



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL



CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS

CASSIO ERACLITO ALVES DOS SANTOS

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E SUAS
APLICAÇÕES EM BIOLOGIA**

Maceió
2015

CÁSSIO ERÁCLITO ALVES DOS SANTOS

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E SUAS
APLICAÇÕES EM BIOLOGIA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Materiais.

Orientador: Dr. Jandir Miguel Hickmann

Co-Orientador: Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

Maceió
2015

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Helena Mendes Lessa

S237s Santos, Cássio Eráclito Alves dos.
Síntese e caracterização de nanopartículas metálicas e suas aplicações em biologia / Cássio Eráclito Alves dos Santos. – Maceió, 2015.
79 f. : il.

Orientador: Jandir Miguel Hickmann.
Coorientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Tese (Doutorado em Materiais) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Materiais. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 73-79.

1. Nanopartículas – Síntese. 2. Ouro. 3. Prata. 4. Copafba.
5. Biossensor. I. Título.

CDU: 53.047



Cássio Eráclito Alves dos Santos

SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS METALICAS E SUAS APLICAÇÕES EM BIOLOGIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 27 de Março de 2015.

(Prof. Dr. Jandir Miguel Hickmann, PPGMateriais/UFAL) (Orientador)

BANCA EXAMINADORA

(Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto, UFAL) (Coorientador) (Examinador Interno)

(Prof. Dr. Antonio Osimar Sousa da Silva, PPGMateriais/UFAL) (Examinador Interno)

(Prof^a. Dr^a. Fabiane Cavaco de Abreu, PPGMateriais/UFAL) (Examinador Interno)

(Prof. Dr. Sérgio Ribeiro Teixeira, UFRGS) (Examinador Externo)

(Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza, UFAL) (Examinador Externo)

In memoriam

Maura Pedrosa dos Santos

AGRADECIMENTOS

Quero aqui expressar os meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram durante este trabalho:

- *Aos Professores e amigos Dr. Jandir M. Hickmann (Orientador) e Dr. Emiliano Barreto (Co-Orientador) primeiramente pela amizade e confiança e seus valiosos ensinamentos durante todo esse processo, sem dúvida o que vocês me ensinaram mudou minha vida.*
- *A Universidade Federal de Alagoas pela criação inovadora do Programa de Pós-graduação em Materiais com abordagem multidisciplinar permeado os institutos de Física, Química, ciências Biológicas e da Saúde e centro tecnológico ao qual tive o prazer e satisfação em participar.*
- *Agradeço aos Professores do Grupo de Optica e Materiais, Prof. Dilson, Prof. Eduardo e Prof. Márcio pelo apoio e incentivo ao estudo e a pesquisa.*
- *Aos colegas de turma que sempre me auxiliaram a superar as dificuldades das disciplinas do programa de Pós Graduação em Materiais (PPGM).*
- *Aos meus amigos e irmãos Rafael Vidal, Paulo Sergio Carvalho, Laís Agra, Fabíola Brito, Jamylle Ferro, Anderson Albuquerque, Isabela Fraga, João Paulo Noé e se esqueci o nome de alguém me perdoe por favor,*
- *Aos amigos do Optma, que estão ou passaram por lá: Rogério, Itamar, Amadeu, Samuel, Geovana, Cássia, Ana Rúbia, Alcenísio, Hemerson Pablo, Marlon, Vanessa, Ítalo e em especial a Patrícia.*
- *Ao meu amigo Robert pelas discussões em inglês, obrigado Robert me ajudou muito.*
- *A todos os professores do Programa, em especial a Marcio Alencar, Eduardo Fonseca, Severino Marques, Osimar Silva, Solange Cavalcanti pela minha formação intelectual.*
- *Ao apoio das instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.*
- *E em especial a minha esposa Lidiane pelo carinho, compreensão e paciência durante essa longa jornada que começou no mestrado, obrigado Lidiane*

"Não me sinto obrigado a acreditar que o mesmo Deus que nos dotou de sentidos, razão e intelecto, pretenda que não os utilizemos."

(Galileu Galilei).

RESUMO

As nanopartícula de ouro (NPAu) e de prata (NPAg) exibem uma variedade de efeitos e aplicações na área biomédica. No presente estudo, nanopartículas de prata e ouro foram sintetizadas e caracterizadas com objetivo avaliar seu efeito sobre a cicatrização de feridas e sensoriamento de eotaxina, um analito de grande relevância para eventos inflamatórios. Em um primeiro caso, NPAg foram sintetizadas por método químico de redução, e dispersas em óleo de copaiba. Observou-se que todas NPAg tinham formas esféricas e se dispersaram no óleo de copaiba. Essa composição NPAg mais óleo de copaiba mostrou-se mais eficaz para cicatrizar feridas cutâneas do que a Dermazine, um medicamento de referência. Com as nanopartículas de ouro (NPAu) foram sintetizadas por método químico de redução por citrato. Em seguida, estas nanoestruturas foram funcionalizadas para confecção de um biossensor, com finalidade de identificar o analito de escolha (eotaxina) por meio da identificação do deslocamento da banda de ressonância de plasmon de superfície. Os resultados com este protótipo do biossensor se mostraram de grande potencial para detecção da eotaxin em pequenas quantidades 15 μ L. As partículas utilizadas neste estudo foram caracterizadas por espectroscopia de UV-vis e microscopia eletrônica de transmissão, enquanto que aquelas associadas ao quartzo são caracterizadas com espectroscopia UV-vis e microscopia de força atômica. Em conjunto, este estudo revelou o potencial instalado na UFAL para síntese, caracterização e aplicação na área biomédica de nanopartículas metálicas.

Palavras-chave: Nanopartículas-Síntese. Ouro. Prata. Óleo de Copaíba. Biossensor.

ABSTRACT

The gold nanoparticles (NPAus) and silver (NPAGs) exhibit a variety of effects and applications in the biomedical field. In this study, silver and gold nanoparticles were synthesized and characterized in order to evaluate its effect on wound healing and sensing eotaxin, an analyte of great relevance to inflammatory events. . In a first case, NPAGs were synthesized by chemical reduction method and dispersed in copaiba oil. It was observed that all NPAGs had spherical shapes and dispersed in copaiba oil. This composition NPAGs more copaiba oil was more effective to heal skin wounds than Dermazine, a reference medicinal product. With gold nanoparticles (NPAu) were synthesized by chemical methods by citrate reduction. Then, these nanostructures are functionalized for making a biosensor, with the purpose of identifying the analyte of choice (eotaxin) by identifying the displacement of the surface plasmon resonance band. The results with this prototype of the great potential of biosensor proved to detection of eotaxin in small quantities 15 μ L. The particles used in this study were characterized by UV-vis spectroscopy and transmission electron microscopy, while those associated with quartz are characterized with UV-vis spectroscopy and atomic force microscopy. Together, this study revealed the potential installed in UFAL for synthesis, characterization and application in the biomedical field of metal nanoparticles.

Key Words: Nanopartilces-Synthesis. Gold. Silver. Copaíba Oil, Biosensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vasos contendo vidro rubi, feita no século 19. Vidro rubi foi fabricado durante séculos, embora tenha sido apenas recentemente descoberto que o pigmento vermelho usado contém nanopartículas de ouro. -----	21
Figura 2 - Detalhe de uma janela na Catedral de Altenberg. O vidro colorido manchado de vermelho é composto por pequenas partículas de ouro coloidal que residem em uma matriz de vidro. -----	22
Figura 3 - O Copo de Lycurgus. Esquerda imagem vista em luz refletida; direita imagem vista da luz transmitida. -----	22
Figura 4 - Microscopia eletrônica de transmissão de diferentes nanopartículas de Au: nanoesferas (A), nanocubos (B), nanoramos (C), nanobastões (D), nanobastões (E), nanobastões (F), nanobipirâmides (G). -----	23
Figura 5 - Comportamento da energia livre total ΔG como função do tamanho de crescimento r da partícula. -----	27
Figura 6 - Crescimento coloidal monodisperso do modelo de La Mer (Figura A) e aparato típico de síntese de Nanopartículas via rota líquida (Figura B). -----	29
Figura 7. Resumo desenhado para realçar várias aplicações de NP Au com diferentes tipos de conjugados de macromoléculas, como DNA, RNA, peptídeos e ácidos carboxílicos. -----	34
Figura 8 - Quimissorção de cadeias de ácidos mercaptocarboxílico na superfície de em uma nanopartícula de ouro. -----	35
Figura 9 - Sistemas integrados de biomateriais e elementos eletrônicos para aplicações em biossensores. -----	38
Figura 10 - Usos de nanopartículas de prata NPs de prata (lado esquerdo) e prata (lado direito) em medicina. -----	40
Figura 11 - Representação esquemática de um biossensor usando nanopartículas de ouro, depositados sobre um substrato de quartzo. Da esquerda para a direita: fonte de luz, substrato de quartzo; camada de adesão mercaptosilano; nanopartículas de ouro; monocamada de thiol, anticorpos e antígenos. O resultante aumento de espectros de absorbância após a ligação do analito mais anticorpo com as NP Au é mostrado do lado direito da figura. -----	48
Figura 12 - Solução de Nanopartículas de Ouro figura A, Substrato com monocamada de NP Au com thiol 6 MHA figura B. -----	52

Figura 13 - Gráficos de Absorção das NPAGs em água, mostra ressonância de plasmão da prata em torno de 420nm. -----	55
Figura 14 - Imagens de HRTEM de NPAGs dispersas em óleo de copaíba. -----	56
Figura 15 - Imagens de HRTEM de NPAGs dispersas em óleo de copaíba. -----	56
Figura 16 - Distribuição de tamanho da NPAGs realizado pela contagem do diâmetro de 100 partículas selecionadas aleatoriamente. -----	57
Figura 17 - Análise histológica no 10º dia de experimento da remodelação da epiderme/derme dos animais tratados com veículo (salina); com óleo de copaíba, controle negativo; com a associação entre óleo de copaíba e nanopartículas de prata (NPAGCO); e com o fármaco de referência, Dermazine. Secções de pele coradas com hematoxilina e eosina. Aumento de 10x. -----	59
Figura 18 - Análise histopatológica no 10º dia de experimento da deposição de colágeno nos animais tratados com veículo (salina); com óleo de copaíba; com a associação entre óleo de copaíba e nanopartículas de prata (NPAG+OC); e com o fármaco de referência, Dermazine. Secções de pele coradas com tricrômio de Masson, com propriedade de corar em azul as fibras colágenas. Aumento de 20x. -----	60
Figura 19 - Distribuição de tamanho da NPAu realizado pela contagem do diâmetro de 350 partículas (Figura B) e imagens de HRTEM de NPAus dispersas em água (Figuras A e C) -	62
Figura 20 - Gráficos de Absorção das NPAus em água, mostra ressonância de plasmon do ouro (Figura A) e solução de NPAus utilizada para realizar filmes de monocamadas (Figura B).-----	63
Figura 21 - Monocamada de ouro nanoparticulado sobre uma lâmina de vidro (Figura A e B) e o gráfico apresentando a ressonância de plasmão do ouro em solução e sobre a lâmina de vidro (Figura C). -----	63
Figura 22 - Imagens de Microscopia de Força Atômica mostrando a distribuição (Figura A e B) e o tamanho (Figura C) do “cluster” de ouro sobre o substrato de vidro.-----	65
Figura 23 - Imagens de Microscopia de Força Atômica mostrando a distribuição em monocamadas (Figura A e C), a altura (Figura B) e o tamanho (Figura D) dos “clusters” de ouro sobre o substrato. -----	66
Figura 24 - Espectro de absorção das NPAus na revestida com anti-eotaxina a anti-eotaxina conjugada com o antígeno (eotaxin).-----	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns exemplos de aplicações de nanopartículas usadas em Nanobiotecnologia.	19
Tabela 2 - Exemplos de empresas que comercializam os nanomateriais para aplicações biológicas e médicas.-----	20
Tabela 3 - Principais métodos químicos e físicos para síntese de nanopartículas. -----	26
Tabela 4 - Efeito do tratamento com colóide no modelo de ferida infectada. -----	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica
Ag	Prata
Au	Ouro
AgNO ₃	Nitrato de prata
CCD	Dispositivos de carga acoplada
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	Citrato de Sódio
CH ₄ O	Metanol
CTENE	Centro de Tecnologia do Nordeste
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDS	Energia dispersiva de espectroscopia de raios-X
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GOD	Glicose oxidase
kV	Kilovolt
HRTEM.	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução
HauCl ₄ .3H ₂ O	Ácido cloroáutico
HCl	Ácido clorídrico
HNO ₃	Ácido nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
nm	Nanomêtro
NPs	Nanopartículas
NPAus	Nanopartículas de ouro
NPAgs	Nanopartículas de prata
NaCl	Cloreto de Sódio (Solução Salina)
NaBH ₄	Boroidreto de sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
OC	Óleo de copaíba
OC-NanoAg	Óleo de copaíba associado a nanopartículas de prata
PID	Realimentação eletrônica
SPR	Ressonância de plasma de superfície
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
UV-Vis	Ultra Violeta e Visível
UV-Vis-NIR	Ultra violeta visível infravermelho próximo
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
6 MHA	Ácido 6-Mercaptohexanoic

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	NANOTECNOLOGIA: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES	18
2.1	NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	21
2.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA METÁLICA	25
2.2.1	Métodos de Síntese de Nanopartículas Metálica	25
2.2.2	Nucleação	27
2.2.3	Crescimento das Nanopartículas	29
2.3	Métodos de caracterização das nanopartículas	31
2.3.1	Espectrofotometria óptica UV-visível.	31
2.3.2	Microscopia eletrônica de transmissão	31
2.3.3	Microscopia de força atômica	32
2.4	Aplicações das nanopartículas	33
2.4.1	Sensoreamento	36
2.4.2	Terapêutica	38
3	OBJETIVO	41
3.1	Objetivo geral	41
3.1.1	Objetivos específicos	41
4	PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO	42
5	METODOLOGIA	45
5.1	Síntese de NPAs	45
5.2	Modelo de ferida excisional e tratamento	46
5.3	Síntese de NPAs	47
5.3.1	Modelo do biossensor utilizando NPAs	47
5.3.2	Alvo do biossensor	48
5.3.3	Preparação dos substratos de quartzo	51
5.4	Medidas de espectrofotometria óptica UV-Vis	52
5.5	Medidas de microscopia eletrônica de transmissão	53
5.6	Medidas de microscopia força atômica	54
6	RESULTADOS	55
6.1	Efeitos sobre a cicatrização de feridas infectadas	57

6.2	Efeitos sobre Biossensores -----	62
7	DISCUSSÃO -----	68
8	CONCLUSÕES -----	72
	REFERÊNCIAS -----	74

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia ampliou o uso de novos materiais em diferentes setores da sociedade. Atualmente, é possível encontrar produtos produzidos a partir do conhecimento nanotecnológico em vários setores da sociedade, tais como, eletrônicos, artigos esportivos, pneus, roupas resistentes a manchas, cosméticos e medicamentos para diagnóstico, imagem e entrega de fármacos (BORN, et al., 2006; DOWLING, et al., 2004)

A principal característica diferenciadora dos nanomateriais é seu tamanho, que se encontra na dimensão dos átomos (HOET; SALATA, 2004). Sabe-se que, para um grupo de nanopartículas em suspensão com massa fixa (10 mg/m^3) e densidade unitária (1 g/cm^3), diminui o tamanho para menos de 100 nm, o número de partículas aumenta exponencialmente, juntamente com a área da superfície (WEI YANGA; PETERSB; WILLIAMS, 2008). Logo, o domínio sobre a síntese e modificação de materiais nesta escala de tamanho é que impulsionou a nanotecnologia.

O prefixo “nano” deriva da palavra grega “anão”, a dimensão de um nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo de um metro, ou aproximadamente a largura de 6 átomos de carbono ou 10 átomos de água moléculas. Para exemplificar a dimensão desta ordem de grandeza, um cabelo humano tem aproximadamente 80.000 nm de largura, um glóbulo vermelho possui aproximadamente 7.000 nm de largura, enquanto as proteínas podem variar entre 1 - 20 nm (GM, 2003).

A crescente necessidade da área de biotecnologia compreender fenômenos abaixo da escala molecular impulsionou o desenvolvimento de dispositivos e novos materiais capazes manipular fenômenos em escala nanométrica, daí o termo nanobiotecnologia. Pesquisas nesta área vêm possibilitando grandes avanços no campo do diagnóstico e desenvolvimento de fármacos. Por exemplo, o desenvolvimento/uso de semicondutores pontos quânticos como biomarcadores em investigação em biologia celular classificaria como ações da área de nanobiotecnologia.

Inicialmente, os primeiros conceitos sobre a nanotecnologia foram apresentados em 1959 pelo físico Richard Feynman em sua palestra, com tema “*There’s plenty of room at the*

bottom”. Feynman explorou a possibilidade de manipular materiais na escala dos átomos e moléculas individuais, imaginando o conjunto da Enciclopédia Britânica escrita na cabeça de um alfinete prevendo a crescente capacidade de analisar e controlar materiais em nanoescala (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Após os relatos de Feynman, este novo conhecimento passou a ser discutido pela comunidade científica sem a definição de uma terminologia. Somente em 1974, Norio Taniguchi, pesquisador da Universidade de Tóquio usou o termo “nanotecnologia” para se referir à capacidade da engenharia de materiais precisamente a nível nanométrico. Desde então, o termo nanotecnologia passou a ser usado. Em seguida, a miniaturização passou a ser perseguida pela indústria de eletrônica, que teve como objetivo desenvolver ferramentas para criar e manipular essas nanoestruturas. Um marco para a indústria foi conquistado pela IBM nos Estados Unidos, que usou a técnica chamada de litografia por feixe de elétrons para criar nanoestruturas e dispositivos tão pequenos quanto 40 e 70 nm (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Portanto, considerando a grande relevância do tema, bem como os aspectos de aplicação do conhecimento em nanotecnologia, este trabalho objetivou a apresentar aspectos sobre síntese e caracterização de nanopartículas de prata e ouro para aplicações em biologia.

2 NANOTECNOLOGIA: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar que possibilita a interação entre a física, ciência dos materiais, biologia, engenharias e química (SCIENCEDAILY, 2013). Atualmente, as pesquisas na área de nanotecnologia mostra-se promissora devido à ampla gama de aplicações, especialmente em biomédica, óptica e eletrônica.

Como resultados das intensas pesquisas na área da nanotecnologia, podemos observar uma série de aplicações para as nanopartículas nos mais diferentes campos¹. No que confere a aplicação de nanopartículas em biologia, o tamanho e sua distribuição tornam-se extremamente crítica quando os efeitos quânticos são utilizados para controlar as propriedades do material. Para ilustrar, na área biológica destaca-se a aplicação das nanopartículas metálicas de prata como agente bactericida. Esta ação somente torna-se possível devido à ação da prata em comprometer a respiração bacteriana, e conseqüentemente, seu crescimento. O conhecimento sobre a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata impulsionou o desenvolvimento de diversos produtos encontrados no comércio em geral. Como exemplo pode ser destacado a presença de nanopartículas de prata em refrigeradores, celulares, roupas, e outros produtos. Na tabela 1 encontra-se resumido as principais aplicações de nanopartículas aplicadas em nanobiotecnologia (PICHOT, 2008).

¹ Aplicação de nanopartículas em células solares, nanoestruturas para entrega controlada de fármacos, biosensores, nanoporos em cerâmicas para tratamento de água, etc.

Tabela 1 - Alguns exemplos de aplicações de nanopartículas usadas em Nanobiotecnologia.

Nanopartículas	Tamanho	Exemplos de Aplicações
<i>Inorgânicas</i>		
Ouro	10–30 nm	Detecção colorimétrica para sequências de DNA
Platina, paládio, rutênio	2–10 nm	Chip para detecção de DNA
Metais óxidos (ferrofluidos e supermagnéticas)	5–10 nm	Imagem médica
Sílica	nanométrico	Sensores biológicos
Cristais semicondutores (Quantum Dots)	2–10 nm	Detecção e quantificação
<i>Partículas Orgânicas</i>		
Carbono e fulereno	nanométrico	Marcadores de DNA
Dendrimeros	10–50 nm	Entrega de fármacos
Polieletrólito complexo	50–200 nm	Entrega de fármacos e vacinação
Copolímeros em óxidos	50–200 nm	Entrega de fármacos
Latexes	20–1000 nm	Ensaio em fase sólida, matrizes bidimensionais
<i>Partículas mistas (orgânicas/inorgânicas)</i>		
Magnéticas	100–1000 nm	Diagnóstico, extração de DNA, células, vírus.
Fluorescentes	30–500 nm	Bioensaios de fluorescência
Sílicas	50–200 nm	Aplicações bioanalíticas
Nanocompósitos polímero-metal (ouro e polipirrol)	10–30 nm	Bioensaios

Fonte: (PICHOT, 2008)

Entender o comportamento das nanopartículas constitui um desafio para a ciência fundamental, interligado ao seu enorme potencial de aplicação. Porém, mesmo assim, considerando o impacto na área biomédica, o uso da nanotecnologia mostra-se potencialmente necessário, em especial no que diz respeito aos agentes para a distribuição de drogas e marcadores celulares. Algumas destas tecnologias encontram-se listados na tabela 2 (SALATA, 2004).

Tabela 2 - Exemplos de empresas que comercializam os nanomateriais para aplicações biológicas e médicas.

Empresa	Maior área de atividade	Tecnologia
Advectus Life Sciences Inc.	Entrega de fármacos	Nanopartículas poliméricas para entrega de fármacos.
Alnis Biosciences, Inc.	Bio-fármacos	Nanopartículas poliméricas para entrega de fármacos.
BASF	Creme dental	Nanopartículas de hidroxiapatita para melhorar superfície dental.
Biophan Technologies, Inc.	MRI shielding	Materiais compósitos nanomagnético/carbono para proteger dispositivos médicos de campos de rádio frequência.
Capsulation NanoScience AG	Revestimentos farmacêuticos para melhorar a solubilidade de fármacos	Revestimentos de poli-eletrólitos (8-50 nm).
Eiffel Technologies	Entrega de Fármacos	Redução no tamanho dos carreadores (100 até 50 nm).
Evident Technologies	Biomarcadores luminescentes	Pontos quânticos com grupos amina ou carboxila na superfície, emissão entre 350-2500 nm.
Immunicon	Separação de diferentes tipos de células	Núcleo magnético rodeado por uma camada polimérica revestido com anticorpos para a captura de células
KES Science and Technology, Inc.	Filtro AiroCide	Nano-TiO ₂ para destruir organismos patogênicos.
Nanoprobes, Inc.	As nanopartículas de ouro para marcadores biológicos	Nanopartículas de ouro bioconjugados.
NanoMed Pharmaceutical, Inc.	Entrega de Fármacos	Nanopartículas para entrega de fármacos.
Nanoshpere, Inc.	Biomarcadores de ouro	Código de barras de DNA ligado a sondas rastreadas por ressonância de plasmon.
QuantumDot Corporation	Biomarcadores luminescentes	Pontos quânticos bioconjugados.

Fonte: (SALATA, 2004)

2.1 Nanopartículas metálicas

Nanopartículas metálicas são aquelas produzidas a partir de um átomo metálico desde que atendem as definições de tamanho preconizado pela nanotecnologia (BLACKMAN, 2009). As NPs metálicas exibem propriedades diferentes daquelas dos átomos individuais ou materiais massivos, também denominados “bulk”.

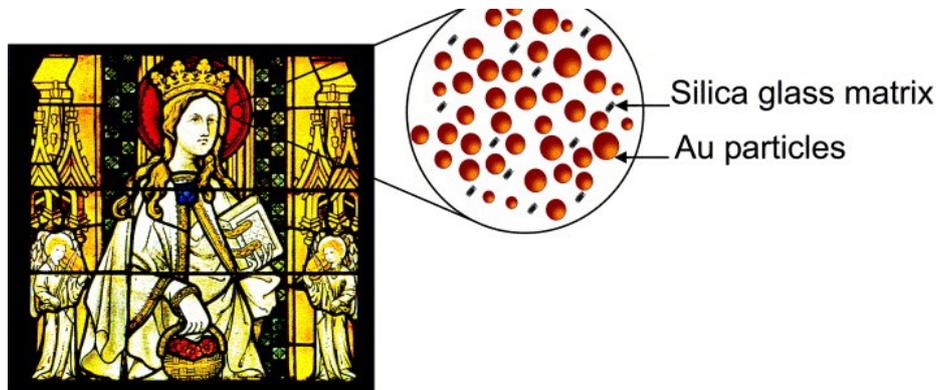
Considerando o aspecto histórico, pode ser verificado que os aspectos ópticos do ouro em nanopartícula foram utilizados pelo homem há centenas de anos: por exemplo, a bela cor de vidro vermelho rubi procede das nanopartículas de ouro (NPAus) em matriz de vidro (Figura 1). Nos esmaltes decorativos conhecidos como brilho, encontrados em algumas cerâmicas medievais (Figura 2 e 3), as propriedades ópticas especiais do esmalte surgiram devido as NPAus que foram dispersas no esmalte de uma forma aleatória. Michael Faraday, em 1857, em seu trabalho pioneiro intitulado "relações experimentais de ouro (e outros metais) para a luz" explica as propriedades deste esmalte. A motivação do seu estudo foi a cor vermelha das NPAus, um contraste marcante com a aparência familiar amarela do ouro na sua forma massiva. Neste pequeno intervalo de tamanho, as partículas são menores do que o comprimento de onda da luz resultando em propriedades ópticas que são diferentes daqueles presentes nos materiais massivos (WENDER LUIZ DOS SANTOS, 2011).

Figura 1 - Vasos contendo vidro rubi, feita no século 19. Vidro rubi foi fabricado durante séculos, embora tenha sido apenas recentemente descoberto que o pigmento vermelho usado contém nanopartículas de ouro.



Fonte: (HISTORIC, 2013)

Figura 2 - Detalhe de uma janela na Catedral de Altenberg. O vidro colorido manchado de vermelho é composto por pequenas partículas de ouro coloidal que residem em uma matriz de vidro.



Fonte: (FREUND, 2002)

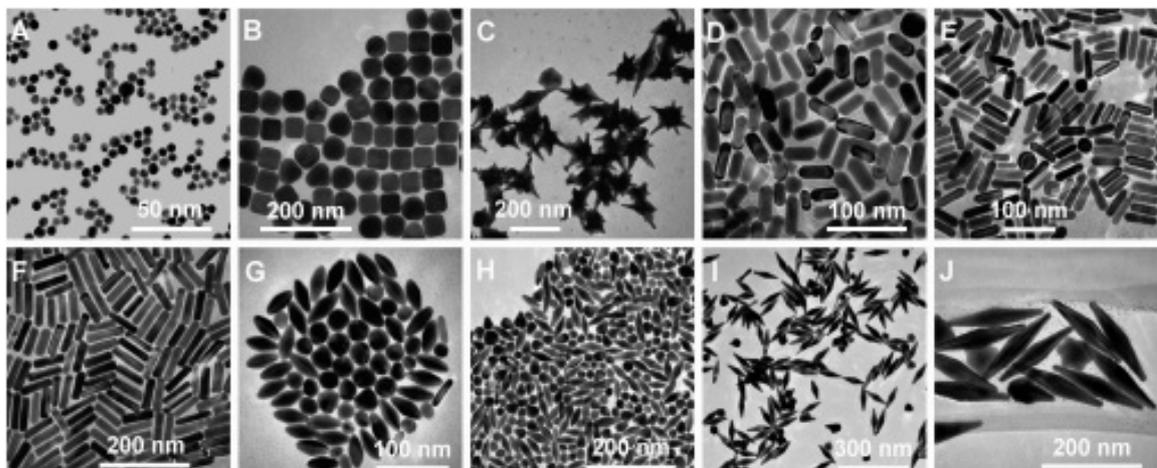
Figura 3 - O Copo de Lycurgus. Esquerda imagem vista em luz refletida; direita imagem vista da luz transmitida.



Fonte: (WALTERS; PARKIN, 2009)

Atualmente, com os avanços tecnológicos a morfologia dos nanomateriais mostra-se melhor compreendida. Os átomos na superfície da matéria estão em um ambiente diferente daqueles do interior do material, e este posicionamento mostra-se capaz de alterar propriedades eletrônicas, químicas e físicas do aglomerado, mesmo para agrupamentos de 2000 átomos, onde cerca de 20% dos átomos se encontram na superfície. Por exemplo, para NPs esféricas a razão superfície/volume aumenta com o inverso do raio. NPs com 1 nm de diâmetro têm mais de 75%, enquanto que para uma NP com 20 nm essa porcentagem é menor do que 0,5 %. Pode-se prever que em domínios nanométricos, onde a superfície passa a ser determinante, as propriedades físicas e químicas das NPs vão depender fortemente do seu tamanho.

Figura 4 - Microscopia eletrônica de transmissão de diferentes nanopartículas de Au: nanoesferas (A), nanocubos (B), nanoramos (C), nanobastões (D), nanobastões (E), nanobastões (F), nanobipiramides (G).



Fonte: (CHEN,KOU, et al.,2008)

Sabemos que compreender o comportamento destes sistemas é um desafio à ciência básica, e que o estudo voltado às aplicações no dia a dia, permite explorar o potencial da nanotecnologia. A óptica, a eletrônica e as propriedades catalíticas das NPs metálicas são muito influenciadas pelo seu tamanho, forma e estrutura cristalina. Por exemplo, a prata (Ag)

e ouro (Au), nanocristais de diferentes formas possuem respostas dispersão ópticas únicas (CHEN KOU, et al., 2008).

Propriedades ópticas das NPAs e nanopartículas de prata (NPAgs) têm sido amplamente utilizados para aplicações em biologia e de tecnologia devido as suas propriedades ópticas únicas. Estas propriedades são conferidas pela interação da luz com os elétrons na superfície das NPAs e NPAgs. Em um determinado comprimento de onda da luz, oscilação coletiva de elétrons na superfície das NPAs e NPAgs causam um fenômeno chamado ressonância de plasma de superfície (SPR), resultando em forte extinção da luz.

2.2 Síntese de Nanopartícula Metálica

A seguir, será descrito as vias comuns de síntese de NPs metálicas, englobando processos de estado sólido, gasoso ou líquido, capazes de formar diferentes tipos de NPs metálicas com variações na forma, no tamanho e estabilidade.

2.2.1 Métodos de Síntese de Nanopartículas Metálica

O conceito “top-down” e “bottom-up” são duas abordagens para o processo de fabricação de sistemas nanoestruturados. Esses termos foram aplicados pela primeira vez ao campo da nanotecnologia pelo Instituto Foresight em 1989 (BISWAS;BAYER, et al., 2012).

Abordagem “top-down” corresponde ao uso de ferramentas de nanofabricação que são controlados por parâmetros experimentais externos para criar estruturas nanométricas e dispositivos funcionais com as formas e as características desejadas (BISWAS; BAYER, et al., 2012). Por outro lado, abordagem "bottom-up" busca construir nanoestruturas a partir de moléculas ou componentes atômicos menos complexos por agrupamentos baseados em mecanismos complexos. Basicamente, esta área de nanofabricação que usa átomos ou pequenas moléculas como blocos de construção de estruturas multi-níveis para realizar várias operações é extremamente promissora, uma vez que resulta no aproveitamento de todos os materiais utilizados (BISWAS; BAYER, et al., 2012).

Porém, durante a síntese das NPs metálicas, uma grande dificuldade encontrada é a reprodutibilidade do processo aliada à redução dos resíduos químicos gerados e à pureza do material obtido (WENDER LUIZ DOS SANTOS, 2011). Os principais métodos para a síntese de NPs são hoje facilmente divididos em métodos químicos e físicos.

Tabela 3 - Principais métodos químicos e físicos para síntese de nanopartículas.

Método Químico	Referências
Redução química de sais de metais (Método do Citrato)	(JANA, GEARHEART e MURPHY, 2001)
Processo de redução de álcool	(NETO, DIAS, <i>et al.</i> , 2007)
Processo de polyol	(SILVERT, HERRERA-URBINA, <i>et al.</i> , 1996)
Microemulsions	(PILLAI e SHAH, 1996; BOUTONNET, KIZLING e STENIUS, 1982)
A decomposição térmica dos sais de metal	(SAPIESZKO e MATIJEVIĆ, 1980)
Síntese eletroquímica	(YING, CHANG, <i>et al.</i> , 1997)
Método Físico	
Explosão pela técnica de fio (Exploding wire technique)	(SEN, GHOSH, <i>et al.</i> , 2003)
Sputtering	(TORIMOTO, OKAZAKI, <i>et al.</i> , 2006)
Deposição de vapor químico	(SMITH e KODAS, 1995)
Micro-ondas de irradiação	(WANG, XU e ZHU, 2002)
Ablação por laser pulsado	(DAT, LEE, <i>et al.</i> , 1995)
Os fluídos supercríticos	(ZHANG e ERKEY, 2006)

Fonte: (Autor, 2015)

2.2.1.1 Redução química de sais de metais (Método do Citrato)

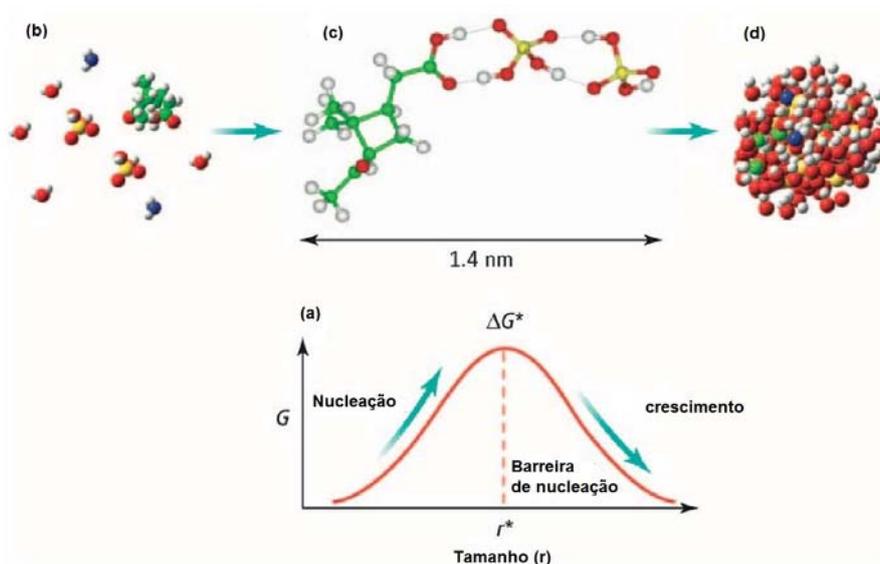
Em 1951, Turkevich e colaboradores descreveram o método de produção de nanopartículas de Au de tamanho de 20 nm utilizando a redução de citrato HAuCl_4 em água (KIMLING, *et al.*, 2006). Posteriormente, Frens em 1973, desenvolveu uma síntese físico-química, utilizando citrato, e obteve tamanhos de nanopartículas variando entre 15 a 150 nm. Ambos os métodos produzem nanopartículas esféricas quase em uma faixa ajustável de tamanho. Trabalhos recentes têm demonstrado a forte influência das concentrações dos reagentes, temperatura e pH sobre a morfologia e tamanho das nanopartículas.

2.2.2 Nucleação

A nucleação é geralmente definida como a criação de embriões ou clusters antes da formação de uma nova fase durante a transformação de vapor \rightarrow líquido \rightarrow sólido. Esse processo é caracterizado por uma diminuição tanto da entalpia quanto da entropia do sistema de nucleação isto é, $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$. (ZHANG, et al., 2012).

Formação de grupos moleculares ocorre através das colisões aleatória e dos rearranjos dos átomos ou moléculas da fase existente, como mostra na figura 5 (b). O crescimento de um cluster pode ser representado como um processo cinético gradual (figura 5c). Depois de alcançar um tamanho crítico (conjunto crítico ou núcleo), o crescimento do cluster começa a tornar-se espontâneo (figura 5d). A cada passo, a formação e a decomposição de um cluster podem ser descritos pelos fundamentos da teoria cinética. Um conjunto pode se formar homogênea na fase inicial ou de forma heterogênea com diversas irregularidades, tais como partículas ou íons pequenos, que auxiliam na superação pré-existente da barreira de energia livre associada à formação de uma interface entre o pequeno aglomerado que vai da nova fase até fase inicial (ZHANG, et al., 2012).

Figura 5 - Comportamento da energia livre total ΔG como função do tamanho de crescimento r da partícula.



Fonte: (CLEMENS, et al 2015)

Para o processo de nucleação ocorrer, a solução deve ser supersaturada, a fim de gerar um tamanho extremamente pequeno de partícula única (BURDA, et al., 2005), (WENDER LUIZ DOS SANTOS, 2011). A mudança de energia livre total, ΔG , é a soma da energia livre devido à formação de um novo volume com a energia livre devida à nova superfície criada (WENDER LUIZ DOS SANTOS, 2011).

Considere-se uma partícula esférica, onde V é o volume molecular das espécies precipitadas, r o raio do núcleo, K_B a constante de Boltzmann, S razão da saturação e γ a energia livre de superfície por unidade de área de superfície (WENDER LUIZ DOS SANTOS, 2011). Quando S é maior que 1, G mostra um máximo positivo em um tamanho crítico r^* (Figura 5 a).

Esta máxima energia livre é a energia de ativação para nucleação dada pela equação a seguir.

Equação 1. (BURDA, et al., 2005)

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3 K_B T \ln(S) + 4\pi r^2 \gamma$$

O tamanho crítico dos núcleos r^* podem ser obtidos definindo $dG/dr = 0$

Equação 2 (BURDA, et al., 2005)

$$r^* = \frac{2V\gamma}{3K_B T \ln(S)}$$

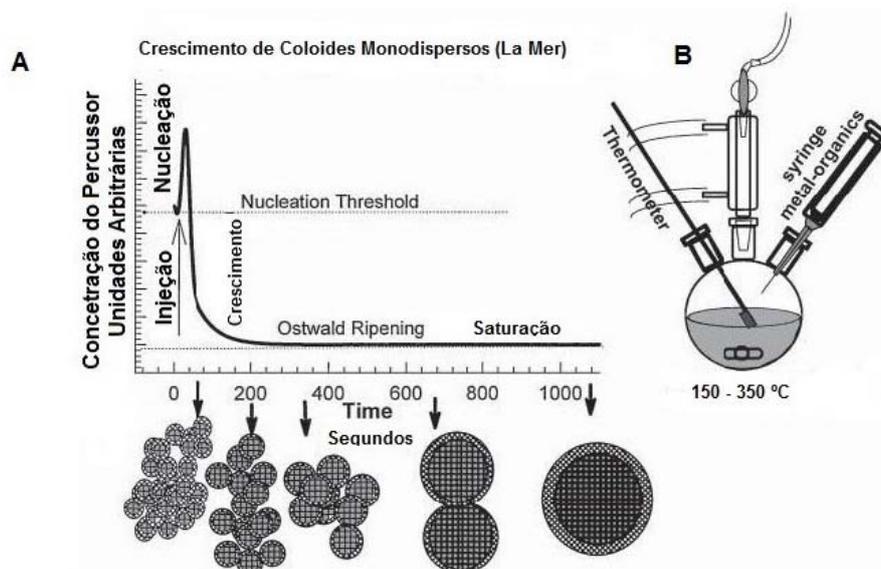
Para um dado valor de S , todas as partículas com $r > r^*$ vão crescer e todas as partículas com $r < r^*$ vão dissolver. A partir da equação 2, quanto maior a proporção de saturação S , teremos um menor tamanho crítico de r^* .

2.2.3 Crescimento das Nanopartículas

Após os núcleos serem formados a partir da solução, eles crescem através da deposição das espécies solúveis na superfície sólida, fenômeno conhecido com adição molecular (WENDER LUIZ DOS SANTOS, 2011). A nucleação para quando a concentração cai abaixo do nível crítico, mas as partículas continuam crescendo pelo processo de adição molecular até que a concentração de equilíbrio das espécies seja atingida (BURDA, CHEN, *et al.*, 2005). Existe uma taxa de crescimento diferencial para as partículas pequenas e para as grandes neste estágio. Supondo que as partículas grandes são ligeiramente maiores que o tamanho crítico, a energia livre impulsionando o crescimento é maior para as partículas pequenas que vão crescer mais rapidamente (WENDER LUIZ DOS SANTOS, 2011).

Deve-se notar que são diferentes as taxas relativas de crescimento de partículas pequenas e grandes quando os reagentes estão esgotados devido ao crescimento das partículas. Neste caso, ocorrerá o processo conhecido como *Ostwald ripening* (“amadurecimento” de Ostwald) (Figura 6), onde as partículas menores se dissolvem e se depositam na superfície das partículas maiores (WENDER LUIZ DOS SANTOS, 2011). A taxa de saturação (S) é decrescente e o tamanho de núcleos críticos correspondentes (r^*) é crescente (Equação 2).

Figura 6 - Crescimento coloidal monodisperso do modelo de La Mer (Figura A) e aparato típico de síntese de Nanopartículas via rota líquida (Figura B).



Fonte: (MURRAY;KAGAN;BAWENDI, 2000)

Nesta situação, partículas menores irão dissolver, enquanto que as maiores continuarão a crescer. Parar a reação a este ponto resulta em uma larga distribuição de partículas com dois regimes (por partículas menores e maiores) de cada lado da dimensão crítica (WENDER LUIZ DOS SANTOS, 2011). A única maneira de obter partículas de tamanhos próximos à monodispersão, nesta fase, é permitir que a reação prossiga até que a supersaturação se esgote e os núcleos menores desapareçam completamente. Isto seria desejado para a síntese de partículas relativamente grandes (micrôns em diâmetro), por exemplo.

Um fator adicional que deve ser considerado é o crescimento secundário. Este é o crescimento das partículas por agregação com outras partículas. O crescimento por este processo é mais rápido do que na adição molecular, e isso ocorre pela combinação de partículas estáveis com pequenos núcleos instáveis.

Finalmente, devemos notar que as NPs são pequenas e não são termodinamicamente estáveis, sendo necessário estabilizá-las, quer por adição de reagentes protetores à superfície da partícula, tais como ligantes orgânicos ou agentes inorgânicos envolventes, ou colocando-as em um ambiente inerte, tal como uma matriz inorgânica ou polimérica. A escolha adequada do material de proteção também pode fornecer uma barreira para neutralizar a atração entre as NPs devido à interação de van der Waals (ou de atração magnética, no caso de materiais magnéticos).

2.3 Métodos de caracterização das nanopartículas

2.3.1 Espectrofotometria óptica UV-visível.

Espectrofotometria na região UV-Vis do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, baixo custo e diversidade de aplicações (ŁOBIŃSKIA; MARCZENKO, 1992).

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra.

A absortividade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b , a distância percorrida pelo feixe através da amostra (ŁOBIŃSKIA; MARCZENKO, 1992).

2.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostra-se como uma das técnicas mais usadas para caracterização de nanopartículas, pois permite avaliar a morfologia, o arranjo atômico e defeitos dos materiais (WILLIAMS, 2009). O microscópio eletrônico de transmissão consiste basicamente de um canhão, que gera um feixe de elétrons de alta energia, 100–400 keV ($\lambda = 0,01\text{-}0,004$ nm); um conjunto de lentes condensadoras (C_1 , C_2 e C_3), que transmitem o feixe até a amostra; 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. Este sistema de lentes torna possível reduzir a secção transversal do feixe, o qual é usado para iluminar a área de interesse na amostra. Uma função importante do sistema de iluminação é o alinhamento do feixe eletrônico e a possibilidade de variação do seu ângulo de incidência com respeito ao eixo ótico da lente objetiva. A recombinação dos feixes difratados e transmitidos com diferentes intensidades resulta na

diferença de contraste da imagem formada. O contraste de fase resulta da interação entre feixes que percorrem regiões adjacentes da amostra, entre as quais haja diferenças de fase provocadas por variações de espessura. O estudo da interação entre a radiação e a matéria indica uma variação de intensidade periódica com a espessura da amostra, e com sua estrutura cristalina. Finalmente, uma vez que o comprimento de onda dos elétrons corresponde à distância inter-atômica nos sólidos, a difração se apresenta como fenômeno de importância (WILLIAMS, 2009).

A difração de elétrons é rotineiramente conduzida em uma análise de microscopia eletrônica de transmissão para obter informações adicionais como a estrutura cristalina, hábito cristalino e orientação molecular. Os resultados obtidos podem ser comparados aos providenciados pela difração de raios-x, sendo que a grande diferença está na quantidade de amostra empregada na análise.

Com o foco correto e ampliações adequadamente selecionadas, os elétrons criam uma imagem projetada da amostra na tela fluorescente, sendo esta imagem registrada em uma chapa fotográfica ou câmara CCD contidos no microscópio. As micrografias obtidas com a difração de elétrons utilizando a TEM podem ser digitalizadas e comparadas com projeções teóricas, bastando sobrepor os padrões de difração teóricos e experimentais (WILLIAMS, 2009). A composição qualitativa pode ser elucidada com a ajuda de EDS. Para que uma amostra possa ser analisada por TEM é necessária uma fina espessura (com alguns nanômetros), limpa, condutora e estável sob a ação do feixe. É importante, ainda, que a amostra de TEM seja representativa.

2.3.3 Microscopia de força atômica

Microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica que permite ver e medir a estrutura de superfície com resolução e precisão atômica (EATON; WEST, 2010). Um microscópio de força atômica possibilita obter imagens que mostra o arranjo dos átomos individuais numa amostra, ou para ver a estrutura de moléculas individuais (EATON; WEST, 2010).

Os três conceitos básicos para o funcionamento de um AFM são:

- Transdutores piezoelétricos (em AFM, muitas vezes conhecidos como scanners piezoelétricos);
- Transdutores de força (sensores de força);
- Controle de feedback.

Basicamente, o transdutor piezoelétrico move a ponta sobre a superfície da amostra, o transdutor de força detecta a força entre a ponta e a superfície e o controle de realimentação alimenta o sinal proveniente do transdutor de força de volta para o piezoelétrico, para manter fixa entre a ponta e a amostra (EATON; WEST, 2010).

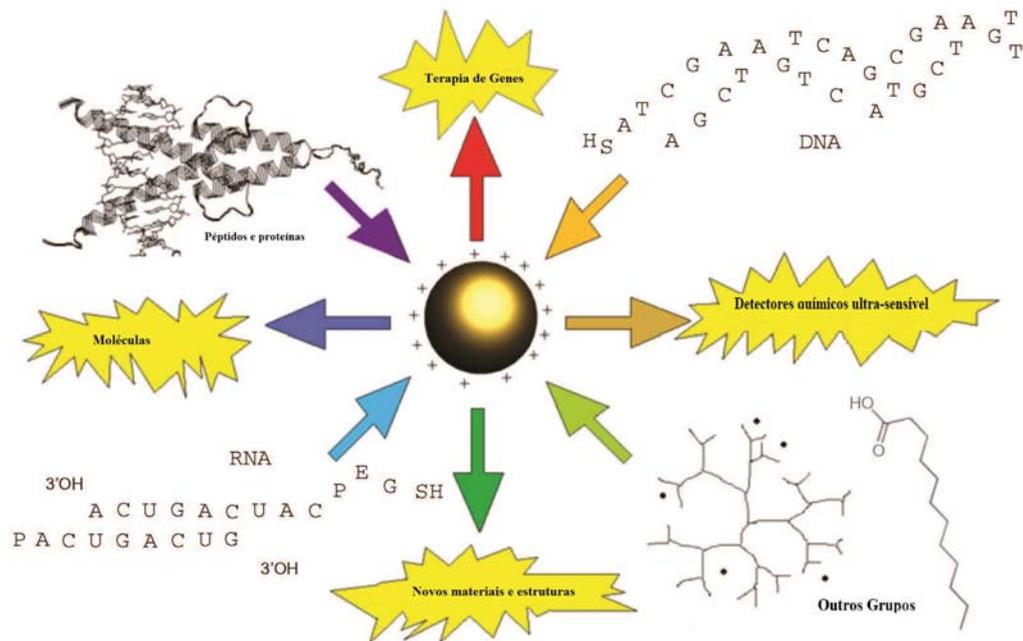
Imagens pequenas de apenas 5 nm de tamanho, mostrando apenas 40-50 átomos individuais, podem ser coletadas para medir a estrutura cristalográfica de materiais, ou imagens de 100 micrómetros ou maiores podem ser medida, que mostra as formas de dezenas de células vivas, ao mesmo tempo (EATON; WEST, 2010).

2.4 Aplicações das nanopartículas

Nas últimas décadas, o avanço da nanotecnologia possibilitou a síntese e caracterização de uma série de nanoestruturas úteis para aplicações na área biomédica. As principais classes de nanoestruturas biologicamente relevantes incluem pontos quânticos semicondutores, nanopartículas magnéticas, nanopartículas poliméricas e nanopartículas metálicas.

Cabe mencionar as NP Au com sua capacidade de interação com os componentes celulares como o DNA, RNA e proteínas, o que vem possibilitando o desenvolvimento de métodos para entrega e estabilização de fármacos (DELONG, et al., 2010). O potencial das NP Au tem estimulado a pesquisa em várias direções, que, para além da estabilização de RNA incluem uma diversidade de aplicações em ciência dos materiais e tecnologias de sensores como resumidos na Figura 7.

Figura 7 - Resumo desenhado para realçar várias aplicações de NPau com diferentes tipos de conjugados de macromoléculas, como DNA, RNA, peptídeos e ácidos carboxílicos.

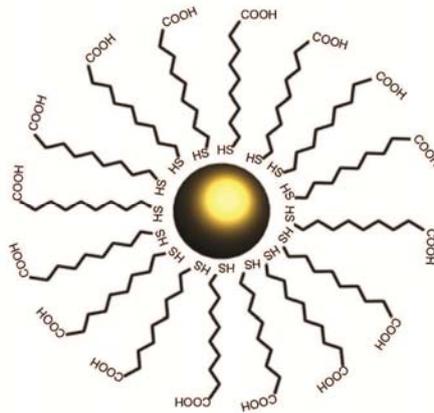


Fonte: (PARK, LEE; MIRKIN, 2006; ELBAKRY, et al., 2009; KRPETI, et al., 2009; USON, 1978)

A funcionalização de nanopartículas mostra-se como uma estratégia necessária para favorecer a estabilidade, funcionalidade e biocompatibilidade de nanoestruturas. Exemplificando, as NPau funcionalizadas devem apresentar na superfície da nanoestrutura moléculas biológicas estáveis e capazes de manter a suas propriedades químicas e biológicas e as NPaus devem ser capaz de continuar com suas propriedades, como a ressonância de plasmon (NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003) e espalhamento da luz (JANS, LIU; HUO, 2009). Para aplicações biomédicas, funcionalização das NPaus mostra-se essencial, a fim de orientá-las para áreas de doenças específicas e permitir-lhes de maneira seletiva interagir com as células ou moléculas biológicas (DELONG, REYNOLDS, et al., 2010).

NPaus normalmente são estabilizadas contra agregação usando cadeias longas de hidrocarbonetos constituídos por vários grupos funcionais. Uma das extremidades dessas moléculas é conectada à superfície do ouro, enquanto que o outro ponto da extremidade é conectado com as moléculas, como mostrado na Figura 8 (DELONG, REYNOLDS, et al., 2010).

Figura 8 - Quimissorção de cadeias de ácidos mercaptocarboxílico na superfície de em uma nanopartícula de ouro.



Fonte: (REYNOLDS, et al., 2010)

No caso de NPAus solúveis em água, estes grupos funcionais são ácidos carboxílicos que estabilizam as nanopartículas por repulsão eletrostática e pode ser explorada para a conjugação de outras moléculas, para as partículas. A escolha do ligante depende do tamanho das NPs e do solvente, estes ligantes podem também ser usados como pontos de ancoragem para uma maior fixação biológica de moléculas. Ácidos mercaptocarboxílico são populares na estabilização da NPAus, devido à forte afinidade do enxofre com o ouro (DUBOISAND;NUZZO , 1992; USON , 1978).

O polietileno glicol (PEG) mostra-se como outro composto utilizado para funcionalização uma vez que proporciona estabilidade coloidal, nanopartículas com PEG sobre as suas superfícies repelem umas às outras por razões de carácter estérico (KANARAS; KAMOUNAH; BRUST, 2002). O uso de PEG como um grupamento de funcionalização permite a fabricação de NPAus solúveis em água que não agregam mesmo sob condições extremas do pH e ou em presença de proteínas. Em alguns casos, pode ser necessário para alterar o componente da funcionalização. Troca de grupos funcionais pode ser motivada por transferência de NPAus a partir de uma solução aquosa

em fase orgânica e vice-versa, e por meio da troca surfactantes hidrofílicos com surfactantes hidrofóbicos e vice-versa (PELLEGRINO, et al., 2005).

2.4.1 Sensoreamento

Com o desenvolvimento da tecnologia, busca-se cada vez mais a simplificação dos métodos analíticos. Este racional é comum nas áreas da química, medicina, biologia e biotecnologia. Assim, nos últimos anos, tem-se tornado disponíveis no mercado um maior número de detectores portáteis que permitem a redução do tamanho da amostra e economia no tempo de análise. Os biossensores potenciaram o desenvolvimento de uma família de técnicas eletroquímicas que oferecem rapidez e simplicidade.

Os biossensores são definidos como qualquer dispositivo de detecção que incorpore tanto um organismo vivo ou produtos derivados de sistemas biológicos (enzimas, anticorpos, DNA, etc.), com um transdutor que fornece a indicação, sinal ou outra forma de reconhecimento de uma substância específica no ambiente (THEVENOT, et al., 1999).

Um biossensor é um dispositivo composto basicamente por dois elementos:

1. Um biorreceptor que é um elemento biológico sensível imobilizado (por exemplo, enzima, a DNA sonda, anticorpo) que reconhece o analítico (por exemplo, substrato de enzima, o DNA complementar, antígeno).
2. Um transdutor é usado para converter sinal químico resultante da interação dos analíticos com o biorreceptor em um sinal eletrônico. A intensidade do sinal gerado é direta ou inversamente proporcional à concentração de analítico. Transdutores eletroquímicos são muitas vezes utilizados para desenvolver biossensores. Estes sistemas oferecem algumas vantagens tais como baixo custo, design simples ou pequenas dimensões. Os biossensores podem também basear-se em gravimétrico, calorimetria ou de detecção óptica (BLUM; LECA-BOUVIER; SASSOLAS, 2011).

O primeiro biossensor foi descrito em 1962 por Clark e Lyons que imobilizava glicose oxidase (GOD) na superfície do eletrodo de oxigênio em membrana de diálise amperométrica semipermeável, a fim de quantificar a concentração de glicose numa amostra diretamente (BLUM; LECA-BOUVIER; SASSOLAS, 2011).

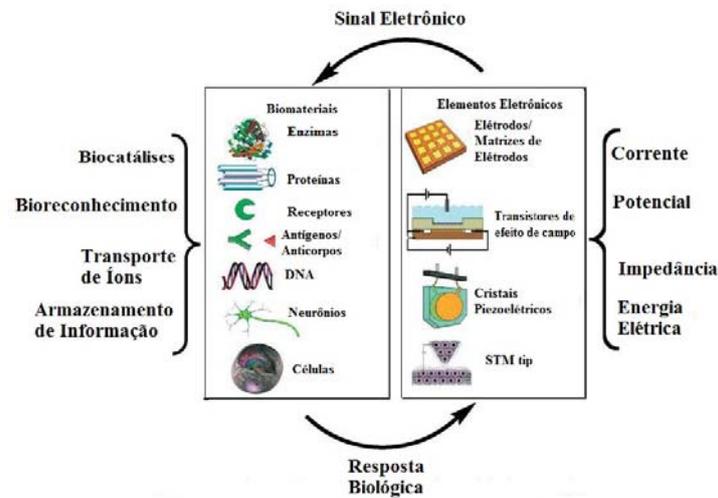
Os biossensores são categorizados de acordo com os princípios básicos de transdução de sinal e elementos de bioreconhecimento. De acordo com os elementos de transdução, os biossensores podem ser classificados como sensores eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos e térmicos (THEVENOT, et al., 1999). Os biossensores eletroquímicos são também classificados como potenciométrico, amperométrico e sensores condutométricos.

Dentre as áreas de aplicação dos biossensores destacam-se o diagnóstico, biorreatores, controle de qualidade, agricultura, mineração, defesa militar e etc (LIN; LIU, 2005). Algumas vantagens de biossensores estão listadas abaixo:

1. Eles podem medir moléculas apolares que não respondem a mais de uma medição em outros dispositivos.
2. Biossensores são específicos, devido ao sistema de imobilização usado neles.
3. Com biossensores é possível o controle rápido e contínuo.
4. Tempo de resposta é curto (geralmente menos do que um minuto).
5. Praticidade.

Os dispositivos bioeletrônicos (Figura 9) podem operar em duas direções: Numa configuração, o evento biológico altera as propriedades interfaciais de o elemento electrónico, permitindo assim a leitura do bio-reação por monitorização o desempenho da unidade eletrônica, tal como a leitura do potencial, impedância, cobrar o transporte, ou a resistência da superfície de eletrodos ou transistores de efeito de campo, ou seguindo as frequências de ressonância de cristais piezoelétricos. A segunda configuração de sistemas bioeletrônicos usa as unidades eletrônicas para ativar os biomateriais em direção das funções pretendidas.

Figura 9 - Sistemas integrados de biomateriais e elementos eletrônicos para aplicações em biossensores.



Fonte: (LIN; LIU, 2005).

2.4.2 Terapêutica

Durante séculos, a prata tem sido utilizada para o tratamento de queimaduras e feridas crônicas. Em 1000 a.C a prata já era conhecida por tornar a água potável (FONG; WOOD, 2006). O nitrato de prata foi utilizado na sua forma sólida e era conhecido por diferentes termos como, "Lunar cáustica" em Inglês, "Lapis infernale" em latim e "Pierre infernale" em francês (FONG; WOOD, 2006).

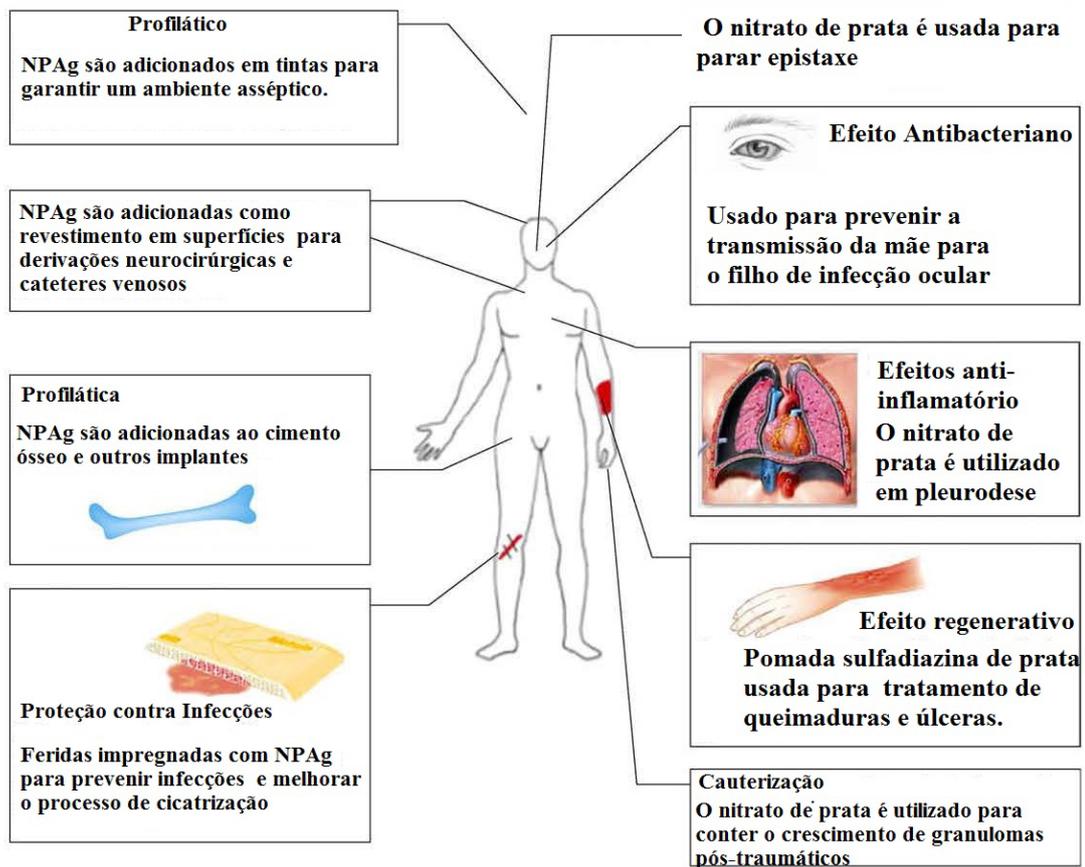
Diferentes tipos de metais (cobre, zinco, titânio, magnésio, ouro) foram utilizados para síntese de nanomateriais com propriedade antibacteriana, mas apenas as nanopartículas de prata mostraram ser eficazes para tal objetivo. Ao final do século 19, era comum a prática de usar solução de nitrato de prata (1%) em curativos para reduzir infecções pós-operatórias oculares (FONG; WOOD, 2006)

Em 1965, Moyer iniciou as investigações com soluções de nitrato de prata. Na época, foram avaliadas várias concentrações de nitrato de prata e concluiu-se que uma solução de 0,5% de nitrato de prata tinha potencial de induzir morte em bactérias (*Staphylococcus*

aureus, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*) em meios de cultivo bacteriano, bem como em feridas infectadas. (KLASEN, 2000). O fármaco chamado acetato de mafenide foi introduzido em curto tempo após a reintrodução de nitrato de prata, mudando alguns anos mais tarde, para sulfadiazina de prata. (KLASEN, 2000).

A investigação atual suporta que as nanopartículas de prata podem ser exploradas na medicina para o tratamento de queimaduras, materiais odontológicos, materiais de revestimento de aço inoxidável, tecidos têxteis, tratamento de água, cremes protetores solares, etc, por possuírem baixa toxicidade para células humanas, alta estabilidade térmica e baixa volatilidade (MARCARTO, et al., 2007). Estudos recentes demonstram que NPAg possuem um potencial anti-inflamatório (NADWORNYY, et al., 2008;TIAN, et al., 2007) e de aceleração no processo de cicatrização de feridas (HUANG, et al., 2007). Confirmando tal propósito, a prata nanoparticulada é utilizada clinicamente como uma ferramenta valiosa no arsenal terapêutico (Figura 10).

Figura 10 - Usos de nanopartículas de prata NPs de prata (lado esquerdo) e prata (lado direito) em medicina.



Fonte: (CHALOUPEK; MALAM; SEIFALIAN, 2010)

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral realizar a síntese de nanopartículas metálicas de ouro e de prata visando aplicações em biologia.

3.1.1 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de ouro e de prata.
- Caracterizar as nanopartículas por UV-Vis, AFM e HRTEM.
- Avaliar a atividade da emulsão composta por nanopartículas de prata em óleo de copaíba no processo de cicatrização de feridas cutâneas infectadas.
- Desenvolver as bases para construção de um biossensor capaz de detectar a presença de proteínas.

4 PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO

O processo de cicatrização é um evento biológico complexo que visa reparar a área lesada. Para que um ferimento seja curado com êxito, eventos de inflamação, proliferação e remodelamento devem ocorrer em uma sequência apropriada, e o resultado final, geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, configura o somatório desse processo (CALVIN, 1998). Assim, a cicatriz corresponde à tentativa biológica a qual o organismo recorre para restaurar sua integridade, sendo este processo dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação. Tais fases não constituem processos isolados, e com frequência se sobrepõe umas às outras (PILCHER, et al., 1999; SCHÄFFER; BARBUL, 1998).

A fase inflamatória inicia-se logo após a lesão e é caracterizada pela vasoconstrição mediada por fatores neurogênicos durante um período de segundos a minutos, e, em seguida, pelo vaso dilatação local que, por aumentar a permeabilidade vascular, favorece a exsudação plasmática e a passagem de elementos celulares para a área da lesão. Os mediadores bioquímicos de ação curta envolvidos nestes eventos são a histamina e serotonina. A prostaglandina é um dos mediadores importantes no processo de cicatrização, pois além de favorecer a exsudação vascular, ocasiona a sensibilização de terminações nervosas desencadeando dor e promove ativação de leucócitos (CALVIN, 1998; AUKHIL, 2000).

A fase proliferativa é composta de três eventos importantes que sucedem o período de maior atividade da fase inflamatória: neo-angiogênese, fibroplasia e epitelização. Esta fase caracteriza-se pela formação de tecido de granulação, que é constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. Esta fase inicia-se por volta do 3º dia após a lesão, perdura por 2 a 3 semanas e é o marco inicial da formação da cicatriz (IBA; SHIBATA; KATO M., 2004).

A maturação da ferida tem início durante a 3ª semana sendo marcada pela remodelagem dos tecidos no sentido de restaurar a forma e função do tecido lesado. Esta etapa caracteriza-se pela deposição, agrupamento e remodelação do colágeno associado à regressão endotelial, apresentando tecido conectivo, fibras colagênicas e poucos vasos sanguíneos (WERNER; GROSE, 2003). O desequilíbrio desta relação favorece o aparecimento de cicatrizes hipertróficas e quelóides. O aumento da resistência deve-se à remodelagem das fibras de colágeno, com aumento das ligações transversas e melhor

alinhamento do colágeno, ao longo das linhas de tensão. A fase de maturação dura toda a vida da ferida, embora o aumento da força tênsil se estabilize, após um ano, em 70 a 80% da pele intacta (DIPIETRO; BURNS, 2003).

As perdas teciduais são frequentes e têm como agravantes diferentes etiologias e extensões pelo organismo. Dessa forma, é de suma importância ter alternativas de escolha para o tratamento adequado, sempre que possível, ao tipo de lesão. Os tratamentos preconizados para lesões cutâneas apresentam no decorrer do processo cicatricial limitações quando ao desenvolvimento do processo de reparo. Isto implica na necessidade de administrar doses elevadas e frequentes para alcançar e manter a resposta terapêutica desejada, ocasionando, além de efeitos locais, a possibilidade de incidência de efeitos sistêmicos indesejados (CHRAI, et al., 1973). Com isso, o tratamento de feridas objetivando melhores resultados cicatriciais, modificou-se ao longo dos séculos, onde várias substâncias vêm sendo utilizadas na tentativa de acelerar o processo cicatricial, como o emprego de diferentes materiais sintéticos, biológicos ou biossintéticos, no intuito de suprir as deficiências do tratamento convencional (MODOLIN, 1992).

Entre as estratégias que vêm sendo utilizadas para prolongar o tempo de contato do medicamento sobre a superfície, no intuito de aumentar as oportunidades de absorção tecidual após a administração tópica, destacam-se os sistemas dispersos. Estes sistemas constituem uma interessante alternativa clínica por proporcionaram comodidade, simplicidade na administração, tolerância e boa aceitação das preparações líquidas e, ao mesmo tempo, o aumento do tempo de contato princípio ativo/área lesionada. Como consequência, os sistemas dispersos têm potencial para reduzir a frequência de aplicação e diminuir a incidência de efeitos secundários sistêmicos, quando comparadas com as formulações convencionais (ZIMMER; KREUTER, 1995, CHIANG, et al., 2001). No entanto, dadas as dificuldades e complicações que dificultam a cicatrização normal, estratégias inovadoras para o tratamento de feridas que proporcionem uma cicatrização adequada são necessários.

Apesar da predominância, no arsenal terapêutico, de substâncias sintéticas, inclusive as anti-inflamatórias, nos últimos anos têm-se verificado retomada à valorização de práticas terapêuticas consideradas por muitos profissionais de saúde como populares ou não científicas, inclusive a lenta reincorporação das ervas medicinais como alternativa ou

complemento terapêutico. Vários foram os fitoterápicos testados e usados no processo de cicatrização de feridas cutâneas que se mostraram promissoras.

A prata tem sido usada por centenas de anos para o tratamento de diferentes afecções incluindo cauterização e cicatrização da pele (KLASEN, 2000, HANIF, et al., 2003). Dentre seus efeitos biológicos descritos para a prata, vários trabalhos revelam suas ações bactericidas por ser capaz de bloquear enzimas das vias fosforilativas, gerar alterações no DNA e na parede bacteriana (MODAK; FOX, 1973). Levando-se em consideração as propriedades antibacterianas, alguns autores têm sugerido possíveis propriedades pró-cicatrizantes da prata (WRIGHT, et al., 2002).

A copaíba, também chamada copaífera, da família Caesalpiniaceae, é representada por uma árvore de grande porte chegando a medir 30 a 40 m de altura. Apresenta casca rugosa e características peculiares como inflorescência, frutos e óleo obtido a partir do tronco, variável de acordo com sua espécie (DWYER, 1951). Este último é representado por um produto ou exsudação patológica do tronco da árvore (GOTLIEB; IACHAN, 1945) constituído principalmente por óleo volátil hidrocarbonatado, ácido copaífero, cariophillene e outros sesquiterpenos (BERG; SILVA, 1988; BRENÉTON, 1993). Além da existência de relatos sobre o uso popular desta planta, há diferentes trabalhos científicos demonstrando suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante (BASILE, et al., 1988; SIMÕES, et al., 1999).

Atualmente, a nanotecnologia tem possibilitado a produção de nanopartículas puras de prata, o que proporciona uma melhora na taxa de liberação de íons (FAN; BARD, 1999.). Recentemente, foi demonstrado que nanopartículas de prata exibem atividades citoprotetoras em células infectadas com HIV (SUN, et al., 2005). Entretanto, estudos que avaliam as propriedades cicatrizantes de nanopartículas de prata são raros. Além disso, ainda não foi descrito estratégias que visem aperfeiçoar as propriedades biológicas de substâncias reconhecidas cicatrizantes, tais como óleo de copaíba e a prata. Dessa maneira, acreditamos ser capazes de elevar o potencial cicatrizante do óleo de copaíba quando associado com nanopartículas de prata.

5 METODOLOGIA

Entre os diversos métodos de produção de nanopartículas (MURRAY; KAGAN, 2000), os métodos de síntese química por via úmida possuem uma grande vantagem de serem de baixo custo e altamente escaláveis, abrindo a possibilidade para sua produção em escala industrial. Utilizando este método, é possível obter partículas com dimensões nanométricas na forma coloidal, com controle eficiente de tamanho e morfologia (MURRAY; KAGAN, 2000; ZHOU, et al., 2009).

Embora alguns métodos de síntese de sistemas coloidais de nanopartículas sejam bem conhecidos, existem ainda deficiências no desenvolvimento de colóides estáveis contendo, por exemplo, nanopartículas de prata em óleos. Assim, além de produzir sistemas coloidais aquosos de Ag, se possível com diferentes formas, investigaremos a produção de sistemas coloidais orgânicos e biocompatíveis de Ag, utilizando o óleo de copaíba como dispersante para as nanopartículas.

5.1 Síntese de NPAs

EQUIPAMENTO E REAGENTES

- Erlenmeyer
- Balança
- Pipeta
- Agitador magnético ou mecânico
- Manta de aquecimento
- Termômetro
- AgNO₃ (Nitrato de prata)
- C₆H₅Na₃O₇ (Citrato de Sódio)
- Água deionizada

PROCEDIMENTO

As NPAs foram sintetizadas no Laboratório de Óptica e Materiais (OPTMA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) sob a supervisão do Professor Dr. Jandir Hickmann. Para obter as NPAs primeiro foi preparada a solução de partida, pesou-se 1g de AgNO₃ (Sigma-Aldrich) e dissolveu em 100 ml água deionizada, obtendo uma solução transparente. Em seguida, 1 mL da solução de AgNO₃ foi dissolvido em 49 mL de água deionizada, na sequência a solução foi aquecida até atingir 96 °C, durante esse processo a solução foi agitada com uma barra magnética. Ao atingir 96 °C foi adicionado a solução 1,75mL de citrato de sódio, preparado a partir de 0,1 g de C₆H₅Na₃O₇ (Sigma-Aldrich) dissolvido em 10mL de água deionizada.

A temperatura foi mantida em 96 °C e em agitação até acontecer a mudança de cor de incolor para amarelo turvo. As NPAs estabilizadas com citrato sintetizadas através desse método apresentaram tamanho médio de 5 a 10 nm.

5.2 Modelo de ferida excisional e tratamento

Animais: Camundongos Swiss machos (18-25g) foram fornecidos pelo Biotério Central da UFAL. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética Institucional (licença nº 23065.12614/2006-89).

Modelo de ferida excisional: Camundongos Swiss machos, previamente anestesiados e tricotomizados, foram submetidos à excisão cirúrgica na região dorsal interescapular para remoção da pele até o nível suprafascial de maneira circular (1 cm de diâmetro) e posterior inoculação de 1.5×10^5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os ferimentos foram tratados uma vez ao dia por 9 dias consecutivos, com aplicação tópica (200 µL) de soluções contendo salina (NaCl, 0,9%), óleo de copaíba (OC), óleo de copaíba associado a nanopartículas de prata (OC-NanoAg, 0,01%), ou Dermazine®, como medicamento de referência. O diâmetro do ferimento foi registrado diariamente por

câmera (Sony Cyber-Shot, Dsc W80). No 10º dia de experimentação, os animais foram sacrificados e parte da ferida removida para análise histológica, tendo sido utilizado como corantes hemotoxilina/eosina para avaliar a estrutura tecidual e tricrômio de Masson para marcação de colágeno. As feridas foram fotografadas no período pós-operatório imediato e no 3º, 6º e 9º dias pós-operatórios (câmera fotográfica Sony Cyber Shot, Dsc w80).

Análise estatística: Os resultados foram representados como média e erro padrão da média (EPM), e avaliados através da análise de variância e do teste t de Student seguido do teste de Newman-Kewls com um nível de significância selecionado para $p < 0.05$.

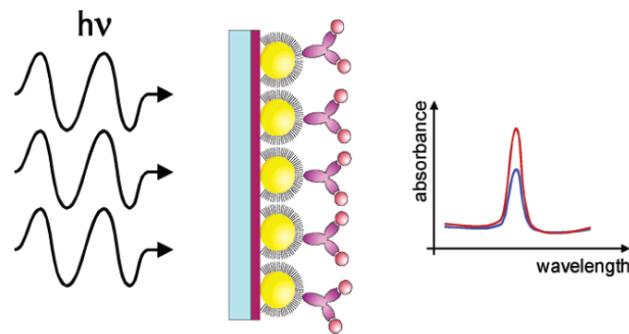
5.3 Síntese de NPAus

5.3.1 Modelo do biossensor utilizando NPAus

O diagnóstico precoce da asma é um desafio importante que precisa ser enfrentado, pois pode permitir o pronto tratamento de crises agudas desta patologia. Para o diagnóstico precoce, podem ser utilizados eventos típicos do processo inflamatório alérgico (alteração nos constituintes de matriz extracelular, mobilização de células inflamatórias – em especial eosinófilos, expressão de moléculas de adesão, mediadores inflamatórios e óxido nítrico exalado) como indicador da progressão e severidade da doença. Estes eventos podem ser monitorados através de biossensores.

Biossensores são dispositivos que convertem uma informação biológica, por exemplo, a presença de uma proteína, em outra informação que pode ser medida facilmente, por exemplo, a modificação de uma frequência de ressonância de plásmon. A nanotecnologia traz várias possibilidades para construção de biossensores e para desenvolvimento de novos bioensaios (ANKER, et al., 2008). A introdução de nanopartículas de metal para detecção pode facilitar significativamente a sensibilidade desses biossensores, controlando seu tamanho, estabilidade química e alta atividade catalítica as nanopartículas torna-se uma vantagem para esses biossensores (FUJIWARA , et al., 2006).

Figura 11 - Representação esquemática de um biossensor usando nanopartículas de ouro, depositados sobre um substrato de quartzo. Da esquerda para a direita: fonte de luz, substrato de quartzo; camada de adesão mercaptosilano; nanopartículas de ouro; monocamada de tiol, anticorpos e antígenos. O resultante aumento de espectros de absorbância após a ligação do analito mais anticorpo com as NPAus é mostrado do lado direito da figura.



Fonte: (FREDERIX , et al., 2003)

5.3.2 Alvo do biossensor

A migração de leucócitos para o sítio da reação inflamatória é principalmente dependente da expressão local de sinais químicos solúveis. Este conhecimento possui grande relevância a considerar que estas células possuem papel fundamental na patogenia das doenças alérgicas, tal como a asma. Os eosinófilos são leucócitos derivados da medula óssea que estão intimamente relacionados em doenças específicas como as alergias e infecções helmínticas. Os eosinófilos são células circulantes e sua infiltração nas vias aéreas e pulmão é uma característica típica das alergias, em especial a asma.

Na asma a função dos eosinófilos mostra-se relacionada com a sua capacidade de liberar grânulos de proteínas tóxicas, espécies reativas de oxigênio (ERO), citocinas e mediadores lipídicos (LIU, et al., 2006). O recrutamento e a inflamação eosinofílica estão envolvidos na patogênese da asma e o mediadores pró-inflamatórios derivados dos eosinófilos são grandes contribuintes para inflamação na asma, incluindo os danos em células epiteliais das vias respiratórias e a descamação, a disfunção das vias aéreas por aumento da liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas colinérgicas, hiperresponsividade, hipersecreção de muco e o remodelamento das vias aéreas, caracterizada por fibrose e deposição de colágeno

(KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013). A asma possui um grande impacto na atualidade, pois afeta cerca de 315 milhões de pessoas em todo mundo entre adultos e crianças (STANOJEVIC, et al., 2012), e causa 1 morte em cada 250 indivíduos asmáticos, o que torna esta doença um importante problema de saúde pública mundial (FOLLENWEIDER; LAMBERTINO, 2013) No Brasil, considerando as estatísticas do DATASUS, as complicações decorrentes da asma ocasionaram aproximadamente 660 mil internações no período de janeiro de 2008 a abril de 2011. Deste total de internações, 45,5% foram registrados no nordeste, 21,6% no sudeste, 15% no sul, 9% no norte e 10,2% no centro-oeste. Neste mesmo período, foram gastos cerca de 334 milhões de reais no tratamento desses pacientes. Porém, mesmo com todo gasto do sistema de saúde, neste período foram notificados 2.828 óbitos decorrentes da asma (BRASIL, de 17 de dezembro de 2010). Portanto, são necessários amplos esforços para melhorar o acesso à assistência médica e reduzir a disparidade dos resultados do impacto da asma na saúde pública.

Apesar do mecanismo de recrutamento desta célula para o sítio da inflamação ainda necessitar de melhor entendimento, é sabido que a eotaxina mostra-se como um fator fundamental para o acúmulo de eosinófilos no tecido afetado. A eotaxina é considerada o mediador de maior seletividade no recrutamento de eosinófilos, e que sua síntese/expressão ocorre antecipadamente à chegada de eosinófilos no tecido, o que significa que sua detecção precoce no tecido revela a chegada posterior de eosinófilos. Portanto, a eotaxina mostra-se como um alvo de grande relevância para detecção precoce de eosinófilos em reações inflamatórias de origem alérgica.

EQUIPAMENTO E REAGENTES

- Erlenmeyer
- Balança
- Pipeta
- Agitador magnético ou mecânico
- Manta de aquecimento
- Termômetro
- $\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Ácido cloroáutico)

- NaBH_4 (Boroidreto de sódio)
- $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ (Citrato de sódio)
- HCl (Ácido clorídrico)
- HNO_3 (Ácido nítrico)
- Água deionizada

PROCEDIMENTO

As NPAus coloidais foram sintetizadas seguindo o procedimento de (JIN , KANG , *et al.*, 2001). Antes de começar a síntese, toda as vidrarias foram limpas em um banho contendo uma solução HCl/HNO_3 preparada na proporção de (3:1) e em seguida lavadas em água deionizada várias vezes, antes de utiliza-las.

Antes de realizar a síntese foi preparada uma solução de ouro do ácido cloroáutico ($\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich), 1 g de $\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ foi adicionado em 100 ml água deionizada. Dessa solução de ouro, 1 ml foi adicionado em 100 ml de água deionizada e mantido por agitação por 10 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 ml de 1% (w/v) de citrato de sódio (Sigma-Aldrich) e após 1 minuto adicionou 1 ml da solução de 0.075% (w/v) de NaBH_4 (Sigma-Aldrich) e mais 1% (w/v) de citrato de sódio. A solução foi agitada durante 5 minutos e depois resfriada a 4° C.

5.3.3 Preparação dos substratos de quartzo

EQUIPAMENTO E REAGENTES

- Erlenmeyer
- Balança
- Pipeta
- Agitador magnético ou mecânico
- Manta de aquecimento
- Termômetro
- NaOH (Hidróxido de sódio)
- H₂O₂ (Peróxido de hidrogênio)
- NH₄OH (Hidróxido de amônio)
- HCl (Ácido clorídrico)
- HNO₃ (Ácido nítrico)
- CH₄O (Metanol)
- ((3-mercaptopropil) metiltrietoxissilano)
- Água deionizada
- Thiol 6 MHA

Os substratos de quartzo foram limpos imergindo-os em uma solução de NaOH à 2 M durante 1 h, seguido por 7 min de segunda solução com uma mistura de 1:1:5, respectivamente H₂O₂ (30% v/v), NH₄OH (25% v/v) e água deionizada à 80-90 °C. Esse procedimento garantiu uma camada de óxidos. Depois de limpos, os substratos de quartzo foram imersos em uma solução contendo ((3-mercaptopropil) metiltrietoxissilano) (Sigma-Aldrich), dissolvido em 95:5 (v/v) metanol/água a mistura a 2% (v/v) durante 72 horas.

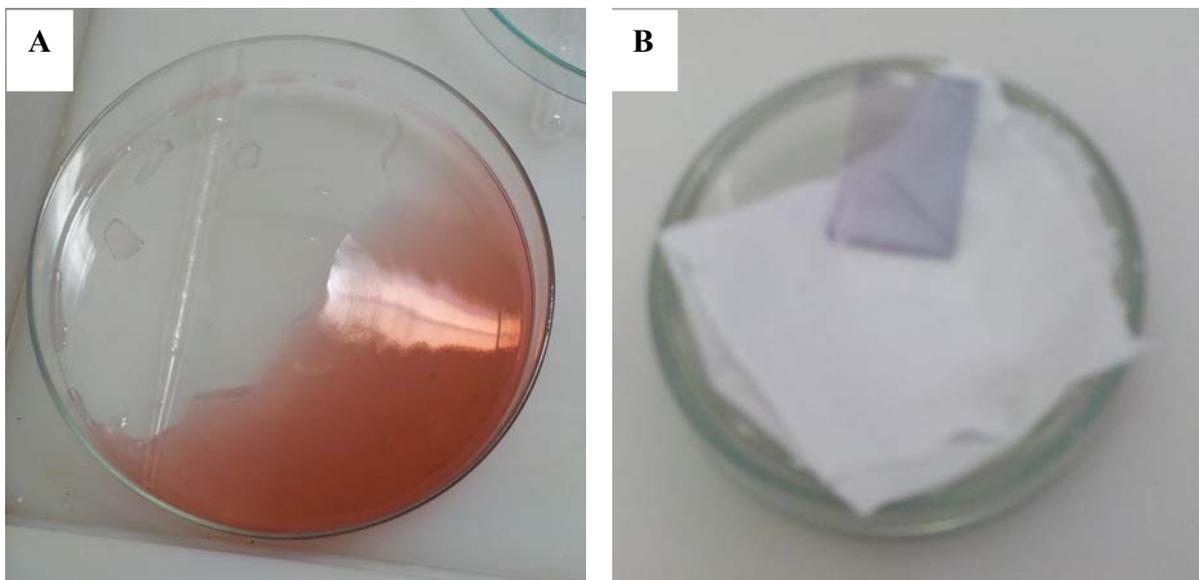
Em seguida, os substratos foram lavados com metanol e desidratados com nitrogênio, e depois secos em uma estufa de secagem por 10 minutos a 105 °C. As amostras de quartzo com 3-mercaptopropil-metiltrietoxissilano foram imersas na solução de NPAus, para formar uma monocamada de NPAus durante toda a noite. Ao fim, os substratos foram imersos em

uma mistura aquosa de 0,4 mM de cloridrato de hidroxilamina e uma solução a 0,1% (w/v) ($\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) Figura (A).

Preparação da monocamada de thiol.

Os detalhes experimentais sobre a deposição das monocamadas de thiol 6 MHA sobre NPaus em substratos revestidos, descritos em (FREDERIX, et al., 2003).

Figura 12 - Solução de Nanopartículas de Ouro figura A, Substrato com monocamada de NPau com thiol 6 MHA figura B



Fonte: (Autor, 2015)

5.4 Medidas de espectrofotometria óptica UV-Vis

As medidas de absorção óptica foram utilizadas para avaliar a qualidade das amostras sintetizadas, ou seja, se houve inicialmente a formação de NPs e também para acompanhar possíveis mudanças de forma e tamanho durante a síntese. Neste estudo, os espectros foram registrados em um espectrofotômetro UV-Vis-NIR (UV-3600 Shimadzu) projetado para a medição de amostras líquidas. Este equipamento possui três detectores e um monocromador de desempenho duplo para garantir alta sensibilidade, ruído reduzido e baixa dispersão de luz.

Logo, após a síntese os coloides foram inseridos em cubetas de quartzo ultra pura da Hellma com 1 cm de caminho óptico. As medidas varreram o intervalo de 200-800 nm em comprimento de onda. Cobrindo toda a região de interesse na observação das nanopartículas de ouro e prata.

5.5 Medidas de microscopia eletrônica de transmissão

Análises de MET de alta resolução (HRTEM) foram obtidas no Centro de Microscopia do Nordeste (CETENE) utilizando usando o Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI TECNAI 20. A análise qualitativa foi realizada por um espectrômetro de dispersão de energia (EDS) acoplado ao Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI TECNAI 20 operando a 200 kV.

A concentração da solução influencia fortemente o número de camadas de nanopartículas depositadas e deve ser otimizada para que se obtenham imagens que permitam a determinação da distribuição de tamanhos. As suspensões de nanopartículas de prata analisadas em óleo de copaíba foram diluídas no respectivo líquido (1/10) e a nova solução foi colocada sob uma grade de cobre (300 mesh) recoberto com carbono e cuidadosamente raspados horizontalmente (em relação a grade) para que houvesse a formação de um filme extremamente fino, possibilitando uma melhor visualização no microscópio. Já as nanopartículas de ouro em água foram colocadas sob grade de cobre direto utilizando o mesmo método anterior citado.

Após a mensuração das nanopartículas em diferentes campos de observação, as imagens foram usadas para determinação do diâmetro médio das nanopartículas. A distribuição de tamanho das nanopartículas foi determinada pelo negativo original, digitalizado e expandido para 470 pixel/cm para uma resolução e medida mais precisa. O histograma de distribuição de tamanho foi obtido pela contagem de aproximadamente 300 partículas. O diâmetro das partículas nas micrografias foi medido usando o programa Photoshop.

5.6 Medidas de microscopia força atômica

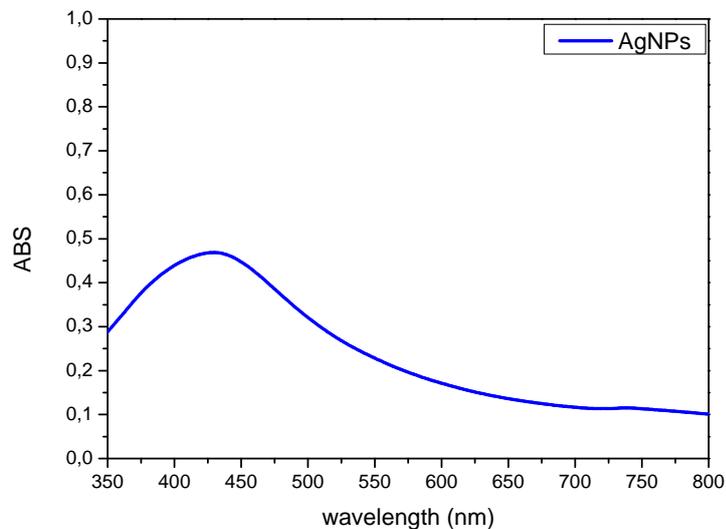
As imagens de AFM são obtidas pela varredura da superfície da amostra pela ponteira mantendo-se fixa a força de interação ponta-amostra. A manutenção do nível de força entre a superfície da amostra e a ponteira é obtida por meio do uso da realimentação eletrônica (PID) que corrige continuamente a posição vertical do cantilever (em relação à amostra) como uma variação do sinal de entrada no sistema de realimentação devido à variação topográfica da amostra. A topografia é reconstruída a partir do movimento vertical usado para manter o nível de ajuste da força fixo. Os diferentes modos para obtenção de imagens disponíveis dependem do sinal de entrada usados no circuito de realimentação para controlar a posição vertical da ponteira.

Neste trabalho, as imagens de AFM foram realizadas usando um microscópio de força atômica MV4000TM (Nanonics, Israel), em modo intermitente e usando uma sonda de vidro em um “Tuning Fork” com uma ponteira de 10 nm de diâmetro, frequência de ressonância de 37.5kHz e fator de qualidade 1870. As imagens mostradas na figura 20 e 21 possuem uma área de $1\mu\text{m}\times 1\mu\text{m}$ e resolução de 256×256 pontos. O sistema foi acusticamente isolado para reduzir as interferências de ruído ambiente durante as medidas. Todas as imagens foram realizadas em ar em condição ambiente com temperatura variando entre 23°C e 25°C e umidade relativa variando de 35% a 45%.

6 RESULTADOS

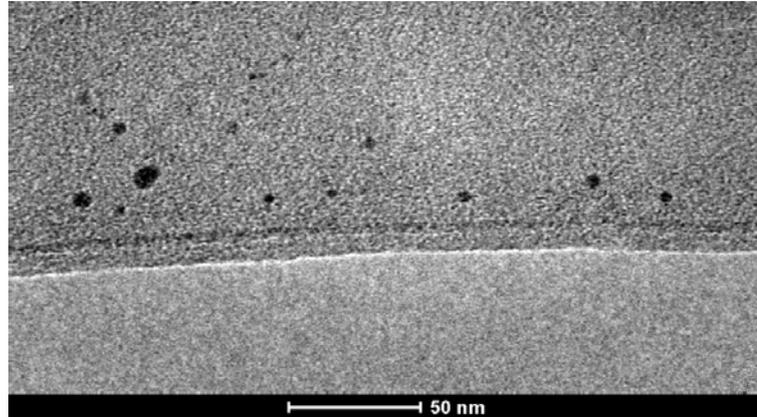
Após a síntese das nanopartículas, a caracterização física das amostras foi realizada nas dependências do Grupo OPTMA utilizando espectroscopia de UV-VIS, quanto no Centro de Tecnologia do Nordeste (CTENE) utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão. As NPs Ag apresentaram na região visível do espectro uma banda com pico máxima de absorção de 420 nm, devido o efeito de ressonância de plasmon de superfície (Figura 13). As imagens de MET (Figura 14 e 15) mostram a dispersão das NPs Ag esféricas e a figura 16 mostra a distribuição de tamanho em torno de 7 nm.

Figura 13 - Gráficos de Absorção das NPAs em água, mostra ressonância de plasmo da prata em torno de 420nm



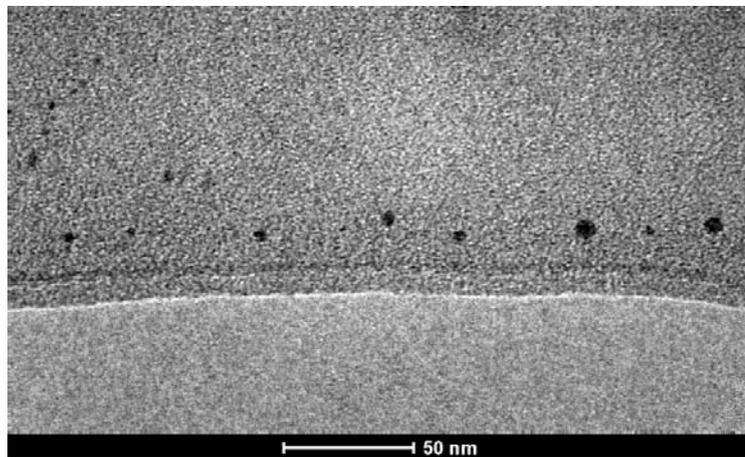
Fonte: (Autor, 2015)

Figura 14 - Imagens de HRTEM de NPAGs dispersas em óleo de copaíba.



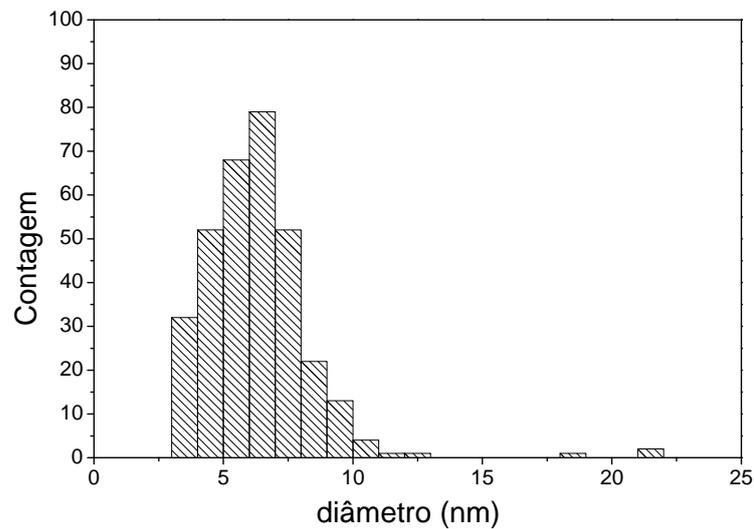
Fonte: (Autor, 2015)

Figura 15 - Imagens de HRTEM de NPAGs dispersas em óleo de copaíba.



Fonte: (Autor, 2015)

Figura 16 - Distribuição de tamanho da NPAs realizado pela contagem do diâmetro de 100 partículas selecionadas aleatoriamente.



Fonte: (Autor, 2015)

6.1 Efeitos sobre a cicatrização de feridas infectadas

O advento da nanotecnologia permitiu a utilização de partículas em nanoescalas, o que criou novos horizontes terapêuticos, possibilitando a incorporação destas nanopartículas, sobretudo as de prata – cujo comprovado efeito bactericida já foi descrito em diferentes tipos de matriz, o que amplia suas aplicações.

Entretanto, as propriedades biológicas de colóides resultantes da incorporação de nanopartículas metálicas em óleos minerais ainda não foram descritas. Sendo assim, nesta etapa do trabalho avaliamos o efeito do óleo de copaíba associado à nanopartículas de prata em modelos murinos de ferida cutânea infectada.

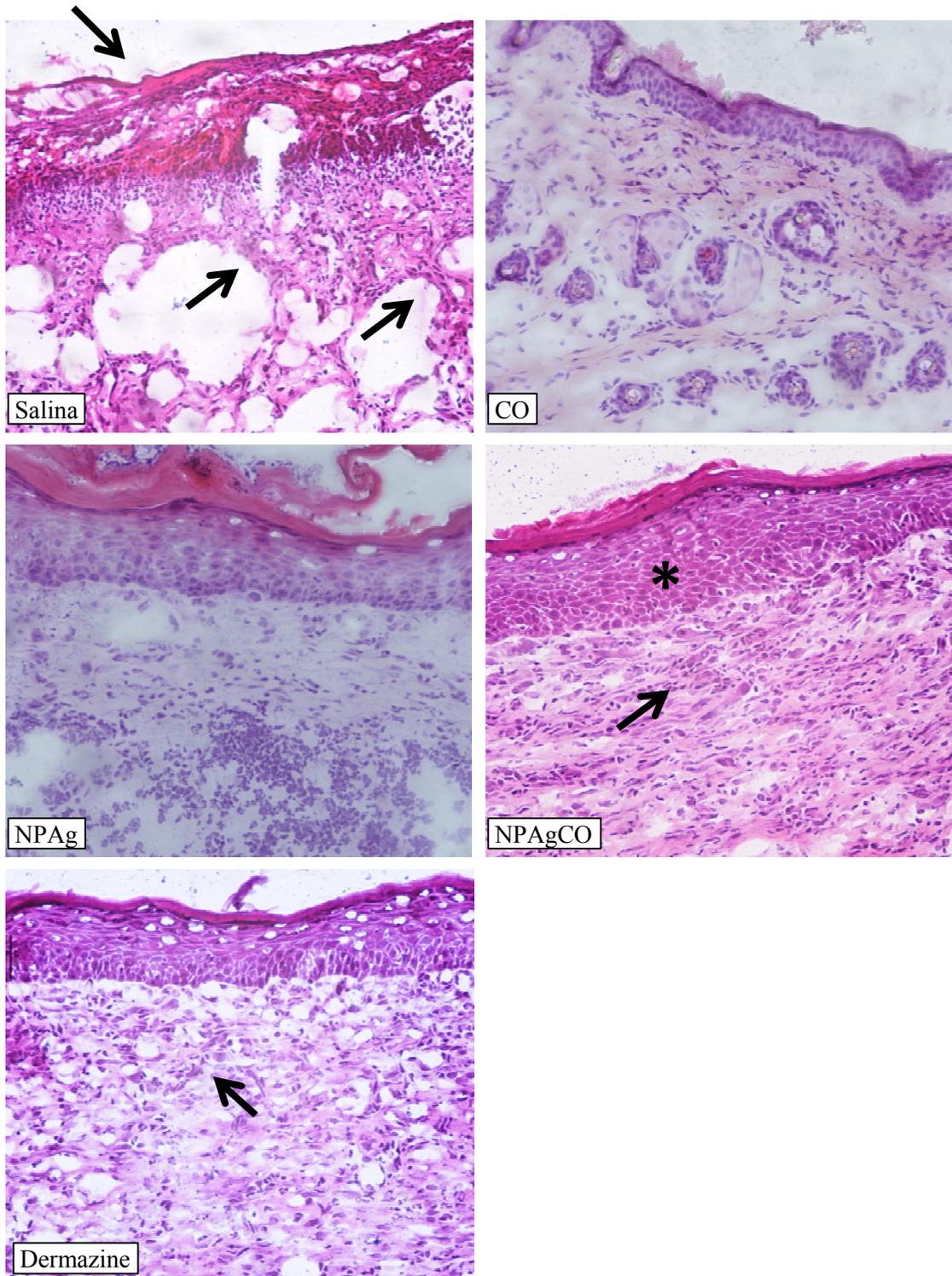
Análise histológica da ferida possibilitou avaliar a qualidade do processo de cicatrização. As figuras 17 e 18 mostram a histologia das feridas após o tratamento com

solução salina, óleo de copaíba (CO), nanopartículas de prata (NPAg), nanopartículas de prata em copaíba (NPAgCO) ou Dermazine no 9º dia após a lesão.

A análise histológica de feridas tratadas com solução salina (NaCl, 0,9%) demonstra uma epiderme totalmente desorganizada. Além disso, observa-se também uma menor epitelização, bem como uma menor deposição de tecido conjuntivo no grupo de animais tratados com salina (Figura 17 e 18). Áreas de degeneração tecidual, necrose e à persistência de exsudatos inflamatórios na derme superior foi observada, juntamente com uma perda da epiderme (setas). Em comparação, as feridas infectadas tratadas com CO ou NPAg mostrou um menor teor de áreas necróticas do que aqueles tratados com solução salina isolada (Figura 17 e 18).

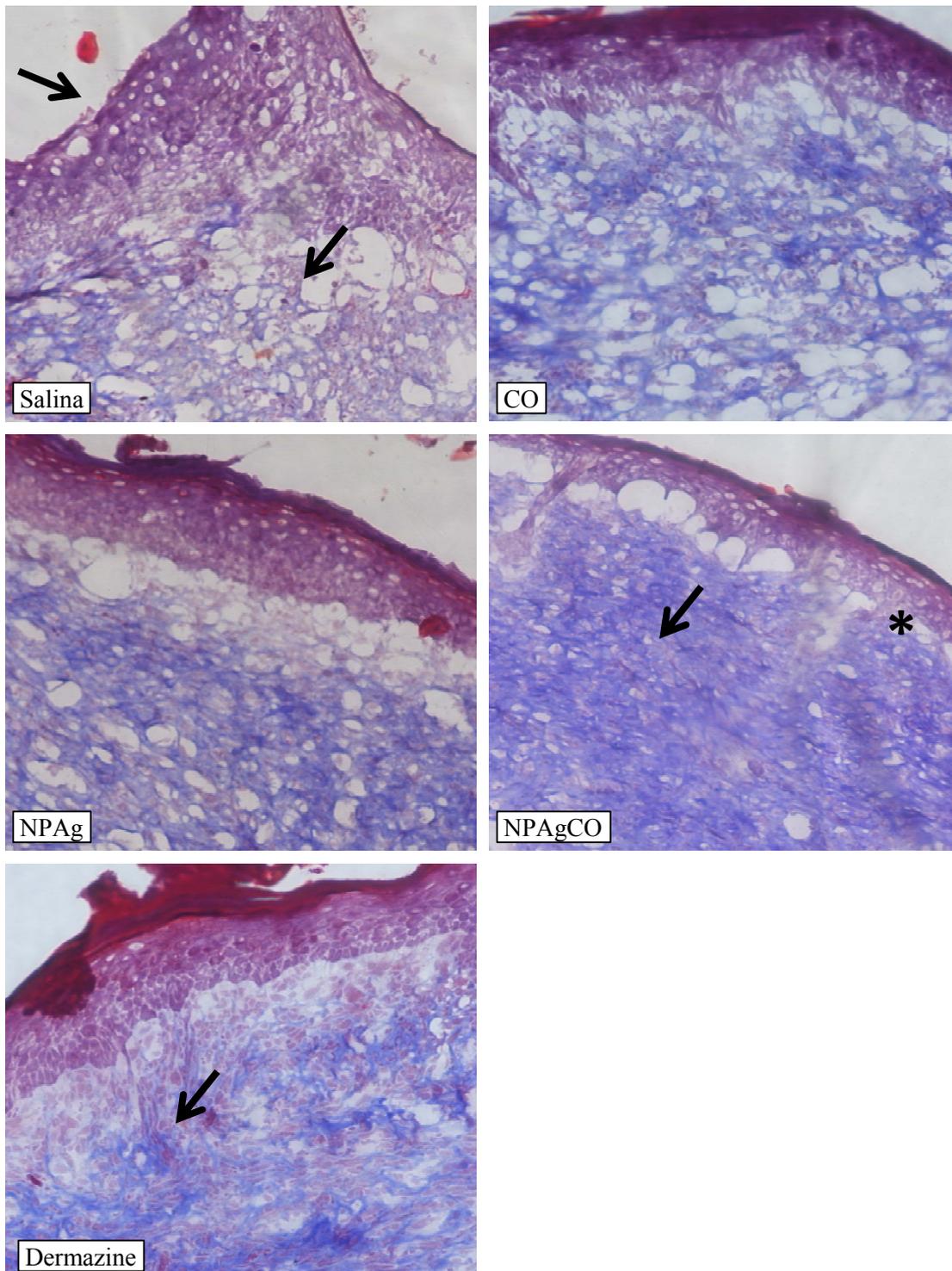
Os animais tratados com NPAgCO ou o medicamento de referência Dermazine®, por outro lado, mostrou atenuação na infiltração de células inflamatórias e da proliferação aumentada de fibroblastos (setas). No tratamento com NPAgCO houve uma re-epitelização completa, resultando em uma epiderme bem organizado (*), comparável à da pele normal adjacente, que não estava envolvida na geração de feridas e cicatrização (Figura 17 e 18). As feridas tratadas com NPAgCO demonstraram uma formação melhorada da epiderme e a deposição de tecido conjuntivo, quando comparado com os outros grupos (Figura 17 e 18).

Figura 17 - Análise histológica no 10º dia de experimento da remodelação da epiderme/derme dos animais tratados com veículo (salina); com óleo de copaíba, controle negativo; com a associação entre óleo de copaíba e nanopartículas de prata (NPAgCO); e com o fármaco de referência, Dermazine. Secções de pele coradas com hematoxilina e eosina. Aumento de 10x.



Fonte: (Autor, 2015).

Figura 18 - análise histopatológica no 10º dia de experimento da deposição de colágeno nos animais tratados com veículo (salina); com óleo de copaíba; com a associação entre óleo de copaíba e nanopartículas de prata (NPAg+OC); e com o fármaco de referência, Dermazine. Secções de pele coradas com tricrômio de Masson, com propriedade de corar em azul as fibras colágenas. Aumento de 20x.



Fonte: (Autor, 2015)

Os resultados da análise histológica estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito do tratamento com colóide no modelo de ferida infectada.

Tratamento	Parâmetro			
	Área da ferida (cm ²) em dias			
	3	6	9	
Salina	1,59 ± 0,02	1,38 ± 0,03	1,17 ± 0,01	17,50 ± 0,50
CO	1,61 ± 0,01	1,27 ± 0,02	0,90 ± 0,03	17,50 ± 0,50
NPAg	1,58 ± 0,07	1,22 ± 0,02 **	0,92 ± 0,02 ***	17,00 ± 0,00
NPAgCO	1,44 ± 0,02 **	1,00 ± 0,02 *** a	0,44 ± 0,03 *** b	12,50 ± 0,50
Dermazine®	1,53 ± 0,05	1,18 ± 0,04 ***	0,71 ± 0,04 ***	15,00 ± 0,00

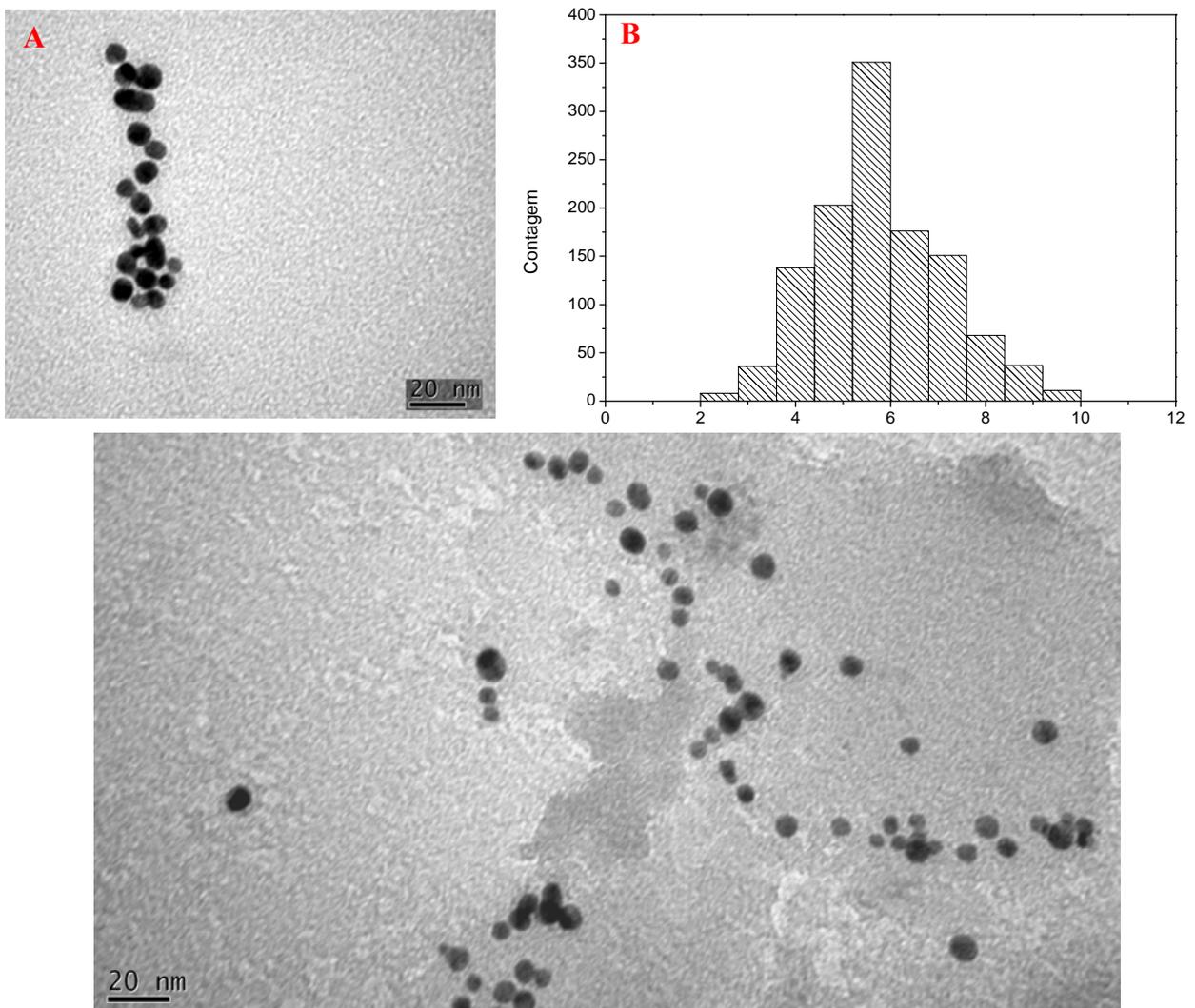
Fonte: (Autor, 2015)

Os valores representam a média ± S.E.M. ($n = 4$). CO = óleo de copaíba, NPAg = nanopartículas de prata e NPAgCO = nanopartículas de prata em óleo de copaíba. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ em comparação com o respectivo tratamento salino. ^a $P < 0,001$ e ^b $P < 0,01$ em comparação com animais tratados com Dermazine ®

6.2 Efeitos sobre Biossensores

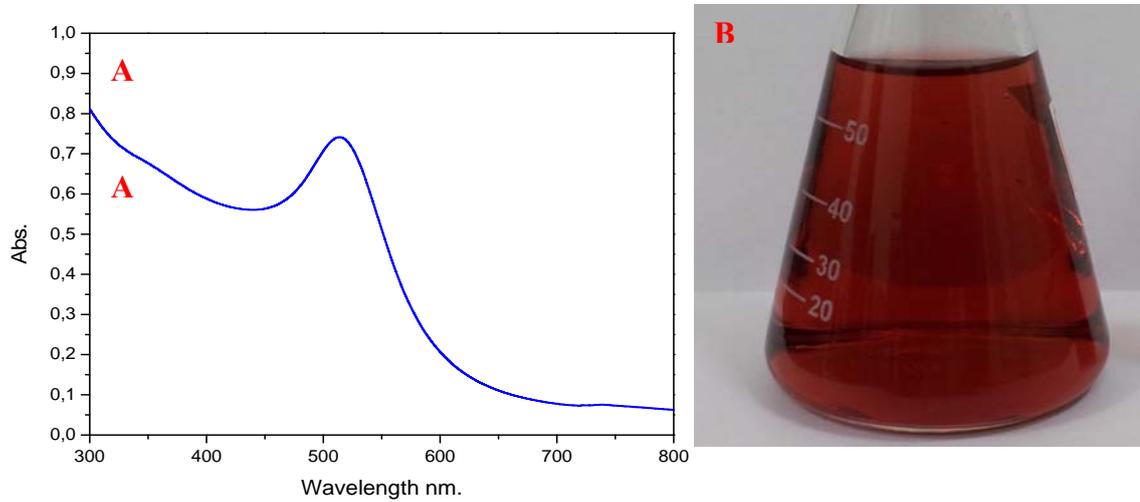
As imagens de MET (Figura 19A e 19C) mostram a dispersão das NPs Ag esféricas e a figura 19B mostra a distribuição de tamanho em torno de 5 a 6 nm. As NPAu apresentaram na região visível do espectro uma banda com pico máxima de absorção de 515 nm, devido o efeito de ressonância de plasmon de superfície (Figura 20A).

Figura 19 - Distribuição de tamanho da NPAu realizado pela contagem do diâmetro de 350 partículas (Figura B) e imagens de HRTEM de NPAus dispersas em água (Figuras A e C)



Fonte: (Autor, 2015)

Figura 20 - Gráficos de Absorção das NPAus em água, mostra ressonância de plasmon do ouro (Figura A) e solução de NPAus utilizada para realizar filmes de monocamadas (Figura B)

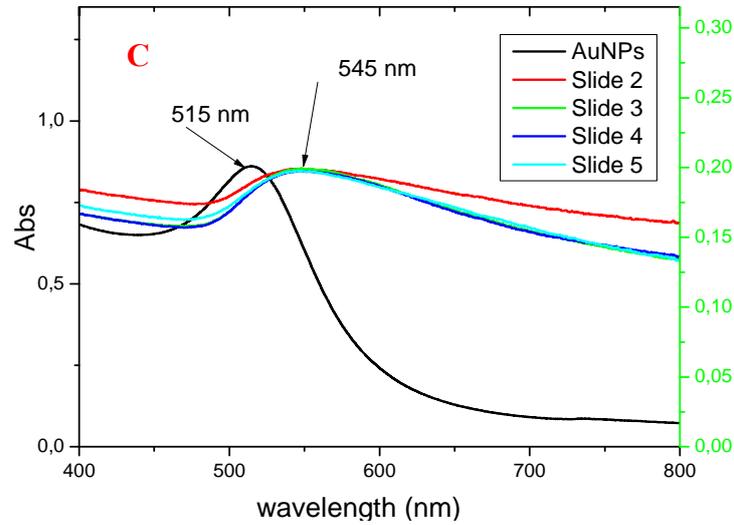


Fonte: (Autor, 2015)

Figura 21 - Monocamada de ouro nanoparticulado sobre uma lâmina de vidro (Figura A e B) e o gráfico apresentando a ressonância de plasmão do ouro em solução e sobre a lâmina de vidro (Figura C)



Fonte: (Autor, 2015)



Depois de limpos os substratos de quartz, eram mergulhados a noite toda no adesivo orgânico 3-mercaptopropi-metiltriétoxissilano, no dia seguintes limpos com Metanol para retirar o excesso de adesivo. Na sequência os substratos foram mergulhados na solução de NPAus como mostrado nas figuras 12A e 12B. Nas figuras 20A e 20B podemos observar os substratos revestidos com monocamadas de NPAus, a cor pode mudar da cor rosa para violeta e para azul, dependendo do tempo de contato entre substrato e solução de NPAus e, por conseguinte, a espessura da película das partículas. Frederix e colaboradores (2003) utilizaram o método de galvanização (Eletrodeposição) para que tenha monocamadas homogêneas e controle da espessura da monocamada de nanopartículas de ouro.

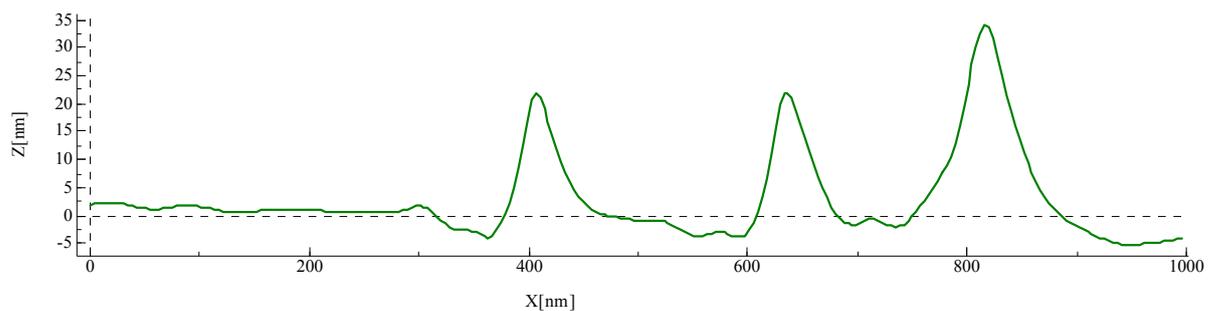
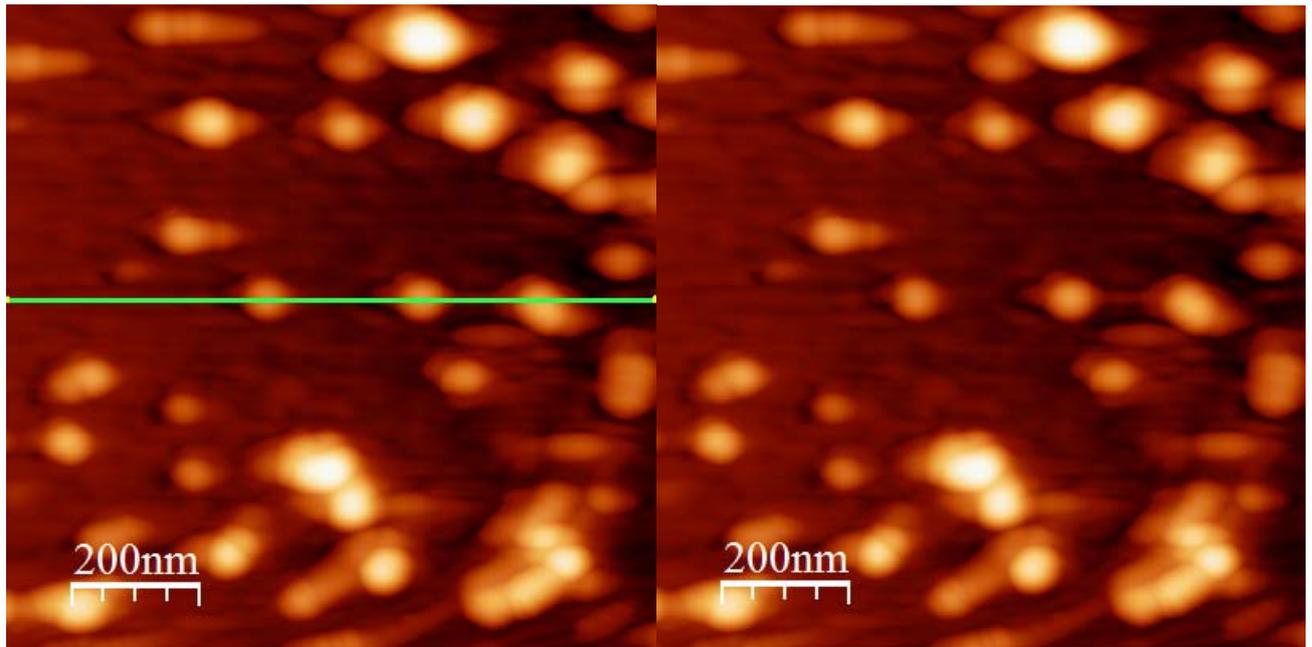
Podemos observar um deslocamento da banda de absorção de 515 nm (NPAus) para 545 nm filme monocamadas (30 min imersos na solução de NPAus). As nanopartículas depositadas sobre o quartz com 3-mercaptopropi-metiltriétoxissilano foram comparadas com as partículas em solução como mostrado no gráfico na figura 20C. Essa mudança já era esperada, por que é dependente do tamanho e forma das partículas e de como elas ficaram dispersas ao longo do substrato e a distância interpartículas dos clusters ou/ ilhas ao logo do substrato de quartz.

A distribuição de tamanho das partículas de ouro na superfície não é uniforme como mostrado nas figuras 22A, 22B, 23A, 23B e 23C. Essas não uniformidade em relação aos

achados de Frederix e colaboradores (2003) relatam a necessidade de utilizar um processo de galvanização para obter superfícies com maior homogeneidade.

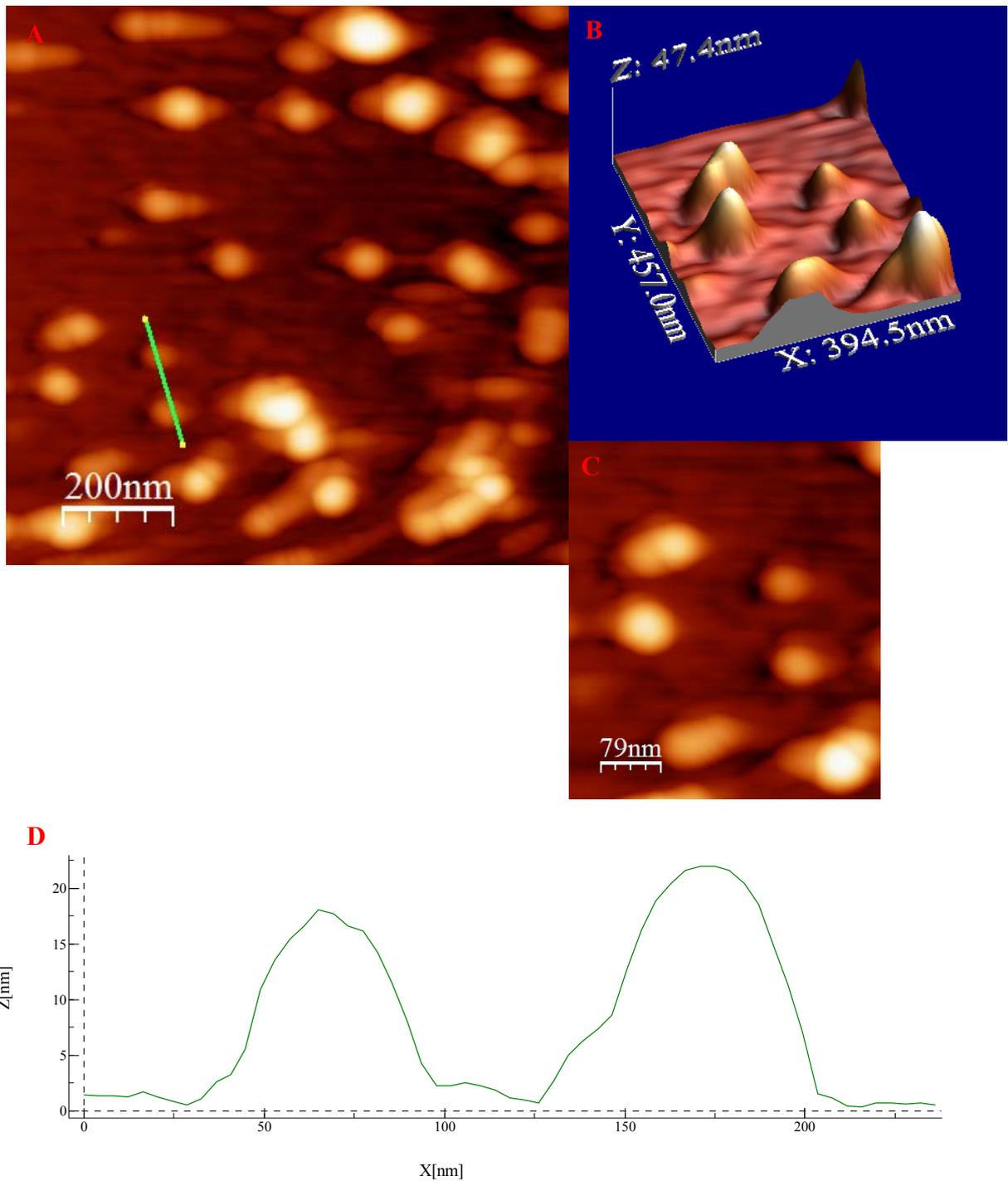
Na figura 22C observamos altura desses “clusters” em torno de 20 a 25 nm.

Figura 22 - Imagens de Microscopia de Força Atômica mostrando a distribuição (Figura A e B) e o tamanho (Figura C) do “cluster” de ouro sobre o substrato de vidro.



Fonte: (Autor, 2015)

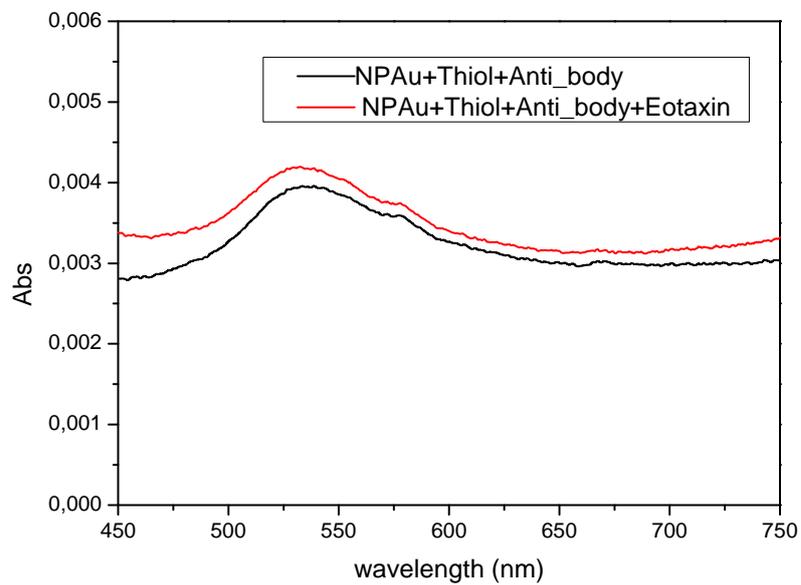
Figura 23 - Imagens de Microscopia de Força Atômica mostrando a distribuição em monocamadas (Figura A e C), a altura (Figura B) e o tamanho (Figura D) dos “clusters” de ouro sobre o substrato.



Fonte: (Autor, 2015)

Na figura 24 nota-se o reconhecimento molecular de anti-eotaxina e eotaxina podem ser detectados como uma mudança da ressonância plasmon de superfície e uma mudança na frequência de ressonância, observamos um acréscimo na absorbância em torno de 535 nm.

Figura 24 - Espectro de absorção das NPAus na revestida com anti-eotaxina a anti-eotaxina conjugada com o antígeno (eotaxin).



Fonte: (Autor, 2015).

7 DISCUSSÃO

Materiais em escala nanométrica têm recebido bastante atenção, pois apresentam propriedades únicas e diferentes tanto do átomo isolado como do material convencional (bulk). Seguindo neste avanço tecnológico as nanopartículas metálicas estão sendo em diversos campos do conhecimento, incluindo a química, física, engenharia, biologia e medicina. Como consequência destes avanços, ações de P&D (pesquisas/desenvolvimento) com nanopartículas metálicas têm permitido aplicações para a área biomédica incluindo diagnósticos e tratamentos inovadores. Buscando inserção mundial neste ambiente científico, nos últimos vinte anos, vários grupos de pesquisa pelo Brasil vêm desenvolvendo ações para dominar as 3 diferentes dimensões (síntese, caracterização e aplicação) que compreendem o universo das nanopartículas.

Na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), na última década, buscou-se agregar um grupo de pesquisadores com competências e habilidades para realizar estudos na área de síntese, caracterização e aplicações de nanopartículas metálicas para biologia e engenharia. Neste grupo, buscamos estabelecer, *in loco*, infraestrutura e conhecimento capazes de permitir dominar as diferentes dimensões da nanotecnologia e, com isso, avançar no conhecimento. Portanto, considerando este racional, no presente trabalho buscou-se estabelecer na UFAL a síntese, caracterização e aplicações de nanopartículas metálicas em diferentes áreas da biologia.

Inicialmente, para atender a dimensão de síntese, a produção de nanopartícula metálica de prata (Ag) e ouro (Au) foi realizada utilizando-se o método de redução química e deposição física (*sputtering*), respectivamente. Em seguida, as nanopartículas foram caracterizadas utilizando-se diferentes métodos físicos, incluindo Microscopia Eletrônica de Transmissão de alta resolução (HRTEM), Espectroscopia Ultravioleta Visível (UV-Vis) e Microscopia de Força Atômica (AFM). Por fim, as nanopartículas sintetizadas na UFAL foram propostas para serem aplicadas em duas áreas do conhecimento biológico, a terapêutica e o diagnóstico. Neste sentido, a nanopartícula de prata foi utilizada para obtenção de uma composição farmacêutica utilizando óleo de copaíba, cujo propósito de utilização desta mistura foi à obtenção de um agente com potencial cicatrizante para feridas cutâneas infectadas. No caso das nanopartículas de ouro, o propósito foi o desenvolvimento de um biossensor capaz de identificar um mediador inflamatório chave capaz de prever o acúmulo de eosinófilo no tecido inflamado, a eotaxina.

Na literatura podemos encontrar uma vasta literatura científica sobre vários tipos de sínteses capazes de controle o tamanho, e até mesmo a estabilização por longos períodos das NPAGs. Nós utilizamos a metodologia da redução utilizando citrato de sódio com adição de borohidreto de sódio. O borohidreto de sódio é adicionado em uma pequena fração junto com citrato de sódio. Visto que na literatura é reportado como um método de fácil execução, baixo custo, e ainda capaz de estabilizar a solução coloidal evitando a agregação das nanopartículas de prata (KHEYBARI, et al., 2010). Uma das grandes dificuldades reportadas na literatura é a reprodutibilidade de síntese das NPAGs (CATALINA; ERIC, 2010). Após várias tentativas de sínteses chegamos a um protocolo ideal capaz de garantir o tamanho e tempo ideal para melhor estabilização das nanoestruturas. Para acompanhar esta estabilidade, mantivemos um monitoramento das propriedades ópticas com ao auxílio da espectroscopia de UV-Vis. Em sintonia com nossos achados, estudos de prévios, empregando um protocolo similar ao utilizado neste estudo, reportam que as NPAGs são capazes de serem mantidas sem agregação por longos períodos de armazenagem (KHEYBARI, et al., 2010). Vantagem de utilizar esse método é o tempo de estabilização da NPAGs, observou-se por um período de aproximadamente 7 meses que não havia agregação das nanopartículas de prata.

Para melhor domínio sobre as aplicações biológicas das nanopartículas, torna-se necessário ampliar o conhecimento sobre as características físicas desta nanoestrutura. Logo, espera-se um melhor entendimento sobre as potenciais interações com os sistemas biológicos. Neste sentido, a microscopia eletrônica de transmissão e a espectroscopia de UV-VIS mostram-se como ferramentas importantes para determinar a distribuição, diâmetro e morfologia das nanopartículas. Aqui, a ressonância de plasmon de superfície na região de 420 nm confirmou a natureza química das nanopartículas de prata, e a microscopia eletrônica revelou a forma esférica e o diâmetro médio de 7 nm, outra característica observada que as nanopartículas de prata estavam bem dispersas.

Diversos estudos descrevem as propriedades biológicas das nanopartículas de prata e suas variadas aplicações biomédicas, principalmente devido a relevante papel bactericidas e anti-inflamatório, essenciais para a melhoria no processo de cicatrização de feridas, sendo atualmente explorada no desenvolvimento de fármacos mais eficientes que aceleram aumento da taxa de epitelização em feridas infectadas (KERMANIZADEH et al., 2013; RIGO et al., 2013; CHALOUPKA et al., 2010). No mesmo racional, o óleo de copaíba é descrito com

propriedades anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante (BASILE , et al., 1988; BRITO, et al., 1999).

Focados na aplicação das nanopartículas de prata sintetizadas e caracterizadas neste trabalho, verificamos que animais com feridas cutâneas infectadas com *Staphylococcus aureus*, exposta a uma emulsão composta por nanopartículas de prata em óleo de copaíba exibiram uma redução no infiltrado de células inflamatórias, além de uma proliferação aumentada de fibroblastos e uma re-epitelização completa com a formação de uma epiderme bem organizada quando comparada ao controle.

A atividade da emulsão composta por NPAgCO apresentou-se como um promissor cicatrizante por potencializar as características inerente a ação de ambos os componentes no processo de cicatrização de feridas cutâneas infectadas com *S. aureus*, principal agente infeccioso da pele e associadas com resistência a antibióticos.

Corroborando com os resultados do presente estudo, Krychowiak e col. (2014) demonstraram que a combinação de nanopartícula de prata com extrato de *Drosera binata* e o seu composto isolado (3-chloroplumbagin) atuam como propriedades bactericidas em *S. aureus* resistentes a antibióticos. As nanopartículas de prata podem contribuir para o desenvolvimento de novos materiais e substâncias com ação antimicrobiana e que contribuam na para o processo de cicatrização. Chenwen e colaboradores (2013) verificaram em análises *in vivo* e *in vitro* que curativos biativos desenvolvidos a partir da associação do polímero (álcool polivinílico) com nanofibras de prata não apresentaram efeito tóxica e boa biocompatibilidade, demonstrando excelente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *E. coli* gram-negativo.

A literatura científica reporta vários tipos de sínteses capazes de controle o tamanho, e até mesmo a estabilização por longos períodos das NPs. Nós utilizamos a metodologia de redução por citrato de sódio, visto que na literatura é reportado como um método de fácil execução, baixo custo, e ainda capaz de estabilizar a solução coloidal evitando a agregação das nanopartículas de ouro (JIN KANG, et al., 2001).

Uma das grandes dificuldades reportadas na literatura é a reprodutibilidade de síntese das NPAus (FREDERIX, et al., 2003). Após várias tentativas de sínteses chegamos a um protocolo ideal capaz de garantir o tamanho e tempo ideal para melhor estabilização (aproximadamente 6 meses) das nanoestruturas. Para acompanhar esta estabilidade, mantivemos um monitoramento das propriedades ópticas com ao auxílio da espectroscopia de

UV-Vis. Em sintonia com nossos achados, estudos de prévios, empregando um protocolo similar ao utilizado neste estudo, reportam que as NPAus são capazes de serem mantidas sem agregação por longos períodos de armazenagem (JIN KANG , et al., 2001).

Para melhor domínio sobre as aplicações biomédicas das nanopartículas, torna-se necessário ampliar o conhecimento sobre as características físicas desta nanoestrutura. Logo, espera-se um melhor entendimento sobre as potenciais interações com os sistemas biológicos. Neste sentido, a microscopia eletrônica de transmissão e a espectroscopia de UV-Vis mostram-se como ferramentas importantes para determinar a distribuição, diâmetro e morfologia das nanopartículas. Aqui, a ressonância de plasmon de superfície na região de 515 nm confirmou a natureza química das nanopartículas de ouro, e a microscopia eletrônica revelou a forma esférica e o diâmetro médio de 5-6 nm.

Sensores que utilizam absorção da luz de nanopartículas de ouro depositadas sobre substrato de vidro e utilizam a característica a ressonância de plamons superfície são amplamente estudados devido a sua afinidade e fácil manufatura (FREDERIX , et al., 2003). Tais sensores demonstraram uma ressonância de plamons de superfície susceptível para adsorver monocamadas de thiol, e, com isso, ampliar suas aplicações como biosensores devido a diversidade de componentes de captura que podem ser inseridos nas terminações thiols. Em alguns casos, a absorbância da monocamada de NPAus ligadas ao quartzo tem sensibilidade maior a alterações nas propriedades dielétricas após ligação de biomoléculas, em comparação com ressonância de plasmon de superfície de uma única NPAus.

Frederix e colaboradores (2003) elucidam um problema comum no que diz respeito à deposição NPAus em monocamadas sobre substrato de quartz utilizando adesivos a base por exemplo, Cr ou Ti, que são conhecidos por bloquear os fenômenos de ressonância de plasmon de superfície e por alargar a banda de ressonância de plasmon, para evitar esse mesmo problemas utilizamos um adesivo orgânico 3-mercaptopropi-metiltriétoxisilano.

Finalmente, foi montando um biosensor experimental para realizar um experimento simples para mostrar o potencial deste método para detecção e aplicação real de um biosensor. O método se revelou versátil o que permite aplicações nas fases líquida e gasosa. Além disso, esta nova abordagem é promissora como uma alternativa fácil e de baixo custo para as técnicas biosensoriamento convencionais.

8 CONCLUSÕES

Com este estudo foi possível padronizar metodologias de síntese e caracterização de nanopartículas metálicas na UFAL, bem como propor aplicações de relevância para desafios na área biológica. Além disso pode ser concluído que:

- ✓ As NPs Ag sintetizadas e utilizadas para aplicação no ensaio biológico de cicatrização apresentaram forma esférica e diâmetro médio de 7 nm. Cabe destacar que estas nanoestruturas em solução coloidal apresentaram-se estáveis à temperatura ambiente por aproximadamente 7 meses.
- ✓ As feridas tratadas com NPAgCO demonstraram uma formação melhorada da epiderme e a deposição de tecido conjuntivo, quando comparado com CO, NanoAg e Dermazine®. Dessa maneira, quando as nanopartículas de prata são associadas com compostos naturais com capacidade de cura, como o óleo de copaíba, surge uma classe inovadora de medicamentos com potencial para a cura de feridas cutâneas infectadas por bactérias.
- ✓ As NPAs sintetizadas e utilizadas na confecção de um biossensor apresentaram forma esférica com diâmetro médio de 5 a 6 nm, e mostraram-se estáveis à temperatura ambiente por aproximadamente 6 meses.
- ✓ Este estudo revela, pela primeira vez, o efeito das nanopartículas de prata em melhorar os efeitos cicatrizantes do óleo de copaíba quando aplicado em feridas infectadas com *S. aureus*.
- ✓ Estudos de caracterização física revelaram que a distribuição de tamanho das partículas de ouro na superfície não foram uniformes.

- ✓ O biossensor idealizado e confeccionado neste estudo utilizando nanopartículas de ouro revelou alterações na intensidade do comprimento de onda da ressonância de plasmon demonstrando seu funcionamento.

REFERÊNCIAS

- ANKER, J. N. et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature Materials** , v. 7, p. 442-453, 2008.
- AUKHIL,. Biology of wound healing. **Periodontology** , v. 22, p. 44-50, 2000.
- BASILE , A. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from brasilian copaífera.. **J. Ethnopharm** , v. 22, p. 101-9, 1988..
- BERG , M.; SILVA, M. Levantamento preliminar das plantas utilizadas na medicina popular do estado do Mato Grosso do Sul. **Supl Acta Amazônica**, v. 18, p. 23-35, 1988.
- BISWAS, A. et al. Advances in top–down and bottom–up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 170, p. 2–27, 2012.
- BLACKMAN, J. A. **Metallic Nanoparticles, Handbook of Metal Physics**. Amsterdam: Elsevier, v. 5, 2009.
- BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, ; SASSOLAS,. Immobilization Strategies to Develop Enzymatic Biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489-571, 2011.
- BORN, et al. The potential risks of nanomaterials: a reviewcarried out for ECETOC. **Fibre Toxicol**, v. 3, p. 11, 2006.
- BOUTONNET, ; KIZLING, ; STENIUS,. The preparation of monodisperse colloidal metal particles from microemulsions. **Colloids and Surfaces**, v. 5, p. 209–225, 1982.
- BRASIL. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 dez 2010. Seção 1, p. 99**. Portaria SAS/MS n° 709. [S.l.]. de 17 de dezembro de 2010.
- BRENETON, J. Pharmacognosy phytochemistry medicinal plants.. **Paris: Lavoisier Publishing**, n. 2ed., p. 467-74, 1993.
- BRENNAN, ; HATZAKIS , N.; BRUST , M. Bionanoconjugation via click chemistry: the creation of functional hybrids of lipases and gold nanoparticles. **Bioconjug Chem.** , v. 17, p. 1373–1375, 2006.
- BRITO , N. et al. Aspectos microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. **Rev Par Med** , v. 13, p. 12-17, 1999.
- BURDA, C. et al. Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. **Chem. Rev.**, v. 105, p. 1025-1102, 2005.
- CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Wounds-a compendium of clinical research and practice**, v. 10, p. 12-32, 1998.

- CATALINA, M.-J.; ERIC , M. V. H. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **J Nanopart Res** , v. 12, p. 1531–1551, 2010.
- CHALOUKKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 580-588, 2010.
- CHEN, H. et al. Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold. **Langmuir**, v. 24, p. 5233-5237, 2008.
- CHIANG , C. et al. In vitro and in vivo evaluation of an ocular delivery system of 5-fluorouracil microspheres. **J Ocul Pharmacol Ther** , v. 17, p. 545-553, 2001.
- CHRAI , S. et al. Lachrymal and instilled fluid dynamics in rabbit eyes. **J Pharm Sci**, v. 62, p. 1112-1121, 1973.
- DAT, R. et al. Pulsed laser ablation synthesis and characterization of layered Pt/SrBi₂Ta₂O₉/Pt ferroelectric capacitors with practically no polarization fatigue. **Appl. Phys. Lett.**, v. 67, p. 572, 1995.
- DELONG, R. K. et al. Nanotechnology, Science and Applications Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and other biological macromolecules. **Nanotechnology, Science and Applications** , v. 3, p. 53–63, 2010.
- DIPIETRO , L.; BURNS , A. Wound healing: methods and protocols.. **New Jersey: Human Press**, v. 1, p. 38-46, 2003.
- DOWLING, A. et al. Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties. **Development of nanotechnologies. Mater. Today**, London, v. 7, p. 30–35, 2004.
- DUBOISAND , ; NUZZO ,. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces. **Annu Rev Phys Chem**, v. 43, p. 437–463., 1992.
- DURAN, N. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. **J Biomed Nanotechnol**, v. 3, p. 203–208, 2007.
- DWYER , I. The central american, west indian, and south american species of *Copaifera*. **Brittonia** , v. 7, p. 143-172, 1951.
- EATON, ; WEST,. **Atomic Force Microscopy**. First. ed. New York: Oxford University Press, v. 1, 2010.
- ELAISSARI, A. **Journal of Nanobiotechnology Applications of nanoparticles in biology and medicine**, 2008.
- ELBAKRY, A. et al. Layer-by-Layer Assembled Gold Nanoparticles for siRNA Delivery. **Nano Lett.**, v. 9, p. 2059–2064, 2009.
- FAN , F.; BARD, A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v. 96, p. 14222 –14227, 1999.

FOLLENWEIDER, L. M.; LAMBERTINO, A. Epidemiology of Asthma in the United States. **Nursing Clinics of North America**, v. 48, p. 1–10, 2013.

FONG, ; WOOD, F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 441–449, 2006.

FREDERIX , F. et al. Biosensing based on light absorption of nanoscaled gold and silver particles. **Anal Chem.**, v. 24, p. 6894-900., 2003.

FREUND, H.-J. Clusters and islands on oxides: from catalysis via. **Surface Science**, v. 500, p. 271–299, 2002.

FUJIWARA , K. et al. Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 386, p. 639–644, 2006.

GOTLIEB , R.; IACHAN, A. Estudo do bálsamo de copaíba. **Rev Quim Inds** , v. 14, p. 20-21, 1945.

HAES , A. J.; VAN DUYNNE , R. P. A unified view of propagating and localized surface plasmonresonance biosensors. **Anal Bioanal Chem.**, v. 379, p. 920–930, (2004).

HANIF , J. et al. Silver nitrate: histological effects of cautery on epithelial surfaces with varying contact times. **Clin Otolaryngol Allied Sci**, v. 4, p. 368-70, 2003.

HISTORIC, H. N. Hampton National Historic. **Hampton National Historic**, 2013. ISSN HAMP 4227. Disponível em:
<http://www.nps.gov/history/museum/exhibits/hampton/exb/Food_Service/Glass/HAMP4227_17651_vase.html>. Acesso em: 19 jun. 2013.

HOET, P. H.; BRUSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles—known and unknown health risks. **J. Nanobiotechnol**, v. 2, p. 12, 2004.

HUANG, Y. et al. A randomized comparative trial between Acticoat and SD-Ag in the treatment of residual burn wounds, including safety analysis. **Burns**, v. 33, p. 161-6, 2007.

IBA , Y.; SHIBATA , A.; KATO M. , M. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing. **International Immunopharmacology** , v. 4, p. 1879-1880, 2004.

JANA, N. R.; GEARHEART, ; MURPHY, C. J. Evidence for Seed-Mediated Nucleation in the Chemical Reduction of Gold Salts to Gold Nanoparticles. **Chem. Mater.**, v. 13, p. 2313-2322, 2001.

JANS, ; LIU, ; HUO , Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. **Anal Chem**, v. 81, p. 9425–9432., 2009.

JIN , Y. et al. Controlled nucleation and growth of surface-confined gold nanoparticles on a (3-aminopropyl)trimethoxysilane-modified glass slide: a strategy for SPR substrates. **Anal Chem.** , v. 73, p. 2843-9., 2001.

- KANARAS, A.; KAMOUNAH, F.; BRUST, M. Thioalkylatedtetraethylene glycol: a new ligand for water soluble monolayer protected gold clusters. **Chem Commun.**, v. 20, p. 2294–2295., 2002.
- KHEYBARI, S. et al. Synthesis and antimicrobial effects of silver nanoparticles produced by chemical reduction method. **journals.tums.ac.ir**, v. 18, n. No. 3, p. 168-172, February 05, 2010.
- KIMLING, J. et al. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, p. 15700-15707, 2006.
- KLASEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, v. 26, p. 131-138, 2000.
- KRPETI, Z. et al. Multidentate peptide for stabilization and facile bioconjugation of gold nanoparticles. **Bioconjug Chem.**, v. 20, p. 619–624., 2009.
- KUDO, ; ISHIGATSUBO, Y.; AOKI,. Pathology of asthma. **Front Microbiol**, v. 4, p. 1-16, 2013.
- LANCE KELLY, et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **J. Phys. Chem. B**, v. 107, p. 668-677, 2003.
- LIN, ; LIU,. Electrochemical Sensor for Organophosphate Pesticides and Nerve Agents Using Zirconia Nanoparticles as Selective Sorbents. **Anal. Chem.**, v. 77, p. 5894-5901, 2005.
- LIU, L.-Y. et al. Human airway and peripheral blood eosinophils enhance Th1 andTh2 cytokine secretion. **Allergy**, v. 61, p. 589–597, 2006.
- ŁOBIŃSKIA, ; MARCZENKO, Z. Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 55-111, 1992.
- MODAK, S.; FOX, C. J. Mechanism of Silver Sulfadiazine Action on Burn Wound Infections. **Biochem. Pharmacol**, v. 22, p. 2391 –2404, 1973.
- MODOLIN, M. Biologia da cicatrização dos tecidos. **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**, n. 2ª Ed. São Paulo: MEDSI, p. 9-25, 1992.
- MURPHY, C. J. et al. Anisotropic metal nanoparticles: synthesis, assembly, and optical applications. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 13857–13870, 2005.
- MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MONODISPERSE NANOCRYSTALS AND CLOSE-PACKED NANOCRYSTAL ASSEMBLIES. **Annual Review of Materials Science**, v. 30, p. 545-610, 2000.
- MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. **Annu. Rev. Mater. Sci.**, v. 30, p. 545–610, 2000.
- NADWORNY, P. et al. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. **Nanomedicine**, v. 4, p. 241-51, 2008.

- NETO, A. O. et al. Electro-oxidation of methanol and ethanol using PtRu/C, PtSn/C and PtSnRu/C electrocatalysts prepared by an alcohol-reduction process. **Journal of Power Sources**, v. 166, p. 87–91, 2007.
- NIKOBAKHT, B.; EL-SAYED,. Surface-enhanced Raman scattering studies on aggregated gold nanorods. **J Phys Chem A.**, v. 107, p. 3372–3378, 2003.
- PARK , S.; LEE , J.; MIRKIN , C. Structures of DNA-linked nanoparticle aggregates. **J Phys Chem B.** , v. 110, p. 12673–12681., 2006.
- PELLEGRINO, T. et al. On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications. **Small**, v. 1, p. 48–63, 2005.
- PICHOT,. Reactive Nanocolloids for Nanotechnologies and Microsystems. In: ELAISSARI, A. **Colloidal Nanoparticles in Biotechnology**. New Jersey: Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, v. 1, 2008. p. 381.
- PILCHER , B. et al. Role of matrix metalloproteinase and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 32, p. 12-21, 1999.
- PILLAI , ; SHAH,. Synthesis of high-coercivity cobalt ferrite particles using water-in-oil microemulsions. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 163, p. 243–248, 1996.
- SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care Nanomedicine. **Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.
- SALATA, O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 2, p. 1-6, 2004.
- SAPIESZKO, R. S.; MATIJEVIĆ,. Preparation of well-defined colloidal particles by thermal decomposition of metal chelates. I. Iron oxides. **Journal of Colloid and Interface Science** , v. 74, p. 405–422, 1980.
- SCHÄFFER , M.; BARBUL, A. A lymphocyte function in wound healing and following injury. **British Journal of Surgery**, v. 85, p. 444-460, 1998.
- SCIENCEDAILY. Sciencedaily. **Sciencedaily**, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedaily.com/articles/n/nanotechnology.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2013.
- SEN, et al. Preparation of Cu, Ag, Fe and Al nanoparticles by the exploding wire technique. **Journal of Chemical Sciences**, v. 115, p. 499-508, 2003.
- SILVERT, P.-Y. et al. Preparation of colloidal silver dispersions by the polyol process. **J. Muter. Chem.**, v. 6, p. 573-577, 1996.
- SMITH, M. J. H.; KODAS, T. T. Chemical Vapor Deposition of Metals: Part 1. An Overview of CVD Processes. **Chem. Vap. Deposition**, v. 1, p. 1-23, 1995.

- SUN , R. et al. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. **Chem Commun** , v. 40, p. 5059-61, 2005.
- THEVENOT, D. et al. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. **Pure Appl. Chem.**, v. 7, p. 2333-2348., 1999.
- TIAN , J. et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. **ChemMedChem**. 2007 Jan;**2(1):129-36.**, v. 2, p. 129-36., 2007.
- TO, T. et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC Public Health** , v. 12, p. 1-8, 2012.
- TORIMOTO, T. et al. Sputter deposition onto ionic liquids: Simple and clean synthesis of highly dispersed ultrafine metal nanoparticles. **Appl. Phys. Lett.**, v. 89, p. 243117, 2006.
- USON , R. The chemistry of gold. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-organic, and Nano-metal Chemistry**, v. 8, p. 503–504., 1978.
- WALTERS, G.; PARKIN, I. P. The incorporation of noble metal nanoparticles into host matrix thin films. **J. Mater. Chem**, v. 19, p. 574–590, 2009.
- WANG , ; XU, J.-Z.; ZHU, J.-J. Preparation of CuO nanoparticles by microwave irradiation. **Journal of Crystal Growth**, v. 244, p. 88–94, 2002.
- WEI YANGA; PETERSB, J. I.; O.WILLIAMS,. Nanotechnology Inhaled nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 239–247, 2008.
- WENDER LUIZ DOS SANTOS,. **Síntese de Nanopartículas metálicas por deposição física de vapor em líquidos**. Universidade Federal do Rio Grande Sul - Programa de Pós-Graduação em Física. Porto Alegre, p. 146. 2011.
- WERNER , S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokynes. **Physiological Reviews** , v. 83, p. 835-870, 2003.
- WHITESIDES, G. The drightT size in nanobiotechnology. **Nat Biotechnol**, v. 21, p. 1161- 5, 2003.
- WILLETS, K. A.; DUYNE , R. P. V. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v. 58, p. 267–297, 2007.
- WILLIAMS, D. B. . C. C. B. **Transmission Electron Microscopy**. 2nd edição. ed. [S.l.]: [s.n.], 2009.
- WRIEDT, T. Mie Theory: A Review. In: WRIEDT, T.; HERGERT, W. **The Mie Theory**, **Springer Series in 53**. 1ª. ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 169, 2012. Cap. 2, p. 20.
- WRIGHT , J. et al. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. **Wound Repair Regen** , v. 10, p. 141–151, 2002.

YING , Y. et al. Gold Nanorods: Electrochemical Synthesis and Optical Properties. **J. Phys. Chem. B.**, v. 34, p. 6661–6664, 1997.

ZHANG, ; ERKEY,. Preparation of supported metallic nanoparticles using supercritical fluids: A review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 252–267, 2006.

ZHANG, R. et al. Nucleation and Growth of Nanoparticles in the Atmosphere. **Chem. Rev.**, v. 112, p. 1957–2011, 2012.

ZHOU, J. et al. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability. **J Colloid Interface Sci.** , v. 331, p. 251-62, 2009.

ZIMMER , A.; KREUTER , J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. **Adv Drug Del Rev** , v. 16, p. 61-73, 1995.