está compreendido ainda, mas parece que, apesar de possuir cargas negativas, de algum modo essas nanopartículas interagem

com os elementos da membrana bacteriana, provocando mudanças estruturais e de degradação, levando à morte celular.

Tem sido reportado que as AgNPs apresentam efeito bactericida maior sobre bactérias Gram-negativas do que nas Gram-positivas, em razão da diferença estrutural da parede celular entre essas bactérias (FAYAZ et al., 2009; SHRIVASTAVA et al., 2007). Entretanto, a explicação para tal fato não está totalmente compreendido.

Uma das explicações é que as bactérias Gram-negativas possuem fina camada de peptidoglicano, permitindo absorção mais rápida dos íons na célula (GRAY et al., 2003; SCHIERHOLZ et al., 1998). No entanto, as bactérias Gram-positivas possuem espessa camada de peptidoglicano, constituindo-se em cadeias de polissacarídeos ligadas entre si por pequenos peptídeos, formando uma estrutura tridimensional rígida. A rigidez e as ligações cruzadas tornam a parede celular das bactérias Gram-positivas local com poucos sítios de ancoragem e de difícil penetração (FAYAZ et al., 2009; SHRIVASTAVA et al., 2007).

2.6.2. Aplicações das Nanopátículas de Prata (AgNPs)

As AgNPs têm despertado grande interesse devido à sua potencial aplicação como bactericida alternativo no combate de estirpes resistentes aos antibióticos. Uma importante aplicação é em filtros utilizados nas estações de tratamento de água, pois as AgNPs retardam a colonização do biofilme nas unidades filtrantes, aumentando sua vida útil (FABREGA et al., 2008). Sua incorporação em membranas filtrantes também oferece nova alternativa para o controle da incrustação biológica ou *biofouling* (LI et al., 2008; PRIJCK et al., 2007), causada pelo acúmulo indesejável de microrganismos nas membranas.

As concentrações aquosas de Ag^+ são, entretanto, tipicamente baixas em sistemas de tratamento de águas residuais devido à sua forte complexação com vários ligantes como cloreto, sulfeto, tiosulfato e carbono orgânico dissolvido (GUGGENBICHLER et al., 1999). Como resultado, a toxicidade da prata para microrganismos não é observada.

Compostos à base de prata foram explorados por séculos devido às suas propriedades medicinais e foram utilizados como remédios populares no tratamento de tétano e reumatismo no século XIX e no tratamento de resfriados e gonorreia antes da chegada dos antibióticos no início do século XX (MIRSATTARI et al., 2004). muitos estados dos EUA utilizavam solução de nitrato de prata a 1% nos olhos dos recém-nascidos, para prevenir infecção ocular chamada de oftalmia gonorreica neonatal, sendo este substituído posteriormente pelos antibióticos. No entanto, recentemente houve renovado interesse pelo uso da prata. Curativos impregnados com esse metal, por exemplo, liberam lentamente os íons prata, sendo especialmente úteis para bactérias resistentes aos antibióticos (TORTORA et al., 2002).

A prata tem sido utilizada por milênios e aplicada desde em simples estocagem de água e leite em contêineres de prata até no uso mais complexo, como revestimento de implantes e instrumentos médicos (LI et al., 2008), de cateteres, embalagens para alimentos, roupas, curativos, pomadas (LARA et al., 2010); e resinas dentárias, tratamento de queimaduras e na medicina homeopática, com um mínimo risco de toxicidade em humanos (LANSDOWN, 2006).

O pequeno tamanho das AgNPs (< 200 nm) no estado sólido ou coloidal permite maior efeito microbiológico do que os sais de prata (ATIYEH et al., 2007).

2.7. Teste de Inibição da Multiplicação Microbiana por Difusão em Ágar

Com a descoberta dos antibióticos e vários outros agentes antimicrobianos, numerosos métodos têm sido desenvolvidos para testar esses compostos contra vários microrganismos. Inicialmente, os microrganismos eram incubados com os agentes antimicrobianos, e a diminuição de células viáveis era monitorada (TOIT; RAUTENBACH, 2000).

Muitos métodos podem ser utilizados para avaliar o efeito antimicrobiano de um composto, entretanto os métodos não são baseados no mesmo princípio. Assim, os resultados podem ser profundamente influenciados pela escolha do método (VANDEN BERGHE; VLIETINCK,

1991). Os principais métodos encontrados na literatura são: ensaios bioautográficos, teste de diluição e teste de difusão (RIOS et al., 1988).

O teste de difusão em ágar pode ser utilizado para determinar a atividade antimicrobiana, *in vitro*, de determinado material, sendo um método adequado para estudar a sensibilidade das bactérias. O diâmetro do halo de inibição expressa a difusão do agente, determinando o poder antimicrobiano do material testado (BORTOLETTO et al., 2005). Dessa forma, os testes de difusão em ágar são os mais comumente utilizados em Laboratório de Microbiologia.

Os métodos de difusão têm como fundamento a difusão da substância a ser analisada em um meio de cultura sólido inoculado com o microrganismo-teste. A inoculação do antimicrobiano pode ser feita utilizando discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio sólido de cultura (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). O que difere os testes de difusão em ágar é a forma como os antimicrobianos são colocados na placa (RIOS et al., 1988).

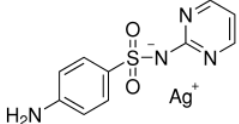
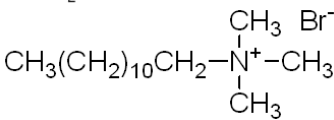
A técnica de difusão em ágar é amplamente utilizada para avaliar o efeito antimicrobiano de várias substâncias. Entretanto, ao utilizar esse método, vários fatores podem se tornar fontes de erros, como composição, preparação incorreta e espessura do meio de cultura, densidade do inóculo incorreta, uso de swab com excesso de caldo para inoculação das placas, temperatura e tempo de incubação inadequados, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, leitura prematura, erro na medida das zonas de inibição, ou o uso de culturas mistas ou contaminadas (SILVA, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo das Dispersões Coloidais Contendo Nanopartículas de Prata (AgNPs)

Os produtos comerciais sulfadiazina de prata (SP) (Aldrich®, 98% p/p) e brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) (Sigma®, 99% p/p) foram usados nas formulações das dispersões coloidais. Para remover contaminantes orgânicos, as vidrarias foram lavadas com ácido nítrico (Vetec®) 10% v/v e enxaguados com água deionizada (Milipore). As características dos reagentes como fórmula molecular e estrutural e massa molar se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 – Fórmula molecular e estrutural e massa molar da sulfadiazina de prata e brometo de dodeciltrimetil amônio

Reagente	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural	Massa Molar (g/mol)
Sulfadiazina de prata (SP)	$C_{10}H_9AgN_4O_2S$		357,14
Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)	$CH_3(CH_2)_{11}N(CH_3)_3Br$		308,34

As dispersões coloidais contendo AgNPs foram obtidas da seguinte forma: primeiramente, dispersões de 15,6 mM de DTAB e 31,2 mM de DTAB foram preparadas, o que correspondeu à concentração crítica micelar (1 x CMC) e duas vezes a concentração crítica micelar (2 x CMC), respectivamente. Em seguida, foram feitas as dispersões de 0,1 g de SP em 10 mL de DTAB 1 x CMC e 0,1 g de SP em 10 mL de DTAB 2 x CMC, correspondendo a 1% m/v de SP em DTAB. Todas as amostras foram preparadas utilizando-se água deionizada. As dispersões ficaram sob a agitação constante por 3 h na temperatura entre 20 °C e 25 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (*Eppendorf* 5804 R) a 4.000 x g por 30 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi analisado por espalhamento dinâmico de luz, espectroscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de transmissão e teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar. As análises também foram realizadas utilizando-se como controles a SP 1% m/v e DTAB 1 x CMC e 2 x CMC, separadamente.

Na Tabela 2, apresentam-se as dispersões utilizadas no experimento.

Tabela 2 – Dispersões usadas no experimento

Dispersões	Amostra
A	SP 1% m/v
B	DTAB 1 x CMC
C	DTAB 2 x CMC
D	Dispersão coloidal de AgNPs obtida pela dispersão de SP 1% m/v em DTAB 1 x CMC
E	Dispersão coloidal de AgNPs obtida pela dispersão de SP 1% m/v em DTAB 2 x CMC

3.2. Medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Espectroscopia de Fluorescência

As análises de espalhamento dinâmico de luz e espectroscopia de fluorescência foram realizadas no Laboratório de Microfluídica e Fluidos Complexos do Departamento de Física, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

3.2.1. Medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A análise de DLS foi utilizada neste experimento para determinar o tamanho médio das AgNPs nas dispersões coloidais. Para as análises de DLS, as amostras foram filtradas utilizando-se um sistema fechado de circulação, com as amostras passando por um filtro Minisart[®]CE (Sartorius) MRS-copolímero, com uma área de 5,3 cm² e poros de 0,2 µm de diâmetro, para remover partículas de poeira que poderiam interferir nas análises. As amostras foram filtradas até se observar a estabilização da luz espalhada média, aproximadamente 5 min. A temperatura foi controlada em 25 °C ± 1 °C.

As medidas de DLS foram realizadas utilizando um correlacionador (Turbocorr de 522 canais) e um detector (fotodiodo de avalanche, Brookhaven Co.); como fonte de luz, usou-se laser de estado sólido de 7 mW e comprimento de onda de 678,7 nm. As medidas de espalhamento de luz foram realizadas a um ângulo fixo de 30°. O tempo total das medidas foi de 20 min para a dispersão E e 51 min para a dispersão D.

Para realizar as medidas de DLS, foi necessário determinar a viscosidade e o índice de refração das amostras. As medidas de viscosidade foram determinadas a 25 °C, utilizando-se um Reômetro com sistema modular avançado (HAAKE MARS, Thermo Electron Corp., Germany) do Departamento de Tecnologia de Alimentos. O índice de refração das amostras foi determinado a 25 °C, utilizando-se o refratômetro *Analytic Jena AG Abbe, model 09-2001*, Germany do Laboratório Quivecom, do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

Os valores de viscosidade e índice de refração das amostras estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Viscosidade e índice de refração das dispersões de DTAB 1 x CMC + SP 1% m/v (D) e do DTAB 2 x CMC + SP 1% m / v (E)

Amostras	Viscosidade (Pa.s)	Índice de Refração
D	$1,0863 \times 10^{-3}$	1,3330
E	$1,1028 \times 10^{-3}$	1,3350

O espectrômetro utilizado neste experimento e o laser incidindo sobre a amostra podem ser visualizados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

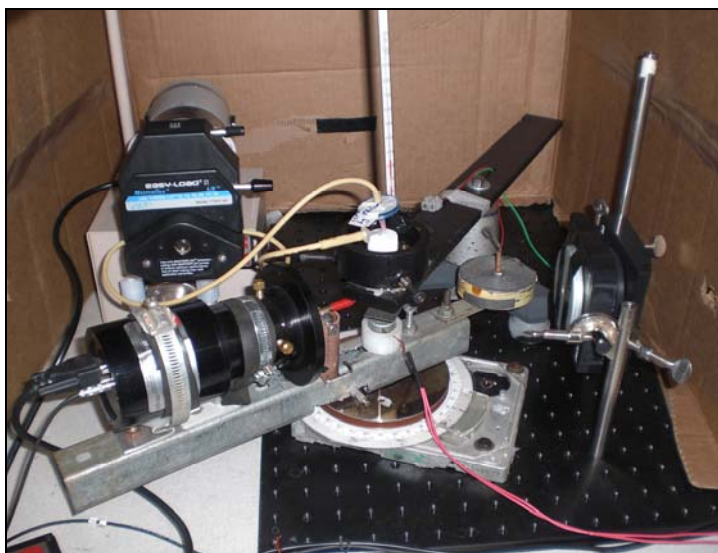


Figura 6 – Espectrômetro utilizado no experimento para a análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

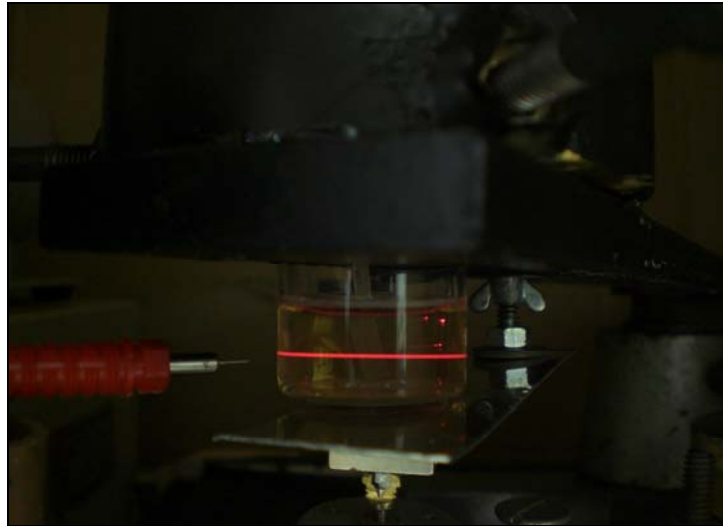


Figura 7 – Feixe de laser incidindo sobre a amostra no espalhamento dinâmico de luz.

3.2.2. Espectroscopia de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando-se um espectrômetro modelo USB 2000 da *Ocean Optics* e, como fonte de radiação, o LED (do inglês *Light Emitting Diode*) com a intensidade máxima em 369,7 nm. As medidas foram realizadas em um ambiente fechado, para evitar interferência da luz externa. A Figura 8 mostra o pico característico do LED.

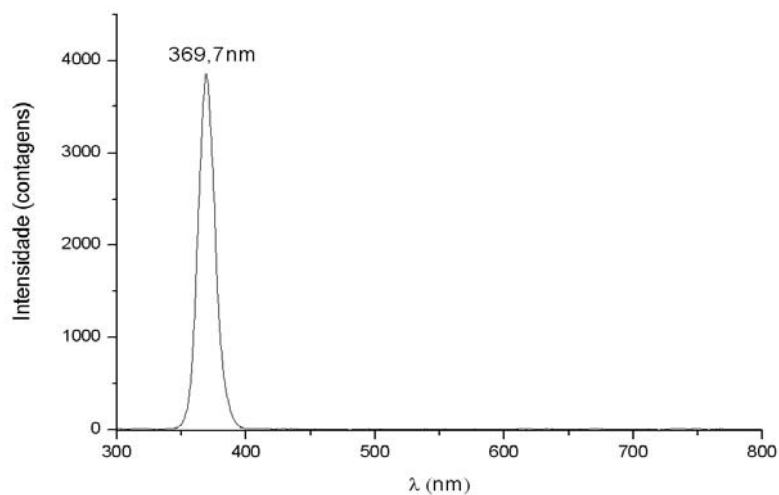


Figura 8 – Curva espectral do LED de ultravioleta.

3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Parte da caracterização das nanopartículas foi realizada por TEM. As análises de TEM foram realizadas em um microscópio Tecnai – G2-20-FEI 2006, disponível no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Esse microscópio é otimizado para estudos estruturais em resolução atômica, consistindo de um canhão com filamento termo-iônico de LaB_6 , com potencial de aceleração de 200 KV (Figura 9).

As amostras foram preparadas pingando-se uma gota da dispersão coloidal em grades de cobre recobertas com um fino filme de carbono amorfo. As amostras foram observadas no microscópio após a secagem.



Figura 9 – Microscópio eletrônico de transmissão utilizado no experimento para caracterização das AgNPs.

3.4. Teste de Inibição da Multiplicação Microbiana por Difusão em Ágar

A análise microbiológica foi desenvolvida no Laboratório de Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

A avaliação microbiológica foi feita pela técnica da inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar, de acordo com a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003), com modificações.

O efeito antimicrobiano das dispersões foi avaliado contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiela pneumoniae* ATCC 10031 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Para a manutenção das culturas no laboratório, elas foram congeladas a – 80 °C em caldo infusão cérebro e coração (BHI) e glicerol na proporção de 80:20 v/v.

3.4.1. Preparo do Meio

O ágar *Müller-Hinton* (Himedia®) foi preparado a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante. Imediatamente após a esterilização a 121 °C por 15 min, o meio foi resfriado em banho-maria entre 45 °C e 50 °C. Em seguida, foram distribuídos em torno de 25 mL a 30 mL de ágar em placas de Petri, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm.

3.4.2. Preparo do Inóculo

As bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foram ativadas por duas vezes consecutivas em caldo BHI e incubadas a 37 °C por 18 h a 24 h. Para obter colônias isoladas, foram feitas estrias em placas de Petri contendo Ágar-Padrão para Contagem (PCA) e incubadas na mesma temperatura por 18 h a 24 h. O mesmo procedimento foi realizado para *E. aerogenes*, porém essa bactéria foi incubada a 30 °C.

O inóculo foi preparado fazendo-se suspensão direta, em solução salina 0,85 % m/v, das colônias selecionadas da placa de PCA após 18 h a 24 h de incubação. A suspensão foi ajustada para que sua turbidez coincidissem com a da solução-padrão de McFarland 0,5, o que resultou numa suspensão contendo, aproximadamente, de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL a $2,0 \times 10^8$ UFC/mL.

3.4.3. Inoculação das Placas-Teste

Um *swab* de algodão esterilizado foi mergulhado na suspensão preparada anteriormente até 15 min após ajustar a turbidez da suspensão do inóculo. O *swab* foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para retirar o excesso de inóculo.

A superfície seca da placa de ágar *Müller-Hinton* foi inoculada passando-se o *swab* em toda a superfície do ágar. Repetiu-se o procedimento outras duas vezes, girando a placa, aproximadamente, 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se o *swab* na margem da placa contendo o meio de cultura.

Poços foram perfurados no ágar utilizando-se moldes de plástico previamente cortados e autoclavados a 121°C por 15 min, de forma a padronizar o diâmetro da perfuração em 5 mm, sendo perfurado um poço em cada placa de Petri.

Posteriormente, foram inoculados 30 μL de cada dispersão-teste, em cada poço. As placas foram mantidas sob refrigeração de 7°C a 10°C por 14 h para difusão dos antimicrobianos e, em seguida, incubadas na temperatura ótima de cada microrganismo testado por 18 h. Todo o experimento foi feito em duplicata.

3.4.4. Determinação dos Halos de Inibição das Dispersões Diante das Bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas

Após 18 h de incubação, na temperatura adequada de cada microrganismo, os halos de inibição foram medidos em centímetros, utilizando-se uma régua milimetrada.

3.5. Análise Estatística

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, cujos fatores foram cinco níveis de antimicrobianos e seis de bactérias, com três repetições. Uma vez verificada a significância da interação pelo teste F da ANOVA, realizou-se o desdobramento e, posteriormente, empregou-se o teste de Duncan a 5% de probabilidade, para comparar as médias dos níveis de cada fator estudado. Para a realização da análise, utilizou-se o software *Statistical Analysis System* (SAS[®]), versão 9.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção das Dispersões Coloidais Contendo Nanopartículas de Prata

Dispersões coloidais contendo AgNPs foram obtidas neste experimento, por um novo método de síntese. Quando a SP foi dispersa no DTAB, observou-se a formação de um composto opaco de coloração branco-esverdeada. Após alguns minutos de agitação, a cor passou para um verde (musgo) mais escuro, mudando posteriormente para um tom acinzentado no fim da agitação, como mostrado na Figura 10a. Percorrido o tempo de agitação, as amostras foram centrifugadas, obtendo-se um precipitado de coloração cinza-escura e o sobrenadante amarelo-translúcido. (Figura 10b).

A mudança de coloração para amarelo indica a formação de AgNPs (GUZMÁN et al., 2008; ŠILEIKAITĖ et al., 2006; SUI et al., 2006). O sobrenadante foi analisado por espalhamento dinâmico de luz (DLS), fluorescência, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e teste de inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar, enquanto o precipitado foi descartado.



Figura 10 –Dispersão de sulfadiazina de prata 1% m/v em brometo de dodeciltrimetil amônio na concentração de 2 x CMC, após 3 h de agitação (a) e após a centrifugação (b).

4.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A análise de DLS foi importante ferramenta para mensurar o tamanho das nanopartículas, sendo os tamanhos médios delas de 3 ± 1 nm para a dispersão D (menor concentração de surfactante, 1 x CMC) e de $2,8 \pm 0,4$ nm para a dispersão E (maior concentração de surfactante, 2 x CMC).

A função de correlação com o tempo da intensidade de luz espalhada encontra-se na Figura 11. Pode-se observar, nesta Figura, que as duas dispersões testadas apresentaram comportamento muito semelhante. A curva correspondente à dispersão E está ligeiramente deslocada para a esquerda em relação à curva da dispersão D, e isso indica que a primeira possui nanopartículas menores, devido à maior velocidade na taxa de decaimento.

De acordo com Rocha (2008), quando aumenta a proporção de estabilizante em relação ao precursor metálico, obtém-se maior número de partículas de menor tamanho, o que está de acordo com os dados obtidos neste trabalho. A dispersão E possui partículas com diâmetro menor e os resultados indicam que há maior número de partículas nessa dispersão em relação à da dispersão D (Figura 11), devido à menor dispersão dos dados da função correlação, mesmo com tempo de medida menor (20 min para a

primeira e 51 min para a segunda). Entretanto, isso pode ter sido efeito da filtragem, uma vez que as amostras eram filtradas por cinco min antes da medida, levando a uma diminuição do sinal (intensidade da luz espalhada) e significando queda no número de partículas. Apesar de o diâmetro do filtro (200 nm) ser bem maior em relação ao diâmetro das partículas (aproximadamente 3 nm), esse poderia reter as partículas devido ao acúmulo de resíduos na membrana filtrante.

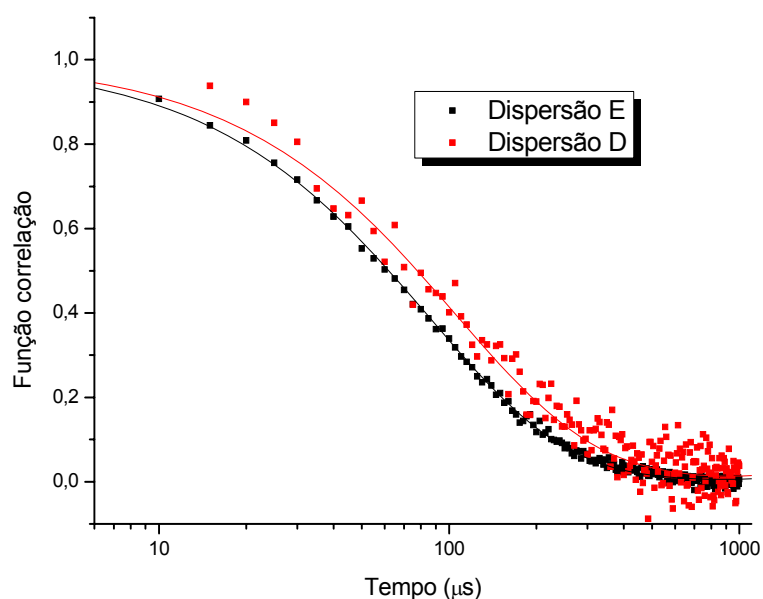


Figura 11 – Função de correlação com o tempo da intensidade de luz espalhada pelas dispersões coloidais contendo AgNPs obtidas pela dispersão de sulfadiazina de prata (SP) 1% m/v em brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) nas concentrações de 1 x CMC (dispersão D) e 2 x CMC (dispersão E).

As medidas de DLS também foram realizadas para as dispersões de DTAB disperso em água nas concentrações analisadas. Porém, essas dispersões praticamente não espalharam a luz e não foi observado nenhum sinal significativo de correlação. Isso mostra que a intensidade da luz espalhada pelas dispersões D e E são provenientes das AgNPs. Devido à opacidade da dispersão A, não foi possível realizar a análise de DLS.

4.3. Avaliação da Presença de Nanopartículas nas Dispersões Coloidais por Espectroscopia de Fluorescência

Neste experimento foi observada a emissão de fluorescência apenas pelas dispersões D e E, indicando a presença de nanopartículas nessas amostras, sendo o mesmo não observado pelas demais dispersões, que continham apenas SP ou DTAB, ou seja, observou-se emissão de fluorescência apenas quando se tinham DTAB e SP juntos. A emissão de fluorescência foi observada aproximadamente entre 400 nm e 650 nm, com pico máximo em torno de 480 nm, como mostrado na Figura 12. O alargamento do pico, ou seja, a emissão de fluorescência em ampla faixa de comprimento de onda, pode indicar dispersão de tamanhos, pois a emissão de luz em determinados comprimentos de onda está relacionada com o tamanho da partícula.

O pico em torno de 370 nm, que foi comum em todas as amostras, é o pico característico da luz emitida pelo LED (Figura 8).

A emissão de fluorescência é uma característica das nanopartículas. Estas absorvem a luz de menor comprimento de onda (maior energia) como a luz UV, deixando os elétrons excitados. Nesse estado, os elétrons saltam para níveis de energia maiores e quando retornam ao estado fundamental, passando por níveis intermediários de energia, liberam o excesso de energia na forma de luz, que possui comprimento de onda maior (menor energia).

Em um estudo realizado por Alqudami e Annapoorni (2005), as AgNPs dispersas em água apresentaram pico de emissão de fluorescência em 508 nm quando excitadas com luz com comprimento de onda 390 nm. No experimento feito por Jiang et al. (2005), foram obtidos picos de fluorescência em 465 nm para AgNPs, estando esses valores dentro da faixa de emissão de fluorescência encontrada neste experimento.

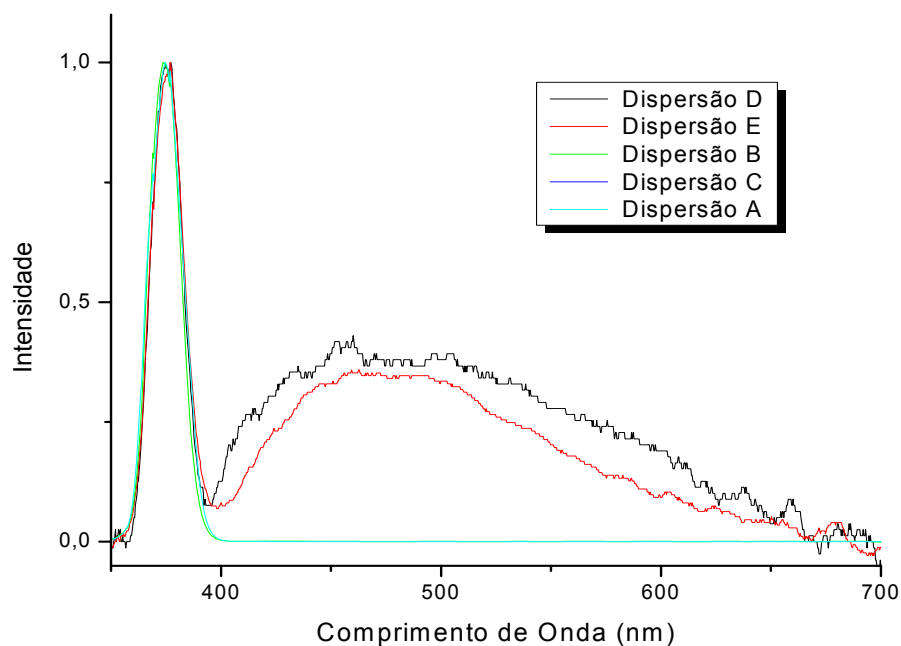


Figura 12 – Espectros de fluorescência das dispersões de sulfadiazina de prata (SP) 1% m/v (dispersão A), brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) 1 x CMC (dispersão B), brometo de dodeciltrimetil amônio 2 x CMC (dispersão C), dispersão coloidal de AgNPs em DTAB 1 x CMC (dispersão D) e dispersão coloidal de AgNPs em DTAB 2 x CMC (dispersão E), excitadas com luz UV, com comprimento de onda de 369,7 nm.

4.4. Determinação do Tamanho e Espaçamentos Interplanares das Nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A formação de nanopartículas foi confirmada por TEM. Pode-se observar na imagem obtida (Figura 13a) uma nanopartícula de aproximadamente 10,6 nm de largura e 14,0 nm de comprimento. Além do tamanho, essa técnica possibilitou a observação da forma da nanopartícula e detalhes de nível atômico, como a disposição dos átomos. Entretanto, o tamanho obtido por essa técnica não corroborou com o tamanho obtido por DLS. A Figura 13b mostra a ordenação hexagonal dos átomos, que é uma característica da prata.

De acordo com Hoffmann et al. (1997), é possível observar diferenças de tamanho de partículas, conforme a técnica empregada na sua determinação. A microscopia eletrônica fornece a imagem de uma partícula

isolada, enquanto DLS determina o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão. Além disso, a secagem da amostra pode levar à formação de agregados (CHU; LIU, 2000).

As análises de DLS também foram feitas logo após o preparo, sendo as análises de TEM realizadas após 24 h. Assim, o tamanho das partículas pode ter aumentado nesse período de tempo, pois muitas vezes é observada opacidade do meio após 24 h a 48 h, que pode ser devido à formação de agregados.

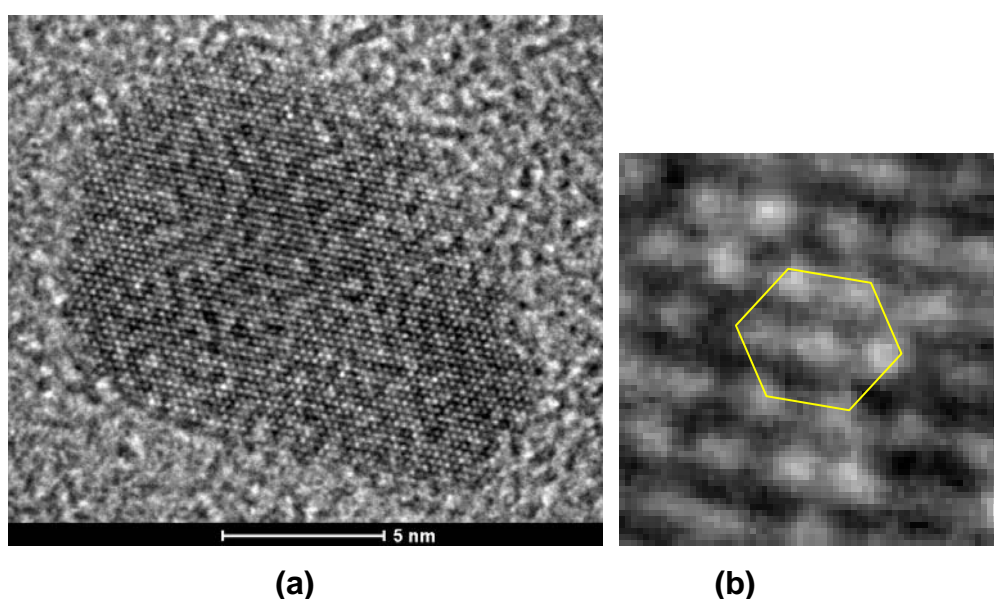


Figura 13 – Imagem da nanopartícula de prata obtida por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) proveniente da dispersão D (a), e ampliação da Figura 13a mostrando ordenação hexagonal dos átomos (b).

Na Figura 14 está representada a transformada de *Fourier* da Figura 13a, onde são observados os picos que correspondem ao espaçamento entre os planos definidos pelos átomos. Isso revelou espaçamentos interplanares próximos a 2,3 Å (ou 0,23 nm), característicos da prata na orientação {111} (0,2359 nm). A linha tracejada em amarelo corresponde à posição esperada dos picos para essa distância, o que sugere que as nanopartículas formadas são de prata.

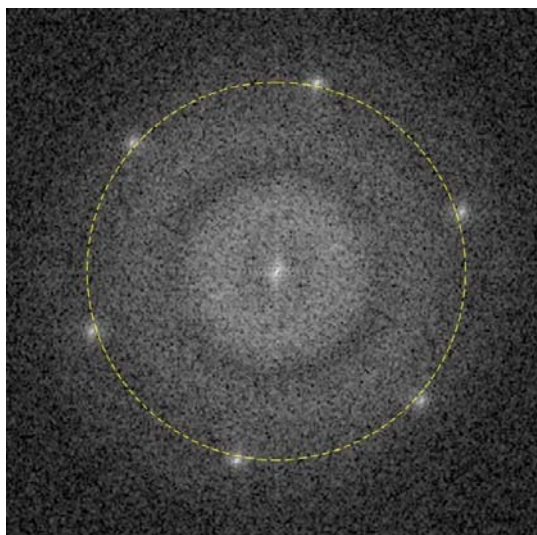


Figura 14 – Transformada de *Fourier* (FFT do Inglês *Fast Fourier Transformed*) da imagem da nanopartícula de prata obtida por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) (Figura 13a).

4.5. Teste de Inibição da Multiplicação Microbiana por Difusão em Ágar

O diâmetro do halo de inibição das bactérias foi diferente ($p < 0,05$) pelo teste F, em função das dispersões antimicrobianas e dos microrganismos analisados. Além disso, a interação entre dispersões e microrganismos afetou o tamanho do halo de inibição ($p < 0,05$). Uma vez verificada a significância pelo teste F ($p < 0,05$), foi realizado o desdobramento fatorial, ora fixando as dispersões (Tabela 5), ora fixando as bactérias (Tabela 6).

As bactérias Gram-negativas foram mais sensíveis à ação da SP do que *S. aureus* (Tabela 5). No entanto, o mesmo não foi observado em *S. epidermidis*, também Gram-positiva. A SP é um antimicrobiano de amplo espectro, e atua como bactericida em ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MODAK; FOX, 1973). A SP é o antimicrobiano de uso tópico mais popular para sistemas de liberação da prata, devido à indisponibilidade de alternativas mais seguras (JAIN et al., 2009). De acordo com Dunn et al. (2004), a liberação de prata é mais lenta a partir da SP do que do nitrato de prata.

Tabela 5 – Diâmetro em centímetros do halo de inibição dos microrganismos pela ação da sulfadiazina de prata 1% m/v (A), brometo de dodeciltrimetil amônio 1 x CMC (B) e 2 x CMC (C) e das dispersões coloidais contendo as AgNPs em brometo de dodeciltrimetil amônio 1 x CMC (D) e em brometo de dodeciltrimetil amônio 2 x CMC (E)

Bactérias	Halo de Inibição* (cm)				
	A	B	C	D	E
<i>S.aureus</i>	1,3 ± 0,0 c	3,9 ± 0,09 a	4,3 ± 0,1 a	4,5 ± 0,6 a	4,6 ± 0,6 a
<i>S.epidermidis</i>	2,1 ± 0,2 a	3,4 ± 0,5 a	3,7 ± 1,0 a	3,3 ± 0,06 a	4,6 ± 0,5 a
<i>E.coli</i>	1,8 ± 0,06 a b	2,0 ± 0,3 b	2,3 ± 0,8 b	3,3 ± 1,1 a	3,2 ± 0,4 b
<i>P.aeruginosa</i>	1,9 ± 0,4 a b	1,0 ± 0,0 c	1,4 ± 0,2 b	2,7 ± 1,2 a	3,1 ± 0,1 b
<i>K.pneumoniae</i>	1,9 ± 0,1 a b	3,5 ± 0,4 a	3,8 ± 0,8 a	3,9 ± 0,7 a	2,9 ± 0,8 b
<i>E.aerogenes</i>	1,7 ± 0,3 b	2,2 ± 0,4 b	2,0 ± 0,6 b	3,4 ± 1,6 a	2,9 ± 1,0 b

*Média de três repetições.

As médias seguidas com a mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

O surfactante catiônico (DTAB) apresentou maior efeito antimicrobiano sobre as bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas, à exceção de *K. pneumoniae*. Em um estudo realizado por Murguía et al. (2008) também foi relatado que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis que as Gram-negativas aos surfactantes catiônicos testados. De acordo com os autores, isso é devido ao fato de a membrana externa das bactérias Gram-negativas ser menos permeável a compostos anfífilos. Além disso, esses autores verificaram que a atividade de surfactantes catiônicos foi maior que seus homólogos neutros, e isso pode ser atribuído à alta densidade de cargas negativas da parede celular bacteriana.

A dispersão coloidal de AgNPs obtida pela dispersão de 1% m/v de SP em DTAB na concentração 1 x CMC (dispersão D) apresentou a mesma eficiência para inibir as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Entretanto, a dispersão coloidal contendo AgNPs obtida pela dispersão de 1% m/v de SP, em DTAB na concentração 2 x CMC (E), foi mais eficiente contra as bactérias Gram-positivas. Isso pode ser devido à maior concentração do surfactante catiônico na dispersão E, pois este apresenta maior atividade antimicrobiana sobre as bactérias Gram-positivas (Tabela 5).

AgNPs podem provocar perfurações na parede celular bacteriana, conforme demonstrado por Shrivastava e colaboradores (2007), usando microscopia eletrônica. Os surfactantes impedem a agregação das nanopartículas, aumentando sua estabilidade e também o seu efeito antimicrobiano. Kviítek et al. (2008) demonstraram aumento no efeito antimicrobiano das AgNPs associadas ao surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS). Esse aumento no efeito antimicrobiano pode ser devido à capacidade do surfactante em aumentar a permeabilidade da parede celular ou levar ao seu rompimento, especialmente, em bactérias Gram-positivas.

Shrivastava et al. (2007) observaram que o efeito antimicrobiano das AgNPs foi mais pronunciado sobre as bactérias Gram-negativas em relação às Gram-positivas, independentemente se eram antibióticos resistentes ou não. Entretanto, no estudo realizado por Lara et al. (2010) não foi encontrada diferença significativa na atividade antimicrobiana das AgNPs sobre os diferentes grupos testados (Gram-positivos *versus* Gram-negativos e antibióticos resistentes *versus* suscetível), sugerindo que as AgNPs possuem efeito bactericida de amplo espectro.

Acredita-se que a alta afinidade da prata com enxofre ou fósforo é o principal elemento de sua propriedade antimicrobiana (LANDOWN, 2002). O fósforo é um dos principais constituintes encontrados na parede celular das bactérias Gram-negativas, formando a bicamada lipídica; é também encontrado na parede celular das bactérias Gram-positivas como constituinte dos ácidos teicoicos. Assim, a prata pode apresentar ação antimicrobiana tanto sobre bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas.

Observou-se neste experimento que a dispersão coloidal D, em que a SP foi dispersa em DTAB 1 x CMC, mostrou maior ação antimicrobiana sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* (Tabela 6), quando comparada com a dispersão de SP em água (dispersão A). No entanto, verificou-se que a dispersão coloidal E, em que a SP está dispersa em DTAB 2 x CMC, foi mais eficiente do que a SP (dispersão A) sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 6 – Diâmetro em centímetros do halo de inibição dos microrganismos pela ação da sulfadiazina de prata 1% m/v (A), brometo de dodeciltrimetil amônio a 1 x CMC (B) e 2 x CMC (C) e das dispersões coloidais contendo as NPs de prata em brometo de dodeciltrimetil amônio 1 x CMC (D) e em brometo de dodeciltrimetil amônio 2 x CMC (E)

Bactérias	Halo de Inibição* (cm)				
	A	B	C	D	E
<i>S.aureus</i>	1,3 ± 0,0 b	3,9 ± 0,09 a	4,3 ± 0,1 a	4,5 ± 0,6 a	4,6 ± 0,6 a
<i>S.epidermidis</i>	2,1 ± 0,2 c	3,4 ± 0,5 b	3,7 ± 1,0 a b	3,3 ± 0,06 b	4,6 ± 0,5 a
<i>E.coli</i>	1,8 ± 0,06 c	2,0 ± 0,3 b c	2,3 ± 0,8 a b c	3,3 ± 1,1 a	3,2 ± 0,4 a b
<i>P.aeruginosa</i>	1,9 ± 0,4 b c	1,0 ± 0,0 c	1,4 ± 0,2 c	2,7 ± 1,2 a b	3,1 ± 0,1 a
<i>K.pneumoniae</i>	1,9 ± 0,1 b	3,5 ± 0,4 a	3,8 ± 0,8 a	3,9 ± 0,7 a	2,9 ± 0,8 a b
<i>E.aerogenes</i>	1,7 ± 0,3 a	2,2 ± 0,4 a	2,0 ± 0,6 a	3,4 ± 1,6 a	2,9 ± 1,0 a

*Média de três repetições.

As médias seguidas com a mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Os resultados indicam que as dispersões B e D, que possuem a mesma concentração de surfactante (1 x CMC), apresentaram diferença ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan na ação bactericida contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo a dispersão D, que contém AgNPs, mais eficiente em relação à dispersão B, que não a contém. Entretanto, a dispersão D apresentou o mesmo efeito bactericida da dispersão A contra *P. aeruginosa*. A dispersão coloidal E, que contém AgNPs de prata, foi mais eficiente em sua ação bactericida contra *P. aeruginosa* do que a dispersão C, que possui a mesma concentração de surfactante (2 x CMC).

Esse resultado é relevante, uma vez que *P. aeruginosa* é uma bactéria ubíqua, importante patógeno oportunista em humanos e é uma das principais causadoras de infecções hospitalares em pacientes com câncer, queimaduras, fibrose cística e em pacientes transplantados (RYAN et al., 2001).

E. coli também é um microrganismo ubíquo, sendo o mais frequente entre os microrganismos isolados no ambiente hospitalar (DIEKEMA et al., 1999), sendo também um dos principais microrganismos causadores de infecções urinárias, septicemias e meningites bacterianas em neonatais (KAHLMETER, 2003). Além disso, esse microrganismo pode ser veiculado por alimentos contaminados (PELCZAR et al., 1997).

O halo de inibição contra *E. coli*, utilizando-se as dispersões A, B e D, pode ser visualizado na Figura 15a-c, respectivamente.

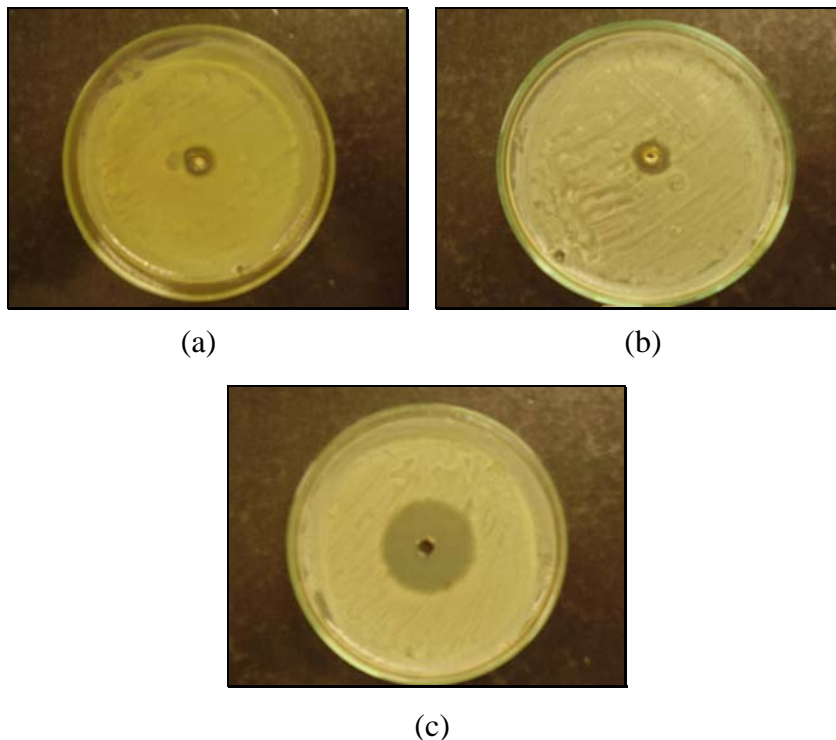


Figura15 – (a) Imagem do halo de inibição contra *E. coli* utilizando-se a dispersão A (SP 1% m/v), (b) empregando-se a dispersão B (DTAB 1 x CMC) e (c) usando-se a dispersão D (dispersão coloidal de AgNPs preparada com DTAB 1 x CMC e 1 % de SP m/v).

A dispersão coloidal E apresentou o mesmo efeito bactericida da dispersão coloidal D, ambas contendo AgNPs, para cinco das seis bactérias estudadas, à exceção de *S. epidermidis* em que a dispersão E apresentou maior efeito bactericida ($p < 0,05$) (Tabela 6). Entretanto, esse maior efeito antimicrobiano da dispersão E em relação à D deve ser atribuído à maior concentração de surfactante na dispersão E e não à presença das AgNPs. Isso porque a dispersão E, que contém AgNPs, não apresentou diferença no efeito antimicrobiano em relação à dispersão C, que possui a mesma concentração de surfactante (2 X CMC) e não contém AgNPs, sobre *S. epidermidis* (Tabela 6).

5. CONCLUSÃO

Dispersões coloidais contendo AgNPs foram obtidas neste experimento por um novo método de síntese. Este método demonstrou ser simples e rápido, sendo realizado em temperatura ambiente e facilmente reprodutível, utilizando-se apenas dois reagentes, além de não necessitar de equipamentos sofisticados. Entretanto, mais estudos precisam ser feitos para tentar elucidar as reações químicas envolvidas na síntese e para otimizar o processo, buscando o maior rendimento possível e maior estabilidade das partículas.

Existem várias possibilidades de aplicação das AgNPs nas mais diversas áreas do conhecimento. Na indústria de alimentos especificamente, existe a possibilidade de se aplicar em embalagens, utensílios, superfícies de equipamentos, membranas filtrantes para tratamento de água, filtros de ar, entre outros, devido seu efeito antimicrobiano. Porém, existem algumas divergências na literatura quanto à toxicidade das AgNPs, e isso pode limitar seu uso tanto na indústria de alimentos quanto em todas as outras áreas. Assim, mais estudos devem ser realizados para que as AgNPs possam ser empregadas com maior segurança e dar suporte científico para futuras regulamentações de uso.

6. REFERÊNCIAS

ABID, J. P.; WARK, A. W.; BREVET, P. F.; GIRAULT, H. H. **Chemical Communication**, v. 7, p. 792-3, 2002.

ALQUDAMI, A.; ANNAPOORNI, S. Fluorescence from metallic silver and iron nanoparticles prepared by exploding wire technique. **Pramana – Journal of Physics**, v. 65, p. 815-9, 2005.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412 p.

ATIYEH, B. S.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK, S. N.; DIBO, S. A. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. **Burns**, v. 33, p. 139-48, 2007.

BALAN, L.; MALVAL, J-P.; SCHNEIDER, R.; BURGET, D. Silver nanoparticles: new synthesis, characterization and photophysical properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 104, p. 417-21, 2007.

BORTOLETTO, C. C.; FERRARI, J. C. L.; MOTISUKI, C.; SPOLIDORIO, D. M. P.; SANTOS-PINTO, L. Atividade antimicrobiana de um novo biomaterial utilizado na remoção químico-mecânica da cárie. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 34, p. 199-201, 2005.

BRUNT, K. D. In: HILL, H. C. (Ed.). **Biocides for the oil industry**. New York: Wiley, 1987. p. 201.

CARDOSO, A. O. **Espalhamento de luz dinâmico aplicado no estudo de sistemas micelares**. Campinas, SP: QP 433, 2001. p.1-12.

- CHEN, C.-C.; CHAO, C.-Y.; LANG, Z.-H. Simple solution-phase synthesis of soluble CdS and CdSe nanorods. **Chemistry of Material**, v. 12, p.1516 -8, 2000.
- CHEN, S.; HUANG, K.; STEARNS, J. A. Alkanethiolate-protected palladium nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v.12, p. 540-7, 2000.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-29, 2002.
- CHU, B. **Laser light scattering**. 2nd ed. New York: Academic Press,1991.
- CHU, B.; LIU, T. Characterization of nanoparticles by scattering techniques. **Jornal of Nanoparticles Research**, v. 2, p. 29, 2000.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada-oitava edição, M2 - A8, v. 23, n. 1, 2003.
- COURROL, L. C.; SILVA, F. R. O.; GOMES, L. A simple method to synthesize silver nanoparticles by photo-reduction. *Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 305, p. 54-7, 2007.
- CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions II**, v. 75, p. 790-8, 1979.
- DAMM, C.; MUNSTEDT, H.; ROSCH, A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 6067-73, 2007.
- DENYER, S. P. Stewart GSAB. Mechanisms of action of disinfectants. **International biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 261-8, 1998.
- DHONT, J. K. G. **An introduction to dynamics of colloids**. [S.l.]: Elsevier, 1996.
- DIAS, R. S.; INNERLOHINGER, J.; GLATTER, O.; MIGUEL, M. G.; LINDMAN, B. Coil-globule transition of DNA molecules induced by cationic surfactants: a dynamic light scattering study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 10458-63, 2005.
- DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; WINOKUR, P. L.; GALES, A. C. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 595-607, 1999.

DUNN, K.; EDWARDS-JONES, V. The role of Acticoat™ with nanocrystalline silver in the management of burns. **Burns**, v. 30, p. S1-S9, 2004.

ELAISSARI, A. **Colloidal nanoparticles in biotechnology**. New Jersey: Wiley, 2008.

EVANOFF, D. D. J.; CHUMANOV, G. Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. **ChemPhysChem**, v. 6, p. 1221–1231, 2005.

FABREGA, J.; RENSHAW, J. C.; LEAD, J. R. **Silver nanoparticles in natural waters: behaviour and impact on bacterial Communities**, 2008. Disponible in: <<http://www.universitas21.com/GRC/GRC2008/ClimentProceedings.pdf>>. Access in: jn. 2010.

FARADAY, M. "Experimental relations of gold (and other metals) to light". **Philosophical Translation of the Royal Society, London**, v.147, p.145, 1857.

FAYAZ, A. M.; BALAJI, K.; GIRILAL, M.; YADAV, R.; KALAICHELVAN, P. T.; VENKETESAN, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, 2009. DOI: 10.1016/j.nano.2009.04.006.

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. M.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect on silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, p. 662-8, 2000.

FILANKEMBO, A.; PILENI, M. P. Is the template of self-colloidal assemblies the only factor that controls nanocrystal shapes? **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 25, p. 5865-8, 2000.

GOGOI, S. K.; GOPINATH, P.; PAUL, A.; RAMESH, A.; GHOSH, S. S.; CHATTOPADHYAY, A. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 22, p. 9322-8, 2006.

GRAY, J. E.; NORTON, P. R.; ALNOUNO, R.; MAROLDA, C. L.; VALVANO, M. A.; GRIFFITHS, K. Biological efficacy of electroless-deposited silver on plasma activated polyurethane. **Biomaterials**, v. 24, p. 2759-65, 2003.

GUGGENBICHLER, J. P.; BOSWALD, M.; LUGAUER, S.; KRALL, T. A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. **Infection**, v. 27, p.16-23, 1999.

GUZMÁN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 43, p. 357-64, 2008.

HARADA, M.; SAIJO, K.; SAKAMOTO, N. Characterization of metal nanoparticles prepared by photoreduction in aqueous solutions of various surfactants using UV-vis, EXAFS and SAXS. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v. 349 p.176-88, 2009.

HOFFMANN, F.; CINATL, J. R.; J.; KABICKOVÁ, H.; CINATL, J.; KREUTER, J.; STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, p.189-98, 1997.

HOLMBERG, K. Surfactant-templated nanomaterials synthesis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 274, p. 355-64, 2004.

JAIN, J.; ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; OMRAY, P.; KHANDELWAL, S.; PAKNIKAR, K. M. Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1388-401, 2009.

JIANG, Z. YUAN, W. PAN, H. Luminescence effect of silver nanoparticles in water phase. *Spectrochimica Acta Part A*. **Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, p. 2488-94, 2005.

JING, A.; DE-SONG, W.; XIAO-YAN, Y. Synthesis of stable silver nanoparticles with antimicrobial activities in room-temperature ionic liquids. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 25, p. 421-5, 2009.

JOERGER, T. K.; JOERGER, R.; OLSSON, E.; GRANQVIST, C. Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. **Trends Biotechnology**, v. 19, p.15-20, 2001.

JONES, M. V.; HERD, T. M.; CHRISTIE, H. J. Resistance of *P. aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. **Microbios**, v. 58, p. 49-61, 1989.

KAHLMETER, G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 69-76, 2003.

KAMEO, A.; SUZUKI, A.; TORIGOE, K.; ESUMI, K. Fiber-like gold particles prepared in cationic micelles by UV irradiation: effect of alkyl chain length of cationic surfactant on particle size. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 241, p. 289-92, 2001.

KIM, J. Y.; LEE, C.; CHO, M.; YOON, J. Enhanced inactivation of *E. coli* and MS-2 phage by silver ions combined with UV-A and visible light irradiation. **Water Research**, v. 42, p. 356-62, 2008.

KITAJIMA, E. W. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de transmissão**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1998.

KLOEPFER, J. A.; MIELKE, R. E.; NADEAU, J. L. Uptake of CdSe and CdSe/ZnS quantum dots into bacteria via purine-dependent mechanisms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2548-57, 2005.

KOTOV, N. A.; ZANIQUELLI, M. E. D.; MELDRUM, F. C.; FENDLER, J. H. Two-dimensional silver electrocrystallization under monolayers spread on aqueous silver nitrate. **Langmuir**, v. 9, p. 3710-6, 1993.

KVIÍTEK, L.; PANACEK, A.; SOUKUPOVA, J.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PRUCEK, R.; HOLECOVÁ, M.; ZBORIL, R. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silvernanoparticles (NPs). **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, p. 5825-34, 2008.

KYRIACOU, S. V.; BROWNLOWW, J.; XU, X-H. N. Using nanoparticle optics assay for direct observation of the function of antimicrobial agents in single live bacterial cells. **Biochemistry**, v. 43, p. 140-7, 2004.

LA MER, V. K. Nucleation in phase transitions. **Industrial and engineering chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1270-9, 1952.

LANSDOWN, A. B. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Current Problems in Dermatology**, v. 33, p. 17-34, 2006.

LANSDOWN, A. B. Silver 1: its antibacterial properties and mechanism of action. **Journal of Wound Care**, v. 11, p. 125-30, 2002.

LARA, H. H.; AYALA-NÚÑEZ, N. V.; TURRENT, L. C. I.; PADILLA, C. R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 615-21, 2010.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, p. 3391-5, 1982.

LEITE, M. S. **Diferenças estruturais em nanopartículas de Ag e Au coloidais**. 2003. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D. Y.; BRUNET, L.; LIGA, M. V.; LI, D.; ALVAREZ, P. J. J. Antimicrobial nanomaterials for wate disinfection and

microbial control: potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, p. 4591-602, 2008.

LIMBACH, L. K.; WICK, P.; MANSER, P.; GRASS, R. N.; BRUININK, A.; STARK, W. J. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 4158-63, 2007.

LUTEY, R. W. Process cooling water. In: ROSSMOORE, H. W. **Hand book of biocides and preservative**. London: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 50-82.

MAFUNÉ, F.; KOHNO, J.-Y.; TAKEDA, Y.; KONDOW, T.; SAWABE, H. Structure and Stability of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution Produced by Laser Ablation **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 8333-7, 2000.

MALYNYCH, S. Z.; CHUMANOV, G. Vacuum deposition of silver island films on chemically modified surfaces. **The Journal of Vacuum Science Technology A**, v. 21, p. 723-7, 2003.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MASSI, L.; GUITTARD, F.; GÉRIBALDI, S.; LEVY, R.; DUCCINI, Y. Antimicrobial properties of highly fluorinated bis-ammonium salts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21 p. 20-6, 2003.

MASTSUMURE, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S. I.; TSUCHIDO, T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 169, p. 4278-81, 2003.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 147-79, 1999.

MEEK, G. A. **Practical electron microscopy for biologists**. 2. ed. London, NY; Sydney; Toronto: Jon Wiley et Sons, 1976. p. 528.

MERIANOS, J. J. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization, and preservation**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 225-55.

MIRSATTARI, S. M.; HAMMOND, R. R.; SHARPE, M. D.; LEUNG, F.; YOUNG, G. B. Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver. **Neurology**, v. 62, p. 1408 -10, 2004.

MODAK, S. M.; FOX, C. L. Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical pharmacology**, London, v. 22, p. 2391-8, 1973.

MOGHADDAM, K. M. An Introduction to microbial metal nanoparticle preparation method. **The Journal of Young Investigators**, v. 19, 2010.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346-53, 2005.

MURGUÍA, M. C.; CRISTALDI, M. D.; PORTO, A.; CONZA, J.; GRAU, R. J. Synthesis, surface-active properties, and antimicrobial activities of new neutral and cationic trimeric surfactants. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 1, p. 41-8, 2008.

MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. **Annual Review of Materials Science**, v. 30, p. 545-610, 2000.

NILIUS, N.; ERNST, N.; FREUND, H. J. Photon emission spectroscopy of individual oxide-supported silver clusters in a scanning tunneling microscope, **Physical Review Letter**, v. 84 p. 3994-7, 2000.

OKKYOUNG, C.; KATHY, K. D.; NAM-JUNG, K.; LOUIS, ROSS JR. D.; RAO, Y.; SURAMPALLIE, ZHIQIANG, H. U. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. **Water Research**, v. 42, p. 3066-74, 2008.

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**, v. 73, p. 1712-20, 2007.

PASTORIZA-SANTOS, I.; LIZ-MARZÁN, L. M. Formation of PVP-protected metal nanoparticles in DMF. **Langmuir**, v. 18, p. 2888-94, 2002.

PECORA, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, p. 123-31, 2000.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2nd. ed. São Paulo: MAKRON Books do Brasil, 1997. v. 1.

PELIZZETTI, E.; PRAMAURO, E. Analytical applications of organized molecular assemblies. **Analytical Chimica Acta**, v. 169, p. 1-29, 1985.

PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. "Bacterial resistance to silver in wound care". **Journal of Hospital Infection**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2005.

PILENI, M-P. The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals. **Nature Materials**, v. 2, p. 145, 2003.

PILENI, M-P. Reverse micelles as microreactors. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, p. 6961- 73, 1993.

PRIJCK, K.; NELIS, H.; COENYE, T. Efficacy of silver-releasing rubber for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in water. **Biofouling**, v. 23, p. 405-11, 2007.

PRZESTALSKI, S.; SARAPUK, J.; KLESZCZNSKA, H.; HABRIELSKA, J.; TRELA, Z.; KUCZERA. Influence of amphiphilic compounds on membranes. **Acta Biochemica Polonica**, v. 47, p. 627, 2000.

RATTE, H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 18, p. 89-108, 1999.

RIBOLDI, B. M. **Nanotecnologia**: fundamentos e aplicações. Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Campus de Rio Claro (UNESP), 2009. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/showdefisica/ensino/Nanotecnologia.pdf>>. Acesso em: jan. 2010.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-49, 1988.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 518-21, 2009.

ROCHA, T. C. R. **Nanopartículas metálicas anisotrópicas**: mecanismo de formação e propriedades ópticas. 2008. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

RYAN, B. M.; DOUGHERTY, T. J.; BEAULIEU, D.; CHUANG, J.; DOUGHERTY, B. A.; BARRETT, J. F. Efflux in bacteria: what do we really know about it?. **Drugs**, v. 10, p. 1409 -22, 2001.

SABATINI, C. A. **Modulação de fluorescência de aminocoumarinas e acridinas por nanopartículas de prata**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências, Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2007.

SAMBHY, V.; MACBRIDE, M. M.; PETERSON, B. R.; SEN, A. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: Dual action tunable antimicrobial materials. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128 p. 9798-808, 2006.

SAMPAIO, J. L.; MORENO, M. J.; VAZ, W. L. C. Kinetics and thermodynamics of association of a fluorescent lysophospholipid derivative with lipid bilayers in liquid-ordered and Liquid-Disordered phases. **Biophysical Journal**, v. 88, p. 4064-71, 2005.

SCHIERHOLZ, J. M.; LUCAS, L. J.; RUMP, A.; PULVEREZ, G. Efficacy of silver-coated medical device. **Journal of Hospital Infection**, v. 40, p. 257-62, 1998.

SCOTT, R. W. J.; YE, H.; HENRIQUEZ, R. R.; CROOKS, R. M. Synthesis, characterization, and stability of dendrimer-encapsulated palladium nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 15, p. 3873 -8, 2003.

SHRIVASTAVA, S.; BERA, T; ROY, A.; SINGH, G.; RAMACHANDRARAO, P.; DASH, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, p. 1-9, 2007.

ŠILEIKAITĖ, A.; PROSYČEVAS, I.; PUIŠO, J.; JURAITIS, A.; GUOBIENĖ, A. Analysis of silver nanoparticles produced by chemical reduction of silver salt solution. **Materials Science (Medžiagotyra)**, v. 12, n. 4, 2006.

SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis, RJ: Ed. Eventos, 1999.

SILVER, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of bacterial compounds. **FEMS Microbiology reviews**, v. 27, p. 341-52, 2003.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **The Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 177-82, 2004.

SONG, X. C.; ZHAO, Y.; ZHENG, Y. F.; YANG, E.; FU, J.; HE, Y. Fabrication of Ag/C coaxial nanocables with cross-linked structure by SDS-Assisted hydrothermal approach. **Crystals Growth**, v. 8, p. 1823, 2008.

SOSA, Y. D.; RABELERO, M.; TREVINO, M. E.; SAADE, H.; LÓPEZ, R. G. High-yield synthesis of silver nanoparticles by precipitation in a high-aqueous phase content reverse microemulsion. **Journal of Nanomaterials**, 2010.

STOIMENOV, P. K.; KLINGER, R. L.; MARCHIN, G. L.; KLABUNDE, K. J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents, **Langmuir**, v. 18, p. 6679-86, 2002.

SUI, Z. M. ; CHEN, X. ; WANG, L. Y.; XU, L. M.; ZHUANG, W. C.; CHAI, Y. C.; YANG, C. J. Capping effect of CTAB on positively charged Ag nanoparticles. **Physica E**, v. 33, p. 308-14, 2006.

SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 235-9, 1998.

TALEBI, J.; HALLADJ, R.; ASKARI, S. Sonochemical synthesis of silver nanoparticles in Y-zeolite Substrate. **Journal of Materials Science**, v. 45, p. 3318-24, 2010.

TAN, Z.; ABE, H.; NAITO, M.; OHARA, S. Oriented growth behavior of Ag nanoparticles using SDS as a shape director. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 348, p. 289-92, 2010.

TIZEI, L. H. G. **Análise quantitativa de imagens de microscopia eletrônica de transmissão de resolução atômica**: aplicação ao estudo da rugosidade e interdifusão em interfaces de poços quânticos de InGaP/GaAs. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, SP, Campinas, SP, 2008.

TOIT, E. A.; RAUTENBACH, M. A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, p. 159-65, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002

TOSHIMA, N.; TAKAHASHI, T. Colloidal dispersions of platinum and palladium clusters embedded in the micelles. Preparation and application to the catalysis for hydrogenation of olefins. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 65 p. 400-9, 1992.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. **Discussion Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity**. Londres: Academic Press, 1991. p. 47-69.

VIEIRA, O. V.; HARTMANN, D. O.; CARDOSO, C. M. P.; OBERDOERFER, D.; BAPTISTA, M.; SANTOS, M. A. S.; ALMEIDA, L.; RAMALHO-SANTOS, J.; VAZ, W. L. C. Surfactants as microbicides and contraceptive agents: a systematic *In vitro* study. **Surfactants in STD Prevention**, v. 3, p. 1-12, 2008.

WANG, T. C.; RUBNER, M. F.; COHEN, R. E. **Langmuir**, v. 18, p. 3370-5, 2002.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission electron microscopy: a text book for material science**. New York: Plenum Press, 1994.

WRIGHT, J. B.; LAM, K.; BURRELL, R. E. Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment. **AJIC: American Journal of Infection Control**, v. 26, p. 572-7, 1994.

YANG, J.; LEE, J. Y.; DEIVARAJ, T. C.; TOO, H. P. A highly efficient phase transfer method for preparing alkylamine-stabilized Ru, Pt, and Au nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 277, p. 95-9, 2004.

YANG, J.; ZHANG, Q.; LEE, J.Y.; TOO, H.-P. Felbamate but not phenytoin or gabapentin reduces glutamate release by blocking presynaptic NMDA receptors in the entorhinal cortex. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 308, p.157, 2007.

XIA, Y. N.; HALAS, N. J. "Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures". **MRS Bull.**, v. 30, p. 338, 2005.

ZANCHET, D. **Nanopartículas de ouro passivadas com tióis: caracterização estrutural e formação de supercristais auto-organizados**. 1999. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1999.

ZHAO, Y. Y.; FROST, R. L.; MARTENS, W. N. "Synthesis and characterization of gallium oxide nanostructures via a soft-chemistry route". **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 162-90, 2007.