



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ**



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SÍNTESE E APLICAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ESTABILIZADAS POR SILSESQUIOXANO IÔNICO CONTENDO O GRUPO
CATIÔNICO 1,4-DIAZONIABICICLO[2,2,2]OCTANO**

ANDRESSA DA CRUZ SCHNEID

Porto Alegre, fevereiro de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

ANDRESSA DA CRUZ SCHNEID

SÍNTESE E APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ESTABILIZADAS POR SILSESQUIOXANO IÔNICO CONTENDO O GRUPO
CATIÔNICO 1,4-DIAZONIABICICLO[2,2,2]OCTANO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Edilson Valmir Benvenuti

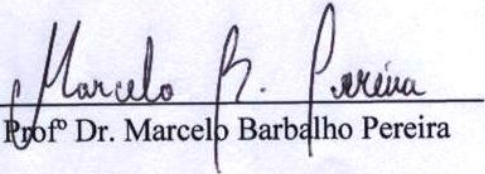
Orientador

Dra. Eliana Weber de Menezes

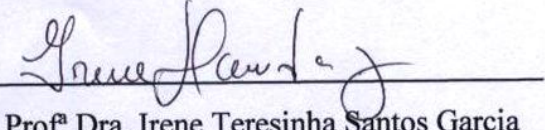
Co-orientadora

Porto Alegre, fevereiro de 2014.

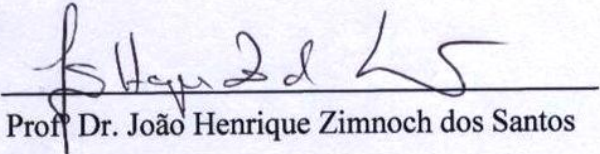
A presente Dissertação de Mestrado foi desenvolvida inteiramente pela aluna Andressa da Cruz Schneid, exceto nas colaborações as quais estão citadas na seção de agradecimentos, no período de março de 2012 a fevereiro de 2014 no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a Orientação do Profº Dr. Edilson Valmir Benvenuti e Co-orientação da Dra. Eliana Weber de Menezes. A dissertação foi julgada adequada pela banca examinadora.



Profº Dr. Marcelo Barbalho Pereira



Profª Dra. Irene Teresinha Santos Garcia



Profº Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos

Dedicatória

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

Dedico este trabalho a todas as pessoas que estiveram ao meu lado no meu caminho até este momento, em especial aos meus pais e minha irmã que sempre incentivaram minha curiosidade por tudo ao meu redor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho e me dar forças para seguir em frente mesmo em momentos difíceis. Agradeço todos os dias as graças que o Senhor me concedeu.

Agradeço ao meu orientador Prof^o Dr. Edilson Benvenuti por me acolher de braços abertos em seu grupo. Agradeço profundamente a confiança que o senhor depositou em mim, sinto-me honrada em fazer parte do seu legado.

À Dra. Eliana Weber de Menezes pela paciência, força e compreensão ao longo de todo o período em que trabalhamos juntas. Admiro sua perseverança e competência em tudo a que se propõe, você é um exemplo para todos nós do grupo do Laboratório de Sólidos e Superfície (LSS).

À Prof^a. Dra. Tania Maria Hass Costa por mostrar-se sempre disponível para conversar e debater ideias, e também pelo apoio oferecido durante todas as etapas do meu mestrado. Como não agradecer pelos lanchinhos nas tardes de trabalho duro.

À Prof^a. Dra. Leliz Ticona Arenas pela simplicidade com que encara todas as situações e a amizade que nos dedica.

Ao Prof^o. Dr. Marcelo B. Pereira pela paciência, pois sei que foram inúmeras as vezes que lhe pedi auxílio e o senhor me ajudou incansavelmente.

Ao Prof^o Dr. Plinho F. Hertz, e também à Carla, Manuela e Carol, pelo companheirismo e persistência.

Agradeço aos meus companheiros do LSS que se tornaram uma segunda família para mim, sem a ajuda e apoio de vocês eu não teria conseguido. Agradeço, em especial, a Elisângela minha grande amiga e companheira, que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus colegas e amigos Monique, Willian, Matheus, Charles, Carlos e Thiago pelo companheirismo e persistência ao longo das disciplinas, e pelo apoio em todas as etapas do meu mestrado.

Às professoras Irene Garcia e Daniela Bianchini pelo incentivo durante a graduação, e às minhas amigas Caroline, Lara e Vanize que sempre estiveram ao meu lado em busca de um futuro melhor.

Agradeço ao meu querido Samuel, que esteve sempre ao meu lado me ouvindo, apoiando e aconselhando. Você foi essencial para esta conquista.

Agradeço profundamente à minha família, meu pai Marcos, minha mãe Ceres e minha irmã Bruna, por apostarem nos meus sonhos e acreditarem na minha capacidade. Todas as minhas conquistas dedico à vocês, pois sempre foram e serão meu porto seguro.

À UFRGS pela oportunidade de usufruir de sua estrutura para a construção de conhecimentos. Por fim, agradeço a Capes pela bolsa outorgada.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS

Artigos Publicados

Journal of
Materials Chemistry B



PAPER

Silver nanoparticle–ionic silsesquioxane: a new system proposed as an antibacterial agent

Cite this: DOI: 10.1039/c3tb21057j

Andressa C. Schneid,^a Eliane W. Roesch,^b Fernanda Sperb,^b Ursula Matte,^b Nádyá P. da Silveira,^a Tania M. H. Costa,^a Edilson V. Benvenuti^{*a} and Eliana W. de Menezes^{*a}

Spherical silver nanoparticles with an average size of ca. 5 nm were synthesized in aqueous medium using a charged silsesquioxane containing a quaternary ammonium group, the bridged 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]-octane nitrate, as a stabilizer and size controller. For the first time this system was synthesized and applied as an antibacterial agent and its activity was confirmed with excellent results. The new system shows high stability, which can be confirmed by the unchanged UV-Vis band even one year later. The magnitude of the zeta-potential (ζ) (+24.7 mV) indicated electrostatic contribution for the silver nanoparticles stability and the signal showed that the nanoparticles have a positively charged surface. *In vitro* antibacterial tests were performed against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* bacteria, and the minimum concentrations of silver in the nanoparticle form for complete inhibition of bacteria were 0.60, 1.1 and 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These values are very low when compared to the previous reports, making this system very promising. The cytotoxicity assay showed that these silver nanoparticles are safe for mammalian cells at the studied concentrations.

Received 30th July 2013
Accepted 7th December 2013

DOI: 10.1039/c3tb21057j

www.rsc.org/MaterialsB

Trabalhos Publicados em Eventos Científicos Internacionais

Schneid, A. C., Sperb, F., Matte, U., Costa, T. M. H., Benvenuti, E. V., de Menezes, E. W.. Toxicity of silver nanoparticles stabilized by ionic silsesquioxane. In: XII Encontro da SBPMat, MRS Metting, 2013, Campos do Jordão, C-P204

Schneid, A. C., Roesch, E. W., Matte, U., Costa, T. M. H., Benvenuti, E. V., de Menezes, E. W.. Bactericidal activity of silver nanoparticles stabilized by ionic hybrid material containing the 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane group. In: Third International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 2013, Sorrento. B.1.1.4

Schneid, A. C., Pereira, M. B., Horowitz, F., Costa, T. M. H., Benvenuti, E. V., de Menezes, E. W. Thin films of silver nanoparticles stabilized by ionic silsesquioxane deposited onto glass substrates. In: XVII International Sol-Gel Conference, 2013, Madri.

Trabalhos Publicados em Eventos Científicos Nacionais

Schneid, A. C, Pereira, M. B., Horowitz, F., Costa, T. M. H., Benvenuti, E. V., de Menezes, E. W.. Filmes finos termicamente estáveis de nanopartículas de prata estabilizadas por silsesquioxano iônico. In: I Workshop em Materiais Híbridos Multifuncionais, 2013, Porto Alegre, RS, Brasil, Or-04

de Menezes, E. W., Schneid, A. C., Roesch, E. W., Sperb, F., Matte, U. S. Costa, T. M. H., Benvenuti, E. V. Propriedades antibacterianas de nanopartículas de prata estabilizadas por silsesquioxano iônico. In: I Workshop em Materiais Híbridos Multifuncionais, 2013, Porto Alegre, RS, Brasil. Or – 11.

Sumário

RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO GERAL	5
2.1. Objetivos Específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. Nanotecnologia	7
3.2. Nanopartículas Metálicas.....	8
3.2.1. Síntese de nanopartículas metálicas	13
3.2.2. Processo químico de síntese de nanopartículas metálicas: método coloidal	13
3.2.3. Mecanismos de estabilização de nanopartículas metálicas	15
3.2.4. Nanopartículas de Prata (AgNPs).....	17
3.2.4.1. Ação antibacteriana das nanopartículas de prata	17
3.3. Compostos Contendo Grupos Amônio Quaternários	19
3.4. Método Sol-Gel de Síntese	20
3.5. Materiais Híbridos a Base de Sílica.....	22
3.5.1. Silsesquioxanos	24
3.6. Filmes Finos.....	27
3.6.1. Filmes finos de silsesquioxanos	28
3.6.2. Filmes finos de nanopartículas de prata	28
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.1. Materiais	31
4.2. Preparação do Estabilizante	31
4.3. Preparação de Dispersões de AgNPs.....	33
4.4. Preparação de Filmes Finos de AgNPs.....	33
4.4.1. Limpeza e ativação do substrato.....	33

4.4.2.	Preparação dos filmes finos de AgNPs por <i>Dip-coating</i>	33
4.5.	Caracterização.....	34
4.5.1.	Difração de Raios X (DRX)	34
4.5.2.	Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido (RMN de ¹³ C e ²⁹ Si)..	34
4.5.3.	Espectroscopia na Região do UV-Vis no estado líquido.....	34
4.5.4.	Espectroscopia na Região do UV-Vis nos filmes finos.....	34
4.5.5.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	35
4.5.6.	Potencial-zeta.....	35
4.5.7.	Microscopia de Força Atômica (AFM)	36
4.5.8.	Elipsometria.....	36
4.5.9.	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS).....	37
4.6.	Testes de Atividade Antibacteriana da Dispersão B de AgNPs	37
4.7.	Ensaio de Citotoxicidade da Dispersão B de AgNPs	37
4.8.	Teste de Atividade Antimicrobiana dos Filmes Finos de AgNPs.....	38
4.8.1.	Teste de atividade antibacteriana por Zona de Inibição (ZOI).....	38
4.8.2.	Atividade antibacteriana por ensaio aplicado a revestimentos de filmes (FAC).....	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1.	Síntese e Caracterização do Silsesquioxano Iônico SiDb(NO ₃) ₂	41
5.2.	Sistema nanopartículas de Prata/Silsesquioxano Iônico (AgNPs/SiDb(NO ₃) ₂) 43	
5.2.1.	Caracterização das dispersões de AgNPs	43
5.3.	Atividade Antibacteriana do Sistema AgNPs/SiDb(NO ₃) ₂	47
5.4.	Citotoxicidade do Sistema AgNPs/SiDb(NO ₃) ₂	51
5.5.	Filmes Finos de AgNPs/SiDb(NO ₃) ₂	52
5.6.	Caracterização dos Filmes Finos de AgNPs/SiDb(NO ₃) ₂	52
5.7.	Atividade Antibacteriana dos Filmes Finos de AgNPs/SiDb(NO ₃) ₂	59
6.	CONCLUSÃO	64
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação da escala nanométrica.	7
Figura 2. Cálice de Licurgo.	8
Figura 3. Representação dos estados eletrônicos em (a) um átomo metálico com OMs ligantes completamente separados dos OMs antiligantes, (b) uma nanopartícula com empacotamento cúbico que apresenta um pequeno <i>gap</i> de energia e (c) um sólido metálico com sua típica estrutura de bandas.	9
Figura 4. Representação da oscilação da nuvem eletrônica frente à interação com o componente do campo elétrico da luz incidida.	10
Figura 5. Diagrama de cores.	11
Figura 6. Extinção de UV-visível calculado (preto), absorção (vermelho) e espalhamento de luz (azul) de nanopartículas de prata na forma de (a) esfera, (b) cubo, (c) tetraédro, (d) octaédro, (e) placa triangular e (f) disco circular.	12
Figura 7. Representação gráfica do tempo versus a concentração atômica na síntese de nanopartículas.	14
Figura 8. Esquema do mecanismo de estabilização eletrostática.	16
Figura 9. (a) Esquema do mecanismo de estabilização estérea realizada por cadeias poliméricas, (b) estabilização estérica.	16
Figura 10. Representação de diversos mecanismos de ataque das nanopartículas e íons de prata sobre as células bacterianas.	18
Figura 11. Representação das classes de materiais híbridos.	23
Figura 12. Representação de tipos de híbrido de classe II.	24
Figura 13. Fórmulas estruturais dos oligômeros constituintes dos componentes inorgânicos dos híbridos à base de sílica.	25
Figura 14. Estruturas de silsesquioxanos: a) aleatória; b) ordenação bidimensional; c) ordenação tridimensional do tipo POSS.	26
Figura 15. Precursores organossilanos desenvolvidos no Grupo de Pesquisa do Laboratório de Sólidos e Superfícies, nas formas (a) pendente, o precursor 1-azonia-4-azabiciclo[2,2,2]octano e (b) em ponte, o precursor 1,4-diazoniabiciclo[2,2,2]octano.	26
Figura 16. Representação da ligação do silsesquioxano iônico com o substrato de lâmina de vidro.	28

Figura 17. Representação esquemática da síntese do $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$	32
Figura 18. Difratomogramas dos silsesquioxanos: (a) $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$ e (b) SiDbCl_2	42
Figura 19. Espectros de RMN de (a) ^{13}C e (b) ^{29}Si do $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$	43
Figura 20. Espectro de absorção na região do UV-Vis das dispersões de AgNPs estabilizadas com $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$	44
Figura 21. Histograma de distribuição de tamanho das AgNPs e imagens de TEM (a) dispersão A, (b) dispersão B e (c) dispersão C.....	45
Figura 22. Representação das diferenças entre as membranas externas das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.	49
Figura 23. Espectro de absorvância no UV-Vis dos filmes finos do sistema AgNPs/ $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$	53
Figura 24. Imagem de TEM e histograma de distribuição do diâmetro de nanopartícula de prata no Filme C.	54
Figura 25. Difrátograma de raios X do sistema AgNPs/ $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$: a) Filme B e b) Filme C.....	54
Figura 26. Espectro de XPS para a amostra em pó do Filme B.	55
Figura 27. Imagem de contraste de fase por AFM. a) filme sem AgNPs; b) Filme B de AgNPs.....	56
Figura 28. Distribuição dos índices de refração (a) real (n) e (b) imaginário (k) do Filme C de AgNPs.....	58
Figura 29. Placas com crescimento bacteriano de <i>S. aureus</i> na presença de (a) nenhum agente antibacteriano (controle), (b) Filme Branco ($\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$, (c) Filme B e (d) Filme C.	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Potencial- ζ (mV) em diferentes pH da dispersão B de AgNPs e amostra branco.	46
Tabela 2. Atividade antibacteriana do sistema branco (A) e sistema com AgNPs (B). .	48
Tabela 3. Ação comparativa de sistemas de AgNPs contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	50
Tabela 4. Resultados do teste de redução do MTT em presença da amostra com AgNPs e branco.....	51
Tabela 5. Ação bacteriostática do Filme Branco e dos Filmes B e C contra a bactéria <i>S. aureus</i>	61
Tabela 6. Ação bacteriostática e bactericida dos Filmes C e Branco frente as bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	61

ABREVIATURAS

AgNPs	Nanopartículas de Prata
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
OA	Orbital Atômico
OM	Orbital Molecular
TOM	Teoria do Orbital Molecular
CAQ	Compostos de Amônio Quaternário
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ATP	Adenosina Trisfosfato
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ORMOSIL	<i>Organically Modified Silica</i>
POSS	<i>Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane</i>
DABCO	1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano

CPTMS	3-cloropropiltrimetoxisilano
SiDbCl₂	Cloreto de 1,4-bis-(3-propilsilil)diazoniabicyclo[2,2,2]octano
SiDb(NO₃)₂	Nitrato de 1,4-bis-(3-propilsilil)diazoniabicyclo[2,2,2]octano
DRX	Difração de Raios X
XPS	<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
CP/MAS	<i>Cross Polarization Magic Angle Spinning</i>
UV-Vis	Ultravioleta Visível
(%)Abs	Porcentagem de luz absorvida
(%)T	Porcentagem de luz transmitida
(%)R	Porcentagem de luz total refletida
(%)ΔAbs_(AgNPs)	Porcentagem de luz absorvida pelas nanopartículas de prata
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
σ	Desvio padrão
d	Diâmetro médio de partícula
ZoI	<i>Zone of Inhibition</i>
FAC	<i>Film Applicator Coating</i>
eV	Eletrovolt
Hz	Hertz
nm	Nanômetro
mV	Milivolt

RESUMO

Os compostos amônio quaternários (CAQ) e as nanopartículas de prata (AgNPs) são extensamente conhecidos por suas atividades antibacterianas. Neste contexto o silsesquioxano iônico contendo o grupo catiônico 1,4-diazôniabicyclo[2,2,2]octano ($\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$) foi utilizado como agente estabilizante de AgNPs em meio aquoso, possibilitando a obtenção de nanopartículas de prata estáveis na forma esféricas com diâmetros médios inferiores a 10 nm. Mesmo em concentrações baixas de prata ($1.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o sistema AgNPs/ $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$ apresenta excelente atividade antibacteriana contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, como também baixa citotoxicidade. Também foram produzidos filmes finos, sobre substratos de vidro, com o sistema AgNPs/ $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$. Os filmes de AgNPs apresentaram excelentes atividades bacteriostática e bactericida contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Portanto, o sistema AgNPs/ $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$ é muito promissor para ser aplicado como agente antibacteriano na forma de dispersão aquosa ou de filme fino.

ABSTRACT

The quaternary ammonium compounds (QAC) and silver nanoparticles (AgNPs) are widely known for their antibacterial activities. In this context, the ionic silsesquioxane containing the cationic group 1,4- diazoniabicyclo [2,2,2] octane and the nitrate group as counter ion (SiDb(NO₃)₂) was used as a stabilizing agent of AgNPs in aqueous medium, making possible to obtain stable silver nanoparticles with spherical shape and average diameters below 10 nm. Even at low silver concentration (1.1 µg.mL⁻¹), the AgNPs/SiDb(NO₃)₂ system shows excellent antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* bacteria, as well as low cytotoxicity. Thin films of AgNPs/SiDb(NO₃)₂ system were made on glass substrates. The films of AgNPs showed excellent bacteriostatic and bactericidal activity against *E. coli* and *S. aureus* bacteria. Therefore, the AgNPs/SiDb(NO₃)₂ system is very promising to be applied as antibacterial agent as water dispersion or film form.

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos as bactérias responsáveis por infecções hospitalares, destacando-se como as principais a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, vem sendo combatidas por antibióticos comuns, porém tais micro-organismos vem adquirindo resistência a estes antibióticos.^{1,2} Desta forma, a utilização de novas alternativas de agentes antibacterianos vem tornando-se um caminho promissor para a indústria farmacêutica e alimentar.^{3,4,5,6} Neste contexto, as nanopartículas de prata (AgNPs) vêm se destacando,¹ pois as mesmas são extensamente conhecidas por sua atividade contra vírus^{4,7}, bactérias^{5,8} e fungos.^{6,9} No entanto, sistemas que contêm prata são conhecidos por sua baixa biocompatibilidade, devido à presença de íons de prata no meio, os quais apresentam alta toxicidade.¹⁰ Por esta razão, visando a utilização destes sistemas como agentes antimicrobianos se faz necessário que os mesmos apresentem baixas concentrações de íons de prata em sua composição.

A obtenção de sistemas de AgNPs, assim como os demais sistemas de nanopartículas, pode ser realizada através de dois tipos de métodos: I) *Top down*: através do qual as nanopartículas são obtidas pela destruição de um bloco metálico; II) *Bottom up*: a partir do qual as nanopartículas são obtidas pela aglomeração de íons metálicos formando clusters, que por sua vez fundem-se formando nanopartículas metálicas. O método *bottom up* é muito utilizado atualmente devido ao baixo custo e simplicidade atribuído a ele. Neste método são utilizados agentes que recobrem a superfície das nanopartículas impedindo que ocorra o processo de coalescência das mesmas, estes componentes da síntese também são conhecidos como agentes estabilizantes.^{11,12}

Em geral, são utilizados como agentes estabilizantes de AgNPs: polióis^{13,14}, líquidos iônicos^{15,16}, polímeros^{17,18} e compostos sulfonados^{19,20}. Os silsesquioxanos, em especial os silsesquioxanos iônicos contendo grupos amônio quaternário, também apresentam uma ação satisfatória como estabilizante de metais nobres como o ouro.^{21,22} A presença de grupos amônio quaternários na rede do silsesquioxano pode atribuir a este estabilizante atividade antimicrobiana.²³ Estes grupos nitrogenados, assim como as AgNPs, são capazes de interagir com as paredes celulares bacterianas, causando danos às mesmas e consequentemente levando a morte destes micro-organismos.^{6, 24}

O método sol-gel de síntese, que é baseado nas reações de hidrólise e condensação, pode dar origem a materiais híbridos orgânico-inorgânicos à base de sílica, incluindo os silsesquioxanos.²⁵ O grande benefício da utilização deste método é a possibilidade de arquitetar a estrutura do material segundo a aplicação desejada. Desta forma, visando a utilização deste híbrido para a estabilização de nanopartículas de metais nobres, precursores orgânicos contendo grupos sulfurados ou que contenham grupos amônio quaternário são indicados para compor a estrutura deste silsesquioxano, considerando a afinidade que nanopartículas de metais nobres apresentam por estes grupos.^{26,27,28}

Existem vantagens na utilização de silsesquioxanos iônicos como agentes estabilizantes de nanopartículas metálicas frente aos demais agentes estabilizantes utilizados atualmente. A aplicação deste híbrido à base de sílica para esta finalidade possibilita que sejam obtidas dispersões estáveis em meio aquoso, e também permite a produção deste sistema em forma de pó a partir da simples secagem das dispersões aquosas, viabilizando uma melhor manipulação e transporte.²² Outra vantagem da utilização dos silsesquioxanos é a capacidade dos mesmos de formar filmes finos sobre matrizes inorgânicas.²⁹ Assim, a inserção de grupos como 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano e propilpiridínio, permite a obtenção de filmes finos contendo nanopartículas metálicas em substratos de sílica e alumina.²¹

Neste contexto, a combinação de AgNPs e silsesquioxanos iônicos contendo grupos amônio quaternários pode resultar em uma potencial atividade antimicrobiana, visto que tal propriedade é inerente tanto às partículas de prata quanto ao grupo amônio quaternário. Além disso, a resistência térmica apresentada por este tipo de material híbrido pode contribuir para a estabilidade do sistema de nanopartículas frente a tratamentos térmicos. Portanto, torna-se muito relevante que o sistema nanopartículas de prata/silsesquioxano iônico seja explorado visando aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e hospitalar.

OBJETIVOS



2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos materiais híbridos contendo nanopartículas de prata (AgNPs) estabilizadas por silsesquioxano iônico que apresentem atividade antibacteriana.

2.1. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho incluem:

- Sintetizar nanopartículas de prata em meio aquoso, utilizando como agente estabilizante o silsesquioxano iônico nitrato de 1,4-bis-(3-propilsilil)diazoniabicyclo[2,2,2]octano, $[\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2]$;
- Estudar a atividade antibacteriana do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ contra bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas em meio aquoso;
- Estudar a citotoxicidade da dispersão aquosa do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂;
- Estudar a viabilidade de obtenção de filmes finos do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ sobre matriz de vidro;
- Estudar a atividade antibacteriana de filmes finos obtidos a partir do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ em matriz de vidro.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Nanotecnologia

A nanotecnologia abrange todo e qualquer material, dispositivo ou estrutura que apresente ao menos uma de suas dimensões na escala nanométrica (1 - 100 nm), e envolve a manipulação, fabricação e caracterização destas nanoestruturas.^{30,31} A escala em nanômetros é um bilhão de vezes menor que a escala em metros, assim é correto afirmar que um fio de cabelo que possui aproximadamente 70 μm de diâmetro ³², apresenta uma espessura de 70 mil nanômetros (Figura 1).

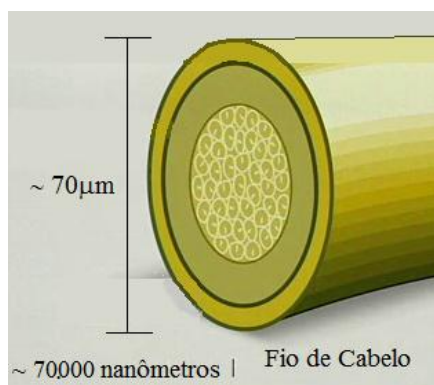


Figura 1. Representação da escala nanométrica.

As estruturas no nível nanométrico podem ser confeccionadas a partir da destruição de estruturas maciças de dimensões macrométricas, bem como, podem ser obtidas em um processo átomo a átomo ou molécula a molécula, que se organizam de forma a dar origem a um material nanoestruturado.³¹ A redução no tamanho ou o confinamento das partículas em uma determinada direção leva a mudanças das propriedades do sistema neste sentido. Desta forma, os materiais nanoestruturados podem ser classificados considerando-se o número de dimensões nanométricas, onde as nanopartículas, nanotubos e nanofilmes apresentam três, duas e uma dimensão nanométrica, respectivamente.³¹

O diminuto tamanho destes materiais infere a eles propriedades químicas, físicas e biológicas diferentes das apresentadas pelo material na forma de “bulk”, como maior

resistência a tensões, ação antimicrobianas, elevada capacidade de armazenamento de dados e também de energia entre outras. Estas propriedades permitem que os nanomateriais sejam aplicados em diversas áreas da ciência e tecnologia, da medicina a computação. A pesquisa em nanotecnologias destacou-se ao longo da última década,³³ atualmente existem inúmeras empresas no mundo especializadas na fabricação de novas formas de materiais nanoestruturados, com aplicações previamente definidas, como por exemplo, medicamentos terapêuticos, produção de energia e materiais estruturais utilizados na construção civil. Em 2008, a área da nanotecnologia exigiu mais de 15 bilhões de dólares em pesquisas no mundo inteiro, e são projetados pelo menos mais 3 trilhões de euros até 2020. Portanto, a área da nanotecnologia mostra-se muito promissora para as próximas décadas, representando uma nova era para a indústria, economia e saúde mundial.³³

3.2. Nanopartículas Metálicas

As nanopartículas metálicas são utilizadas nos mais diversos materiais desde a antiguidade. Os primeiros relatos de sistemas contendo estas nanopartículas datam de épocas bem anteriores à ciência moderna, onde as mesmas eram utilizadas no Egito e na China nos séculos IV e V a. C. para colorir inúmeros materiais, incluindo vidro e cerâmica.^{34,35} Possivelmente o artefato mais antigo é o Cálice de Licurgo (Lycurgus Cup), do século V a. C. em Roma (Figura 2).^{36,37} O cálice apresentava coloração esverdeada quando visualizado por reflexão e cor avermelhada quando observado por transmissão de luz, devido a presença de nanopartículas de ouro no objeto.³⁵



Figura 2. Cálice de Licurgo.

As nanopartículas metálicas possuem propriedades ópticas diferentes das apresentadas pelo mesmo metal em dimensões macroscópicas. Tal característica pode ser explicada pela Teoria de Bandas. Em átomos metálicos os níveis energéticos apresentam estados discretos, como representado na Figura 3a. Por outro lado, em sólido metálico têm-se bandas formadas por de estados energéticos muito próximos constituindo um sistema quase contínuo (Figura 3c), visto que as ligações entre os átomos apresentam-se extensivamente deslocalizadas, devido à interação entre os átomos em toda a extensão do sólido.³¹ Para as nanopartículas metálicas, a extensão da deslocalização eletrônica das ligações é limitada pela quantidade de átomos existentes, nesse caso, como o número de átomos metálicos é limitado, não se tem uma banda contínua. Surge um intervalo entre as bandas ligante e antiligante, semelhante a um semiconductor intrínseco, representado na Figura 3b.^{38,39,40} O tamanho do intervalo está relacionado com a quantidade de átomos metálicos na nanopartícula. Quanto menor a nanopartícula, maior será esse intervalo de energia.³⁸

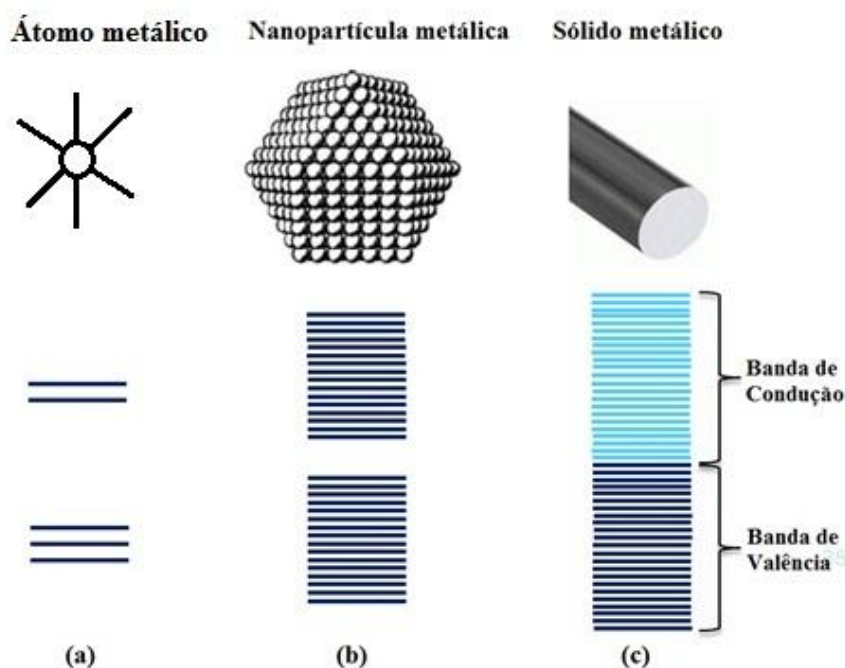


Figura 3. Representação dos estados eletrônicos em (a) um átomo metálico com OMs ligantes completamente separados dos OMs antiligantes, (b) uma nanopartícula com empacotamento cúbico que apresenta um pequeno *gap* de energia e (c) um sólido metálico com sua típica estrutura de bandas. (Adaptado da referência 38)

Nos metais nobres, a diminuição do tamanho da partícula abaixo do percurso livre médio dos elétrons dá origem a um máximo de absorção no espectro do ultravioleta-visível. Isto resulta da oscilação coerente dos elétrons livres ³⁸, fenômeno conhecido como ressonância de plasmon. A ressonância de plasmon ocorre devido à interação do componente elétrico da onda eletromagnética com a nuvem eletrônica das partículas (Figura 4).

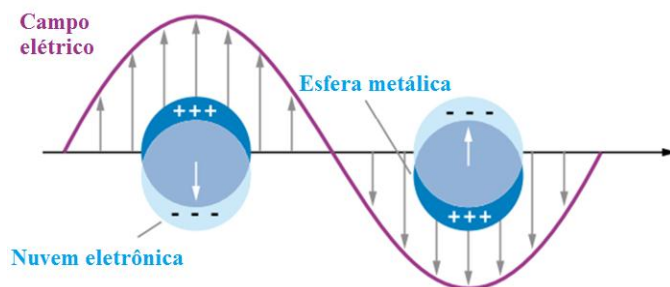


Figura 4. Representação da oscilação da nuvem eletrônica frente à interação com o componente do campo elétrico da luz incidente. (Adaptado da referência 41)

Assim, quando a luz é incidida sobre o sistema de nanopartículas metálicas parte desta energia é absorvida, polarizando a nuvem eletrônica da nanopartícula, e os demais comprimentos de onda são refletidos e transmitidos. ⁴² Para nanopartículas de metais nobres o comprimento de onda absorvido está na região do visível, ⁴⁰ logo a coloração que se observa para estes sistemas é referente à cor complementar do comprimento de onda absorvido. As nanopartículas de prata (AgNPs) esféricas, por exemplo, apresentam máximo de absorção em comprimentos de onda próximos a 400 nm, que é referente ao violeta, já as nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam um máximo de absorção próximo a 500 nm, o qual é referente ao verde. Portanto, as dispersões de nanopartículas de prata e ouro apresentam coloração amarela e vermelha, respectivamente, que são as cores complementares e estão representadas em posições opostas no diagrama de cores apresentado na Figura 5.



Figura 5. Diagrama de cores.

Existe uma relação direta entre o comprimento de onda absorvido pelas nanopartículas metálicas e o seu tamanho, pois quanto menor a partícula menor será o comprimento de onda que a mesma irá absorver. Este fenômeno é atribuído à maior descontinuidade dos níveis de energia que se deve ao estreitamento das bandas de valência e condução.^{39,43} Desta maneira é formado um intervalo de energia maior entre as bandas de energia e por esta razão um fóton mais energético é absorvido.

O espectro de absorção das nanopartículas metálicas também está associado ao formato da partícula, pois a energia do plasmon em ressonância é dependente da geometria da mesma. Em situações em que a partícula apresenta pontas (vértices), há uma polarização da nuvem eletrônica nestes pontos, diminuindo o número de elétrons para retomar a oscilação ao longo da superfície.^{42,44} Assim, ocorre a diminuição da energia da oscilação e, conseqüentemente, o aumento do comprimento de onda absorvido.^{42, 44} Então, ao comparar nanopartículas esféricas e cúbicas com tamanhos semelhantes, observa-se um deslocamento da banda de absorção para comprimentos de onda maiores (Figura 6). A simetria das partículas estabelece o número de bandas absorvidas. É possível citar como exemplo os nanofios, que apresentam anisotropia estrutural, onde uma dimensão é mais alongada que as demais, logo haverá diferença na interação da luz incidida com as superfícies das faces, ocasionando a formação de duas bandas de absorção.⁴²

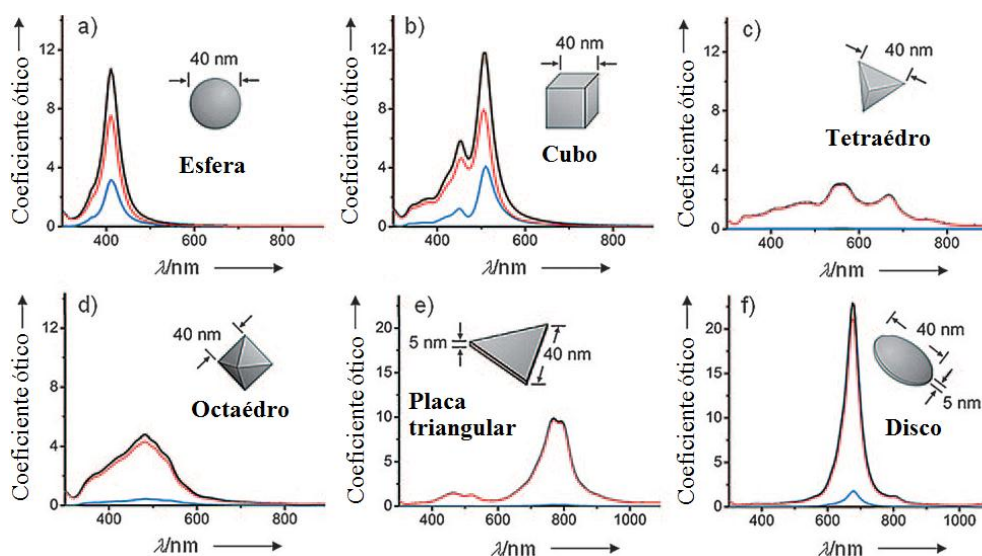


Figura 6. Extinção de UV-visível calculado (preto), absorção (vermelho) e espalhamento de luz (azul) de nanopartículas de prata na forma de (a) esfera, (b) cubo, (c) tetraédro, (d) octaédro, (e) placa triangular e (f) disco circular. (Adaptado da referência 42)

As dimensões nanométricas das partículas metálicas exercem influência não somente nas propriedades ópticas do sistema, mas também sobre as propriedades catalíticas, térmicas e magnéticas, no caso de materiais magnéticos.^{31,38,42} Nanopartículas de metais nobres apresentam notável atividade catalítica devido à razão de átomos superficiais/átomos internos ser elevada. Essa afirmativa pode ser confirmada pelos números mágicos, onde ao se considerar uma partícula com empacotamento cúbico de face centrada com 13 átomos metálicos, a mesma apresenta 12 átomos em sua superfície, que equivale a 92 % dos átomos, e quando se aumenta para 55 átomos metálicos na partícula, 42 destes são superficiais, equivalente a 76 % dos átomos.^{38,45} A diminuição do tamanho da nanopartícula tem como consequência a elevação da temperatura de fusão do material quando nanopartículas metálicas estão inseridas em matrizes sólidas, pois há uma maior interação entre as partículas.³¹ Em geral, materiais ferromagnéticos em dimensões macrométricas formam múltiplos domínios magnéticos, no entanto, pequenas nanopartículas magnéticas consistem frequentemente em apenas um domínio e exibem um fenômeno conhecido como superparamagnetismo.^{31,46}

3.2.1. Síntese de nanopartículas metálicas

O desenvolvimento de rotas sintéticas para a obtenção de nanomateriais de metais nobres é muito importante para estudos teóricos e aplicações práticas. Nas últimas décadas foram desenvolvidos processos classificados em dois tipos: *bottom up* e *top down*. A síntese de nanopartículas pelos métodos *bottom up* utiliza átomos, moléculas e até mesmo nanopartículas para a obtenção de partículas nanométricas, ou seja, são realizados processos químicos, por este motivo estas técnicas são também conhecidas como métodos químicos para síntese de nanopartículas.

O método químico de síntese pode ser realizado nos estados sólido, líquido e gasoso. No entanto, devido à difusão do material nas fases líquida e gasosa ser muito maior que no estado sólido, em geral as sínteses são feitas nestas duas fases.³¹ A obtenção de sistemas nanométricos pode ser realizada por deposição da fase vapor, deposição assistida por plasma, métodos coloidais, eletrodeposição, entre outros.³¹

Em contrapartida, nos métodos *top down* são exemplos de processamento de materiais no estado sólido. Nestes processos as nanopartículas são obtidas a partir da destruição de um sólido macroscópico, por exemplo, são utilizados blocos metálicos para obtenção de partículas nanométricas. As técnicas utilizadas incluem moagem (*milling*, em inglês), usinagem (*machining*, em inglês) e processos litográficos como o FIB (Focused Ion Beam).³¹

3.2.2. Processo químico de síntese de nanopartículas metálicas: método coloidal

Os métodos de síntese de coloides são conhecidos desde o início do século XX, no entanto somente os processos químicos desenvolvidos nas últimas décadas vêm apresentado êxito no controle da forma e tamanho das nanopartículas.⁴⁷ Segundo LaMer (1950), o mecanismo da síntese das partículas ocorre a partir de três etapas: I) formação da semente inicial (ponto de nucleação), através do aumento da concentração de monômeros (átomos com carga zero) no meio até a supersaturação; II) os monômeros agregam-se continuamente sobre a semente, levando a uma diminuição gradual da concentração dos monômeros; III) estabilização das superfícies dos nanocristais

resultantes utilizando agentes estabilizantes.¹² Estas etapas podem ser observadas na representação gráfica apresentada na Figura 7.

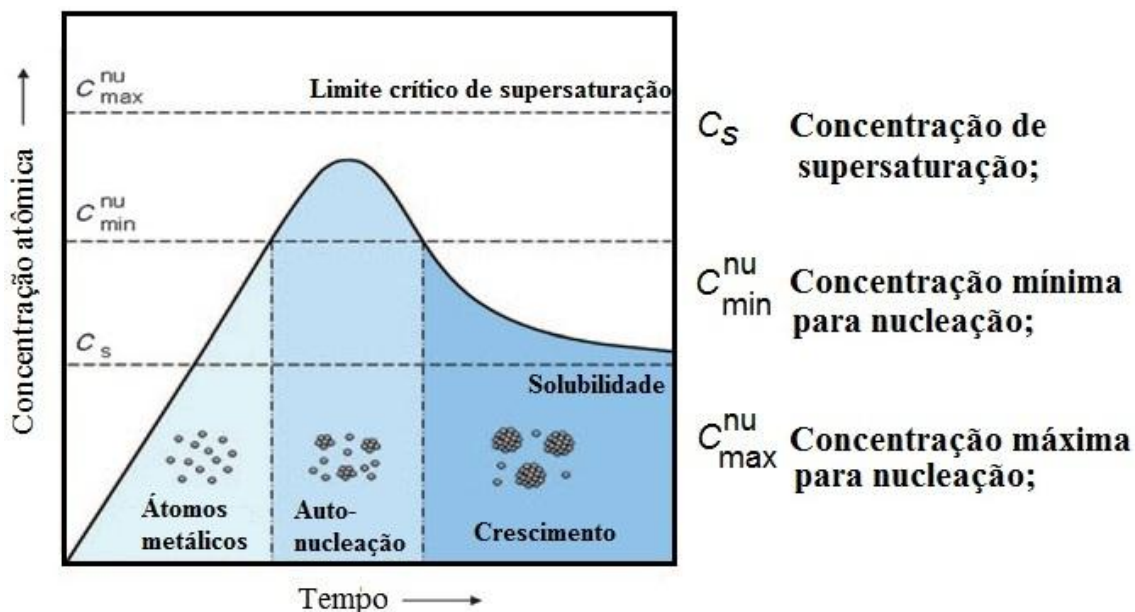


Figura 7. Representação gráfica do tempo versus a concentração atômica na síntese de nanopartículas. (Adaptada das referências 42 e 48)

O processo de nucleação inicia quando o precursor nanocristalino do metal é reduzido até apresentar uma carga igual a zero. Após esta etapa, as espécies reduzidas agregam-se formando clusters na solução supersaturada, neste momento começa o processo de agregação dos clusters, chegando no segundo estágio da formação das nanopartículas, conhecido como processo de crescimento.^{12,42} Na última etapa as espécies geradas são recobertas por agentes estabilizantes, os quais restringem o crescimento das partículas, bem como, garantem uma boa dispersão das mesmas no solvente.^{12,49} O processo de nucleação envolve a formação de superfícies sólidas que conduz à mudanças na energia livre do sistema, a qual é expressa pela seguinte equação:

$$\Delta G = n (\mu_s - \mu_L) + A\gamma \quad \text{Equação 1.}$$

Onde n é o número de mols de espécies nucleadas, μ_s e μ_L são, respectivamente, os potenciais químicos dos clusters e dos monômeros dissolvidos no meio, A é a área superficial e γ é a energia superficial da interface sólido-líquido.¹²

Então, considerando a equação 1, sabe-se que os fatores que favorecem o processo de nucleação são: a minimização do μ_s , baixa área superficial das espécies formadas, bem como a diminuição da energia superficial e o aumento da supersaturação, levando ao crescimento expressivo na taxa de nucleação. A supersaturação aumenta com a diminuição da solubilidade dos precursores metálicos, logo, as propriedades do metal utilizado exercem grande influência na taxa de nucleação.¹²

As etapas de nucleação e crescimento das partículas são precedidas pelo processo de envelhecimento, é neste momento que ocorrem mudanças no tamanho das partículas, no qual a quantidade de material sólido permanece constante. Os dois principais processos de envelhecimento que agem na evolução das partículas são a agregação e amadurecimento de Ostwald.^{12,50} O amadurecimento de Ostwald consiste no crescimento do raio médio da partícula e na diminuição no número total de clusters formados a partir da nucleação de uma fase minoritária estável, neste caso o precursor metálico de carga zero, em uma fase majoritária metaestável.⁵¹

3.2.3. Mecanismos de estabilização de nanopartículas metálicas

Existe um obstáculo a ser superado para alcançar a obtenção de nanopartículas metálicas, conhecido como coalescência, o qual é uma consequência das dimensões nanométricas assumidas por essas partículas. O diminuto tamanho das nanopartícula leva a um aumento da energia livre (ΔG) do sistema, assim buscando a minimização do ΔG , as partículas metálicas sofrem um processo de fusão.^{36,47} Desta forma, são utilizados agentes estabilizantes, os quais recobrem a superfície das partículas metálicas a fim de evitar que estas sofram coalescência. Os agentes estabilizantes podem atuar na estabilização das nanopartículas através de dois tipos de mecanismo: o estérico e o eletrostático.^{45,47}

A estabilização eletrostática ocorre a partir da adsorção de cargas elétricas na superfície das partículas, formando uma múltipla camada elétrica. A coalescência das

partículas é impedida pela repulsão Coulombiana entre as cargas presentes em sua superfície. Estas cargas elétricas podem ser provenientes de contra íons ou cargas presentes nas moléculas de estabilizantes (Figura 8).⁵²

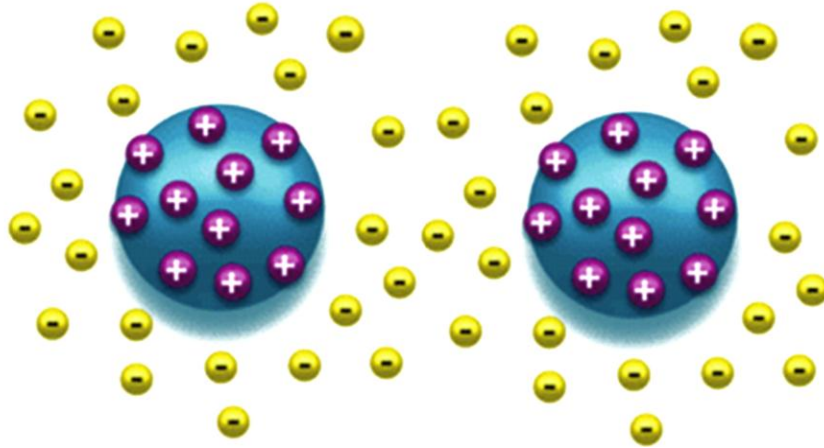


Figura 8. Esquema do mecanismo de estabilização eletrostática.
(Adaptação da referência 52)

O mecanismo de estabilização estérea evita a coalescência a partir do impedimento estéreo realizado pelas cadeias longas dos agentes estabilizantes adsorvidos na superfície das partículas, como mostra a Figura 9. Atuam através deste mecanismo estabilizantes como surfactantes e polímeros.^{45,52}

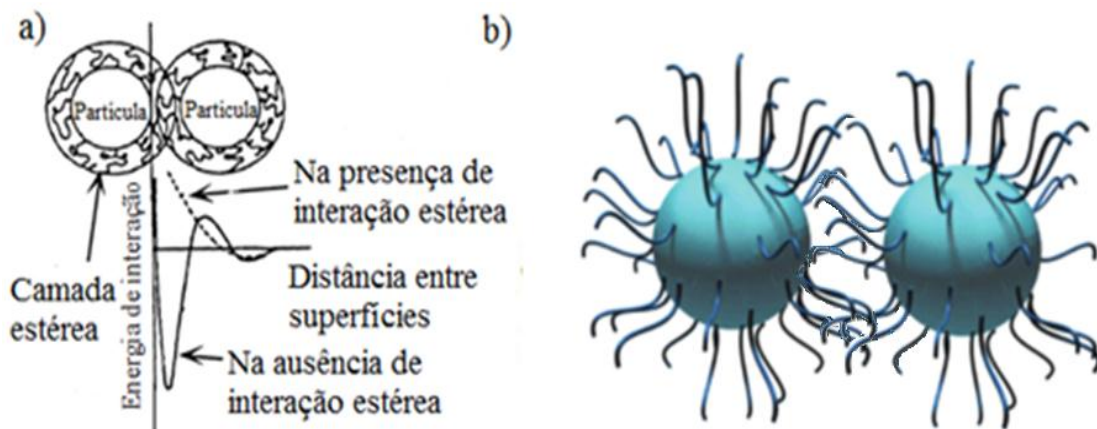


Figura 9. (a) Esquema do mecanismo de estabilização estérea realizada por cadeias poliméricas, (b) estabilização estérea. (Adaptação das referências 45 e 52)

São utilizados como agentes estabilizantes de nanopartículas metálicas componentes como polióis^{14,53}, líquidos iônicos^{15,16}, polímeros^{17,54}, dendrímeros^{55,56}, compostos sulfonados^{19,20}, surfactantes^{57,58}, entre outros. Recentemente foi demonstrado pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Sólidos e Superfícies da UFRGS que silsesquioxanos iônicos contendo grupos amônio quaternários podem ser utilizados como agentes estabilizantes de nanopartículas de metais nobres como o ouro.^{21,22} A presença de cargas nos silsesquioxanos iônicos permite que o mesmos apresentem uma apreciável solubilidade em meios com constantes dielétricas elevadas, possibilitando assim a obtenção de dispersões estáveis de nanopartículas metálicas em meio aquoso.^{59,60} Esta propriedade é de suma importância pois permite que estes sistemas possam ser aplicados em meios biológicos.

3.2.4. Nanopartículas de prata (AgNPs)

Os compostos de prata são conhecidos historicamente por sua ação antimicrobiana, sendo utilizados em medicamentos de uso tópico.^{61,62} As partículas de prata começaram a ganhar espaço no cenário científico na década de 1980, juntamente com a disseminação das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM – *Scanning Electron Microscopy*) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM – *Transmission Electron Microscopy*).^{63,64}

A utilização dos compostos de prata estendeu-se às nanopartículas de prata, as quais são aplicadas atualmente como agentes antimicrobianos contra bactérias, fungos e vírus.^{65,66} As propriedades ópticas típicas de nanopartículas metálicas permitem que as AgNPs também sejam empregadas em dispositivos ópticos, como nanoantenas,⁶⁷ por exemplo, bem como sejam utilizadas na ampliação de sinais na espectroscopia Raman.⁶⁸

3.2.4.1. Ação antibacteriana das nanopartículas de prata

A atividade antibacteriana das nanopartículas de prata (AgNPs) é citada em inúmeros trabalhos que visam aplicações tecnológicas, no entanto, o mecanismo de ação deste material ainda não é totalmente compreendido. Existem algumas propostas de mecanismos descritas por trabalhos anteriores, as quais, em sua maioria, atribuem a atividade antibacteriana das nanopartículas de prata, e dos íons prata, à interação

eletrostática entre a parede celular carregada negativamente e as espécies de prata que apresentam cargas positivas.¹ No entanto, essa proposta não explica a ação antibacteriana das AgNPs com cargas negativas. Então foi sugerido que independente da carga das AgNPs, existem interações entre estas nanopartículas e proteínas sulfuradas presentes na cadeia respiratória celular, bem como, entre outras proteínas essenciais para a integridade da célula, assim interferindo no funcionamento celular.^{1,69}

As três principais sugestões de mecanismos são: (I) absorção de íons livres e nanopartículas de prata seguido da interrupção da produção de ATP e da replicação do DNA, devido a interação das espécies de prata com os tióis presentes na estrutura de enzimas vitais para o funcionamento celular;^{69,70} (II) geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species) pelas nanopartículas e íons de prata, os quais afetariam a cadeia respiratória mitocondrial levando a uma destruição do DNA;⁴ (III) danos diretos na membrana celular causados pelas nanopartículas de prata, que ao desintegrar a parede celular e a membrana citoplasmática libera uma substância, que provavelmente trata-se do citoplasma.^{4, 6} As diversas interações entre as nanopartículas de prata e a célula bacteriana são ilustradas na representação abaixo (Figura 10).

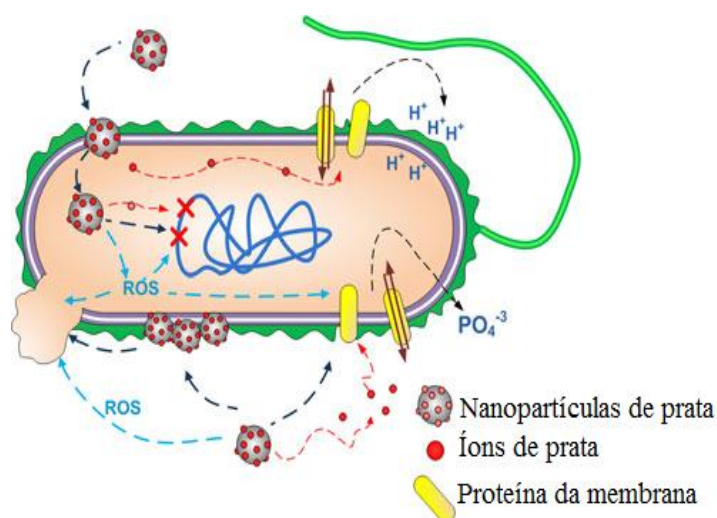


Figura 10. Representação de diversos mecanismos de ataque das nanopartículas e íons de prata sobre as células bacterianas. (Adaptada da referência 4)

Há indícios da formação de espécies reativas de oxigênio, quando células cancerosas foram expostas a um remédio de uso tópico contendo nanopartículas de prata.⁷¹ O aumento da frequência de mutações ocorridas no DNA durante as reações em cadeia da polimerase foi atribuído a interação das AgNPs com os grupos tióis contidos na estrutura do DNA.⁷² Portanto, existem evidências que justificam os mecanismos propostos para a atuação das nanopartículas de prata contra as células bacterianas.

3.3. Compostos Contendo Grupos Amônio Quaternários

Os sais quaternários de amônio ou sais de amônio quaternário são íons poliatômicos carregados positivamente e com a estrutura NR_4^+ , onde R pode ser qualquer radical alquila. Os cátions quaternários de amônio são sintetizados através da alquilação completa da amônia ou outras aminas. Os compostos de amônio quaternário (CAQ) são conhecidos por sua elevada estabilidade, e também por suas propriedades como agente antimicrobiano.

Os CAQ exercem atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como, contra espécies patogênicas de fungos e protozoários.⁷³ Estes compostos apresentem muitas vantagens entre elas estão incluídas a capacidade de penetração na parede celular, baixa toxicidade e sensibilidade sobre as células mamíferas, boa estabilidade e eleva atividade biológica.^{74,75} Embora o exato mecanismo de ação antimicrobiana dos CAQ não seja completamente conhecido, o mesmo é extensamente atribuído à capacidade destas espécies aumentarem a permeabilidade celular e favorecerem o rompimento da célula.^{24,76} A compatibilidade com a dupla camada externa da membrana celular é alcançada quando ao menos um substituinte orgânico (ligado ao nitrogênio) for uma cadeia alquílica longa, a qual forneça um segmento hidrofóbico para o CAQ.^{24,76,77} Em geral, o mecanismo da ação antimicrobiana dos CAQ mais aceito descreve que os compostos de amônio quaternário são adsorvidos nos sítios aniônicos da superfície da parede celular por interações eletrostáticas, e então o componente lipofílico promove a difusão através da parede celular e liga-se à membrana da célula. As cadeias alquílicas longas, atuando como surfactantes, são capazes de romper a membrana citoplasmática, liberando eletrólitos e material nuclear que causa a morte da célula.^{78,79,80}

3.4. Método Sol-Gel de Síntese

Nos últimos séculos foram desenvolvidos estudos nos quais eram obtidos materiais sólidos a partir de um processo diferente. Em 1640, van Helmont descobriu o “vidro de água” (do inglês “water glass”) pela dissolução de silicatos em meio aquoso e a posterior precipitação de gel de sílica em meio ácido.^{81,82} Em 1846, Ebelmen observou a formação de vidro transparente após a exposição atmosférica do silano obtido a partir de SiCl_4 e etanol.^{82,83} No entanto, este processo onde parte-se de um sistema líquido, passa-se por um sistema gel e por fim é obtido um sólido somente foi intitulado como “sol-gel” (solução-gelificação) em 1864 por Graham durante seu trabalho com sols de sílica.^{84,85} Assim, durante o século XX o método sol-gel de síntese ganhou espaço nas pesquisas de cientistas de todo mundo, pois tal processo permite o aprimoramento das propriedades de matrizes sólidas, permitindo inúmeras aplicações.⁸⁵

No processo sol-gel o sol é constituído por uma dispersão de partículas coloidais (dimensões entre 1-100 nm) em um líquido⁸⁶ e o gel é formado por uma estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou por cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobilizam a fase líquida nos seus interstícios.^{86,87} As reações químicas envolvidas no processo sol-gel convencional, baseado em derivados alcóxidos são (1) hidrólise, expressa no esquema 1, e (2) condensação, a qual pode se processar por olação, no esquema 2a e 2b, e por oxolação, expressa no esquema 3a e 3b.⁸⁶

(1) Hidrólise



(2) Condensação

Olação:



Oxolação:



Onde M = Si, Sn, Ti, Al, Mo, etc

Nesta proposição mecanística o precursor alcóxido passa pela sequência de oligômero, polímero, colóide, sol, e termina finalmente no sólido.⁸⁸

Os alcóxidos de silício quando comparados com os demais alcóxidos de metais apresentam uma cinética mais lenta nas reações de gelificação, possibilitando interferências durante a síntese e conseqüentemente permitindo arquitetar o sistema segundo sua aplicação específica.²⁵ Então, sendo as reações de gelificação de alcóxido de silício muito lentas, comumente são adicionados catalisadores, que em geral são classificados como ácidos e básicos.^{25,86} A natureza do catalisador, ácido ou básico, influencia fortemente na cinética da reação, bem como na estrutura final do gel.²⁵ Se o processo de gelificação ocorrer em meio ácido resultará em cadeias que se unem para formar géis poliméricos, que após a secagem originam uma matriz com baixo volume de poros, cujo o tamanho é, geralmente, inferior a 2 nm de diâmetro, os quais são conhecidos como microporos.^{25,89} No entanto, se o processo de gelificação do material ocorrer em meio básico são obtidas partículas primárias esféricas. Desta forma, o gel resultante da interconexão dessas partículas primárias, chamado de gel coloidal, que após a secagem resultará em uma matriz com maior porosidade que o gel polimérico, com largas frações de poros com diâmetros entre 2 e 50 nm, conhecidos com mesoporos.^{25,89}

O processo sol-gel é relativamente complexo, envolvendo diversas variáveis, como o tempo e a temperatura de reação, natureza do catalisador, concentração dos reagentes, condições das etapas de envelhecimento, lavagem e secagem, entre outros.^{82,86} Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação dos grupos reativos, densidade de reticulação, homogeneidade do produto, etc. Além disso, aditivos químicos podem ser utilizados para melhorar o processo e obter materiais com propriedades aprimoradas.^{82,86}

3.5. Materiais Híbridos a Base de Sílica

Há alguns anos as tecnologias desenvolvidas requerem novas propriedades dos materiais dos quais são constituídas. Desta forma, nas últimas décadas a combinação de propriedades de compostos orgânicos e inorgânicos constituintes de materiais híbridos vem sendo estudada a fim de produzir novos materiais multifuncionais, com larga faixa de aplicação. Um dos mais antigos materiais originado por componentes orgânico e inorgânico provém da indústria de tintas, onde eram adicionados pigmentos inorgânicos em misturas orgânicas, no entanto nesta época o termo “híbrido orgânico-inorgânico” ainda não era utilizado.^{86,90} Este termo começou a ser disseminado há quase 30 anos com o desenvolvimento de silicatos organicamente modificados (ORMOSIL).^{82,91}

Os materiais híbridos orgânico-inorgânicos são constituídos pela combinação no nível molecular de componentes orgânicos e inorgânicos que, normalmente, apresentam propriedades complementares, dando origem a um único material com propriedades diferentes daquelas que lhe deram origem,^{25,86,92} ou seja, existe um sinergismo que ocorre a partir da proximidade das duas fases através do efeito das dimensões dos domínios e da natureza das interfaces.^{86, 92}

Em geral, para alcançar o nível de dispersão molecular dos componentes orgânico-inorgânico é utilizado o método sol-gel de síntese, que envolve o processo de formação de uma rede polimérica inorgânica através de reações de gelificação a baixas temperaturas.^{25,92} Na síntese dos materiais híbridos à base de sílica o processo de gelificação envolve a adição de precursores do componente orgânico e do componente inorgânico, tornando o sistema mais complexo que a sílica pura obtida pelo processo de gelificação de precursores inorgânicos.²⁵

Como as fases orgânica e inorgânica apresentam dimensões moleculares, a influência da interface é muito significativa, e a natureza desta vem sendo utilizada para classificar os híbridos em diferentes classes.⁸⁶ Geralmente, os materiais híbridos podem ser classificados em três classes. A diferença entre elas é baseada na força de interação entre os componentes orgânicos e inorgânicos.⁹²

Classe I: estes híbridos apresentam tipicamente interações fracas entre o componente orgânico e a rede inorgânica, tais como van der Waals, ligação de hidrogênio ou interações eletrostáticas fracas, estas interações são representadas na Figura 11a.^{25,86, 92} O processo de sua obtenção envolve a adição de precursores

moleculares orgânicos não polimerizáveis, os quais não participam diretamente das reações de gelificação.^{25,92}

Classe II: estes materiais híbridos são constituídos por estruturas nas quais os componentes orgânico-inorgânicos estão ligados de forma covalente ou iônico-covalente, esta estrutura está representada pela Figura 11b.^{25,86, 92} Na síntese desta classe de híbridos são utilizados como precursores do componente orgânico organossilanos polimerizáveis, que apresentam um ou mais grupos orgânicos ligados diretamente ao silício, em uma ligação Si-C não hidrolisável.²⁵

Classe III: esta classe de híbridos é baseada na combinação das interações presentes nas classes I e II. Um exemplo deste híbrido é o material obtido por um polímero orgânico contendo grupos alcoxissilanos hidrolisáveis, e grupos aceptores de hidrogênio (carbonila, amina, imida, entre outros).⁸⁶ Este material é representado na Figura 11c.

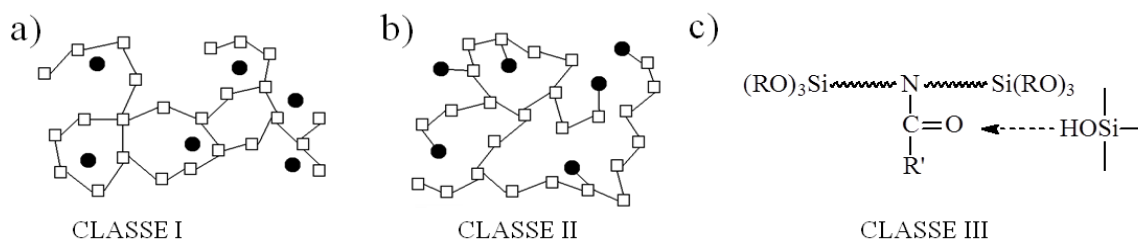


Figura 11. Representação das classes de materiais híbridos. (Adaptação das referências 25 e 86)

Os híbridos de classe II ainda podem ser divididos em duas subclasses, representadas na Figura 12: (a) aqueles que os componentes orgânicos apresentam somente um ponto de polimerização, resultando em um híbrido com o componente orgânico preso de forma pendente na matriz inorgânica.²⁵ (b) os híbridos que contenham precursores do componente orgânico que apresentem dois ou mais pontos de polimerização. Desta forma, são obtidos híbridos com o componente orgânico preso à rede inorgânica formando pontes.²⁵ A forma como os grupos orgânicos estão dispostos na rede tridimensional interfere diretamente nas suas propriedades, tais como organização, temperatura de decomposição, entre outros.^{25,86}

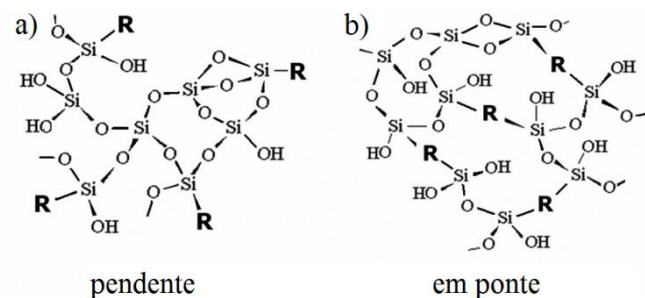


Figura 12. Representação de tipos de híbrido de classe II. (Referência 25)

Os materiais híbridos são muito utilizados na área médica e farmacológica pois os mesmos são sintetizados a temperaturas brandas, bem como, apresentam biocompatibilidade.^{25,93,94,95} Considerando que estes materiais sejam produzidos por método sol-gel são obtidos híbridos porosos, tal propriedade eleva a área superficial do material e o torna promissor na sua aplicação como adsorventes e catalisadores.^{96,97,98} Devido estes materiais apresentarem propriedades versáteis a gama de aplicação dos híbridos orgânico-inorgânicos torna-se muito ampla.

3.5.1. Silsesquioxanos

Os materiais híbridos à base de sílica podem apresentar precursores inorgânicos que apresentem diferentes proporções de componente orgânico, como representado na Figura 13. Os precursores dos componentes inorgânicos dos híbridos de classe II são denominados siloxanos, os quais apresentam o átomo de silício ligado a um ou mais substituintes orgânicos e ao menos um oxigênio.⁸⁶ Os siloxanos podem ser constituídos por unidades M ($\text{SiR}_3\text{OR}'$), unidades D ($\text{SiR}_2(\text{OR}')_2$) e unidades T ($\text{SiR}(\text{OR}')_3$), os quais apresentam respectivamente três, dois e um substituinte orgânico (ou átomo de hidrogênio) ligado diretamente ao átomo de silício, como mostra a Figura 13.⁸⁶ Estas espécies também são conhecidas como organossilanos.⁹⁹

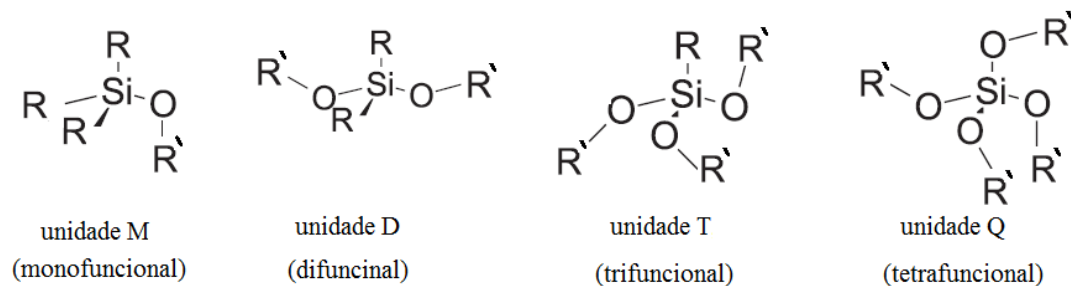


Figura 13. Fórmulas estruturais dos oligômeros constituintes dos componentes inorgânicos dos híbridos à base de sílica. (Adaptação da referência 86)

Geralmente os materiais híbridos à base de sílica são obtidos pelo método sol-gel de síntese. Desta forma, se no processo de gelificação foram adicionados somente precursores organossilanos será produzido um silsesquioxano, o qual pode apresentar elevado conteúdo orgânico dependendo da natureza do organossilano utilizado.²⁵ O grupo orgânico do organossilano pode estar ligado de forma pendente, ou também entre dois átomos de silício formando uma ponte, como representado na Figura 12.

Além da forma como os grupos orgânicos estão dispostos na rede inorgânica, o grau de reticulação da rede também é um fator que interfere nas propriedades do material híbrido resultante. Se um grupo alcóxido (OR') é substituído por um grupo não hidrolisável (grupos R), então o grau de reticulação da rede inorgânica irá diminuir. Assim, a variação do conteúdo orgânico e do grau de reticulação leva a alterações na dureza, estabilidade térmica e solubilidade do material híbrido obtido.^{99,100}

Em geral, os silsesquioxanos podem assumir três tipos de estrutura, como representado na Figura 14: (a) aleatória, onde os oligômeros não apresentam arranjos ordenados;²⁵ (b) bidimensionais, que podem mostrar-se arranjos em camadas;^{25,101,102} (c) tridimensionais, os quais são conhecidos como Poliedros Oligoméricos de Silsesquioxanos (POSS - Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane).^{25,103}

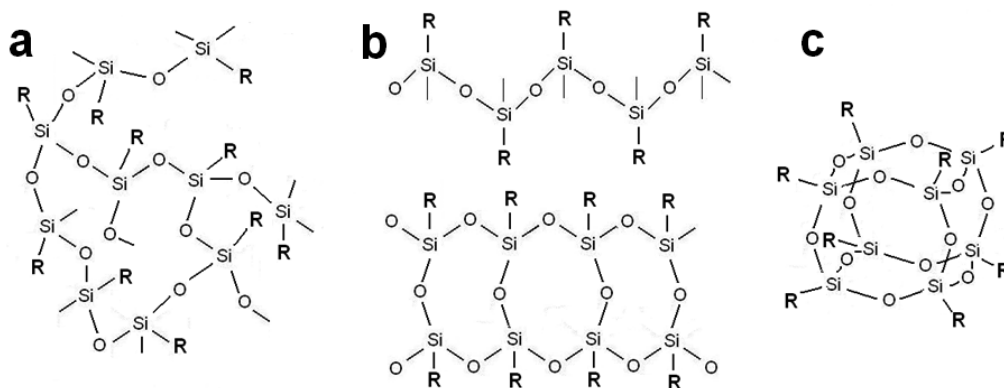


Figura 14. Estruturas de silsesquioxanos: a) aleatória; b) ordenação bidimensional; c) ordenação tridimensional do tipo POSS. (Referência 25)

Os silsesquioxanos apresentam uma ampla gama de aplicações, podendo ser utilizados, por exemplo, em revestimentos de superfícies protetoras,¹⁰⁴ devido a sua afinidade por matrizes inorgânicas, em resinas dentárias, pois apresenta biocompatibilidade e dureza,¹⁰⁵ e até na estabilização estérea e eletrostática (caso o híbrido apresente cargas) de nanopartículas metálicas.²¹

Os silsesquioxanos foram desenvolvidos há 60 anos e desde então muitas aplicações foram encontradas. O primeiro silsesquioxano foi um silicone comercializado para ser utilizado como um material de isolamento elétrico de alta temperatura.⁹⁹ Nos últimos anos, alguns silsesquioxanos vem emergindo como materiais de baixa constante dielétrica utilizados para interligar dispositivos microeletrônicos devido às suas excelentes propriedades térmicas e elétricas.^{103,106,107}

Na última década, o Grupo de Pesquisa do Laboratório de Sólidos e Superfícies – UFRGS vem desenvolvendo uma série de novos silsesquioxanos que apresentam como componentes orgânicos grupos catiônicos na forma pendente (Figura 15a) e em ponte (Figura 15b).

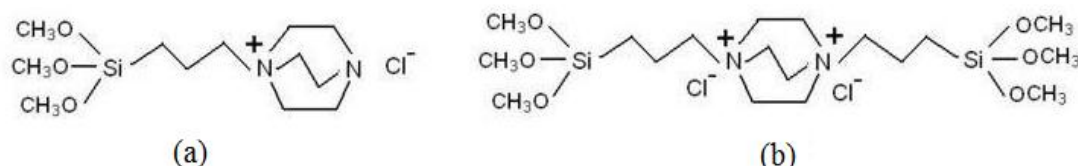


Figura 15. Precursores organossilanos desenvolvidos no Grupo de Pesquisa do Laboratório de Sólidos e Superfícies, nas formas (a) pendente, o precursor 1-azonia-4-azabicyclo[2,2,2]octano e (b) em ponte, o precursor 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano.

A utilização de grupos orgânicos catiônicos deu origem aos silsesquioxanos iônicos, os quais apresentam elevada solubilidade em solventes com constantes dielétricas elevadas como água, etanol e acetona.^{21,25} Estes híbridos têm sido utilizados na estabilização de nanopartículas metálicas em meio aquoso, bem como, na produção de filmes finos.^{21,108}

3.6. Filmes Finos

Nas últimas décadas a pesquisa acerca de filmes finos vem se destacando pois estas matérias possuem uma ampla gama de aplicações, incluindo a catálise,¹⁰⁹ revestimentos antimicrobianos,¹¹⁰ dispositivos ópticos¹⁰⁸ e microeletrônicos,¹¹¹ conversão e armazenamento de energia eletroquímica.¹¹² Em geral, os filmes finos que apresentam tais potenciais utilizações contêm nanopartículas de metais ou de semicondutores,^{109,113} pois a escala nanométrica destas partículas atribui às mesmas propriedades únicas, como foi discutido em tópicos anteriores.

Existem inúmeras técnicas de produção de filmes finos contendo nanopartículas metálicas ou de semicondutores, entre elas estão aquelas baseadas no processo sol-gel, que permitem a introdução de grandes quantidades de nanopartículas no filme.¹¹³ Dentre estes processos estão as técnicas de *spin-coating*,¹¹³ *dip-coating*⁶⁵ e *casting*¹¹⁴. A técnica de *spin-coating* é mais empregada para a obtenção de filmes finos, pois a mesma produz filmes com espessura homogênea ao longo de quase todo substrato, no entanto para aplicação desta técnica é necessário que seja realizado sobre um substrato plano e com geometria circular, ou mais próxima possível deste formato. Caso estas necessidades não forem atendidas técnicas como *dip-coating* e a *casting* são utilizadas para a obtenção dos filmes finos. O método *dip-coating* permite o recobrimento de substratos não planares e com grandes dimensões. Neste método, o substrato é imerso na solução da amostra, e posteriormente o substrato é suspenso para a evaporação do solvente.¹¹⁵ Já o método de *casting* é baseado no espalhamento da solução da amostra sobre um substrato, após a evaporação do solvente utilizado o filme é formado sobre a superfície do substrato e pode ser removida, formando um filme autossustentado.¹¹⁶

3.6.1. Filmes finos de silsesquioxanos

Os silsesquioxanos são capazes de formar filmes finos sobre matrizes inorgânicas tais como titânia, alumina e sílica.^{59,29} Esta propriedade deve-se a ligação covalente que ocorre entre os grupos –OH, presentes na superfície do substrato, e os grupos Si-OH, disponíveis neste híbrido a base de sílica, como representado na Figura 16. Os grupos silanóis responsáveis por esta ligação são remanescentes da reticulação incompleta do silsesquioxano.^{29,117,118}

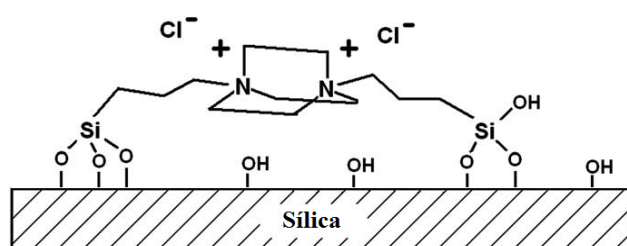


Figura 16. Representação da ligação do silsesquioxano iônico com o substrato de lâmina de vidro.
(Adaptado da referência 29)

Os filmes de silsesquioxanos podem ser utilizados em dispositivos ópticos e microeletrônicos, visto que apresentem baixo espalhamento de luz visível¹⁰⁸ e baixa constante dielétrica¹¹¹, bem como em embalagens hospitalares e de alimentos, pois caso contenham grupos amônio quaternários são obtidos filmes com propriedades antimicrobiológicas.¹¹⁹ Os silsesquioxanos também podem ser combinados com polímeros orgânicos, a fim de formar compósitos ultrafinos. A presença deste híbrido à base de sílica atribui ao compósito uma maior estabilidade térmica e mecânica devido às ligações Si-O-Si da sílica formada.^{111,120}

3.6.2. Filmes finos de nanopartículas de prata

Os filmes finos de nanopartículas de prata podem ser obtidos em substratos inorgânicos a partir de diferentes métodos, os quais incluem implantação de íons, *sputtering*, deposição por vapor químico, troca iônica e por métodos sol-gel. Os métodos sol-gel são muito utilizados pois permitem o controle fácil e independente das

propriedades microestruturais e físicas tanto da matriz de sílica quanto das AgNPs.¹¹⁰ Além disso, outra vantagem apresentada por estes métodos é de ser de baixo custo em relação aos demais métodos e mostra-se de fácil processamento.¹¹⁰

Algumas propriedades dos sistemas de dispersão de AgNPs também são observadas nos filmes de nanopartículas de prata. Uma destas propriedades é a absorção de luz com comprimentos de onda próximos de 400 nm, atribuindo ao filme a cor amarelada. No entanto, devido ao aumento do grau de agregação das partículas no meio sólido, os acoplamentos entre os plasmas das nanopartículas aumentam em função da proximidade entre elas, causando deslocamentos dos fótons absorvidos para regiões com energias menores.¹²¹ Outra propriedade mantida são as atividades antimicrobianas deste sistema, que em geral são provenientes da migração das nanopartículas e íons de prata para o meio aquoso, onde entram em contato com os micro-organismos.¹¹⁰

Os filmes de AgNPs são amplamente utilizado na ampliação do sinal de moléculas orgânicas no espectro Raman,^{68,122} na fotocatalise quando suportadas em TiO₂,¹⁰⁹ e como agentes antimicrobianos em revestimentos de embalagens alimentícias e equipamentos de uso hospitalar.^{123,124} Neste contexto, a utilização de agentes antibacterianos como as AgNPs no revestimento destes materiais pode prevenir a contaminação dos mesmos e conseqüentemente diminuir a incidência de casos de infecções hospitalares, as quais são geralmente causadas por contaminações das superfície de equipamentos, utensílios e próteses ocorrem, as quais ocorrem pela formação de colônias bacterianas das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.¹²⁵

PARTE EXPERIMENTAL



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais

3-cloropropiltrimetoxissilano (CPTMS), 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano (DABCO) e N,N-dimetilformamida foram comprados da Aldrich. Metanol e ácido fluorídrico foram comprados da Merck. Formamida, nitrato de prata e borohidreto de sódio foram comprados da Vetec e o nitrato de sódio foi obtido da Neon. Caldo de crescimento bacteriano foi comprado da Merck. Meio de cultura celular (DMEM) e os suplementos (soro de vitelo fetal e penicilina /estreptomicina) foram comprados da Invitrogen (USA). Ácido nítrico 65% foi comprado da Grupo Química e ácido clorídrico foi comprado da Merck. Hidróxido de sódio foi comprado da F. Maia. Caldo Trípico de Soja (TSB) e Caldo BHI (Brain Heart Infusion) foram comprados da Merck. Lâminas de vidro foram compradas da Precision *Glass Line* com dimensões de 26,0 × 76,0 mm e com espessura de 1,0 a 1,2 mm.

4.2. Preparação do Estabilizante

Inicialmente a síntese do organossilano cloreto de 1,4-bis-3-(propiltrimetoxissilano)diazoniabicyclo[2,2,2]octano foi feita utilizando-se 30 mmol (5,605 g) de 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano (DABCO) o qual foi dissolvido em 40 mL de N,N-dimetilformamida, sob atmosfera de argônio. Posteriormente, foram adicionados 60 mmol (11,4 mL) de 3-cloropropiltrimetoxissilano (CPTMS). Esta mistura foi aquecida na temperatura de 75 °C, em agitação por 72 h, e sob atmosfera inerte até a formação de um sólido branco (Figura 17 A). Esse sólido foi lavado com metanol e posteriormente seco por 2 h a 70 °C. O sólido obtido é o organossilano precursor do componente orgânico do material híbrido.¹²⁶ Na síntese do silsesquioxano, 4,0 g do organossilano precursor cloreto de di-3-(propiltrimetoxissilano)1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano foi dissolvido em 40 mL de formamida, sob constante agitação. Após adicionou-se 0,8 mL de água e 5 gotas de ácido fluorídrico, sob agitação e aquecimento de 70 °C. Após a total homogeneização do sistema, colocou-se o mesmo em repouso, sob atmosfera aberta e aquecimento constante de 40 °C, onde ocorreu a

etapa de gelificação e evaporação do solvente. O sólido resultante é o silsesquioxano cloreto de 1,4-bis-(3-propilsilil)diazoniabicyclo[2,2,2]octano, aqui designado de SiDbCl₂ (Figura 17 B).¹²⁶

A preparação do silsesquioxano que contém o grupo catiônico 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano e o contra íon nitrato [SiDb(NO₃)₂] foi feita a partir da troca iônica dos íons cloreto por íons nitrato (Figura 17 C). O SiDbCl₂ foi lavado com uma solução de NaNO₃ 1 molL⁻¹ na temperatura inferior a 10 °C. A baixa temperatura diminui a solubilidade do SiDbCl₂ em água, permitindo assim a troca dos contra íons por lavagem. O material obtido foi seco sob vácuo e a eficiência da troca iônica foi avaliada por titulação potenciométrica.

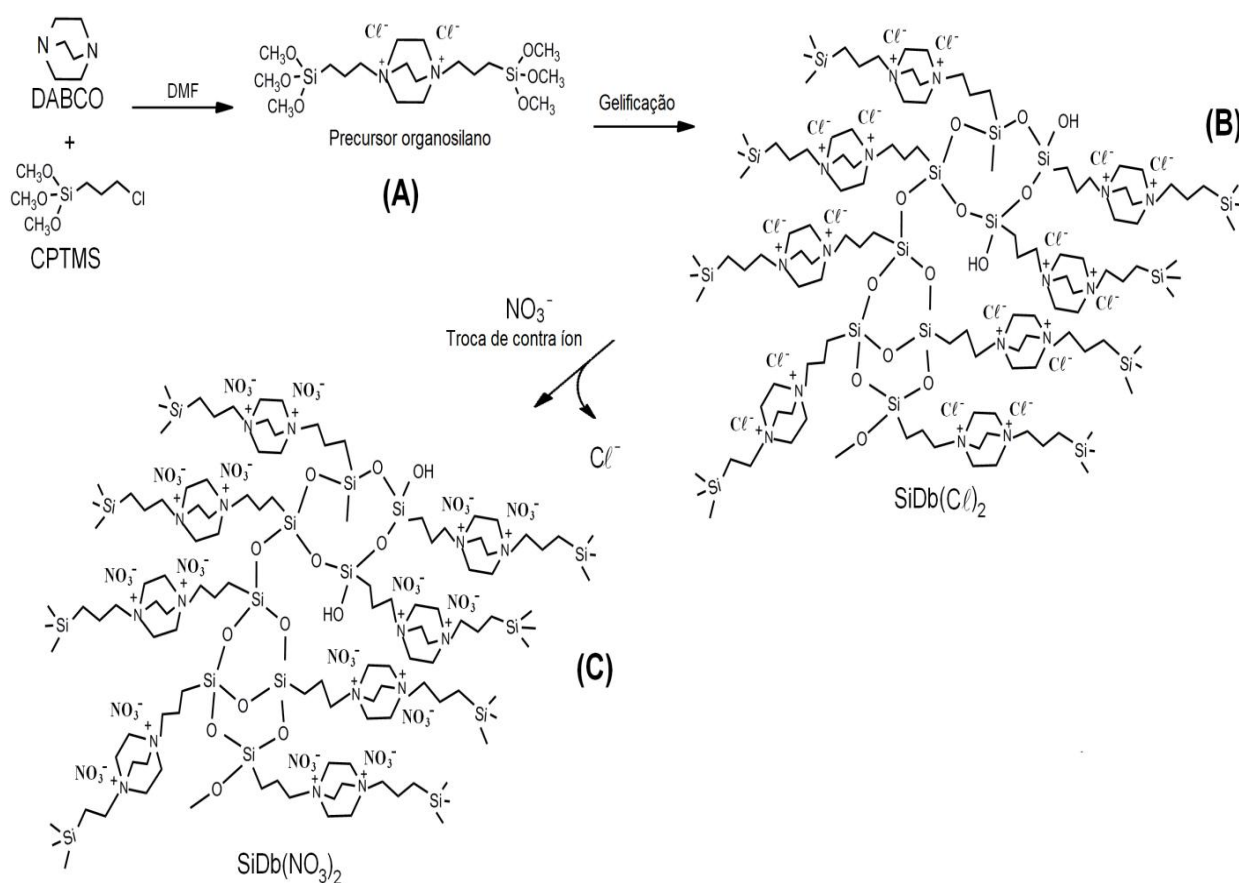


Figura 17. Representação esquemática da síntese do SiDb(NO₃)₂.

4.3. Preparação de Dispersões de AgNPs

Primeiramente foram dissolvidos 100 mg do agente estabilizante $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$ em 10 mL de água, na temperatura de 65 °C e agitação eventual, por cerca de 3 h. Após a dissolução do estabilizante, foi adicionado como precursor metálico 1 mL de AgNO_3 $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, $1,5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, as quais foram denominadas dispersões A, B, C e D de AgNPs, respectivamente. Por fim, foram adicionados 5 mL de NaBH_4 $0,02 \text{ molL}^{-1}$, recentemente preparados, como agente redutor.

4.4. Preparação de Filmes Finos de AgNPs

Utilizou-se como substrato lâminas de vidro sinterizado, que foram submetidas a um processo de limpeza e ativação da superfície. Este processo permitiu o posterior recobrimento das lâminas de vidro com as dispersões de AgNPs.

4.4.1. Limpeza e ativação do substrato

Primeiramente, os substratos de lâminas de vidro foram lavados com acetona, após as mesmas foram deixadas imersas em uma solução de NaOH 1 molL^{-1} por 3 h na temperatura de 65 °C. Posteriormente, as lâminas de vidro foram deixadas no ultrassom (CFU 800A, 25 Hz) por 1 h, na temperatura ambiente e em contato com uma solução de HCl 1 molL^{-1} . Por fim, os substratos foram secos com jato de nitrogênio para posterior recobrimento.

4.4.2. Preparação dos filmes finos de AgNPs por *Dip-coating*

Nesta técnica os substratos de vidro tratados foram recobertos pelas dispersões B e C de AgNPs, onde os mesmos foram submetidos a 12 imersões nas dispersões de AgNPs, ou no branco (sem AgNPs) na velocidade de $2,7 \text{ mm.s}^{-1}$, ocorridas no intervalo de 32 min. para que ocorresse a secagem do solvente.

Os filmes obtidos pelas dispersões B e C de AgNPs foram denominados de Filme B e Filme C, respectivamente.

4.5. Caracterização

4.5.1. Difração de Raios X (DRX)

Na análise de difração de raios X das amostras na forma de pó, foi utilizado um difratômetro Siemens modelo D500 usando como fonte de raios X $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0.154056$ nm), e um gerador de tensão e de corrente de 40 kV e 1,75 mA, respectivamente.

4.5.2. Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido (RMN de ^{13}C e ^{29}Si)

Os espectros de ^{13}C e ^{29}Si no estado sólido foram obtidos por RMN CP/MAS (polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico) utilizando-se um espectrômetro Varian500-vnmrs. As medições foram feitas utilizando o comprimento de pulso de 16 ms de atraso e de reciclo de 5 s.

4.5.3. Espectroscopia na Região do UV-Vis no estado líquido

Os espectros de UV-Visível das dispersões aquosas de AgNPs foram obtidos entre 300 e 800 nm, na temperatura ambiente, utilizando um espectrofotômetro UV-160 1PC Shimadzu, e água destilada como amostra de referência.

4.5.4. Espectroscopia na Região do UV-Vis nos filmes finos

Os espectros de refletância total com esfera integradora e transmitância na região do UV-Vis dos filmes com e sem AgNPs foram obtidos utilizando um espectrofotômetro com duplo feixe da VARIAN modelo CARY 5000, onde analisou-se a janela espectral de 350 nm a 800 nm. A porcentagem de luz absorvida pelos filmes sem AgNPs ($\%Abs_{(branco)}$), bem como, pelos filmes com AgNPs ($\%Abs_{(amostra)}$), foram calculados usando a expressão:

$$(\%)\text{Abs} = 100 - (\%)\text{T} - (\%)\text{R}$$

Equação 2

As absorbâncias devido somente às AgNPs ($(\%) \Delta Abs_{(AgNPs)}$) foram obtidas pela equação abaixo:

$$(\%) \Delta Abs_{(AgNPs)} = (\%) Abs_{(amostra)} - (\%) Abs_{(branco)} \quad \text{Equação 3.}$$

4.5.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) das dispersões aquosas e dos filmes de AgNPs foram obtidas utilizando-se um microscópio JEOL JEM-1220, operando em 120 kV. As amostras das dispersões aquosas de AgNPs utilizadas para as imagens de TEM foram preparadas adicionando duas gotas sobre uma grid de Cu revestido com carbono, seguida de secagem em condições ambientes. As amostras dos filmes finos foram obtidas a partir da raspagem dos mesmos, e posterior dissolução do material em álcool isopropílico em ultrassom por 30 min., duas gotas destas amostras foram adicionadas sobre uma grid de Cu revestido com carbono, após foi realizado o mesmo procedimento relatado para as amostras de dispersões aquosas de AgNPs. As distribuições do tamanho das nanopartículas de prata foram determinadas utilizando o programa de computador Quantikov.

4.5.6. Potencial-zeta

O potencial- ζ da dispersão B de AgNPs e da amostra branco foi determinado em água à temperatura ambiente usando um Analisador de Potencial ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corp.), o qual utiliza análise de fase de espalhamento de luz para medir a mobilidade eletroforética de colóides carregados.¹²⁷ O software então converte esses dados de mobilidade eletroforética em valores de potencial- ζ com base na equação de Smoluchowski, apresentada abaixo:

$$\zeta = \frac{4\pi\mu\eta D}{\epsilon_m V} \quad \text{Equação 4.}$$

Onde μ é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade da solução, ϵ_m é a constante dielétrica do meio, D é a separação entre os eletrodos, V é a voltagem aplicada e ζ é o potencial zeta da amostra.¹²⁸

Para realizar o ajuste de pH da dispersão de AgNPs e da amostra branco (sem AgNPs), foram utilizadas soluções de ácido nítrico e hidróxido de sódio nas concentrações 0,1 mol L⁻¹ e 0,01 mol L⁻¹.

4.5.7. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de Microscopia de Força Atômica foram obtidas utilizando um SPM Agilent Technologies modelo 5500 em modo acústico. As ponteiros utilizadas eram de silício (10 nm de diâmetro de vértice), com constante nominal de mola de 40 N/m e frequência de ressonância de 142 kHz. A razão entre a amplitude de oscilação livre e a amplitude mantida durante uma varredura foi constante e próximas a 50 %, minimizando os efeitos da adesividade e maximizando os efeitos da viscoelasticidade. Foram obtidas imagens de 1 μm \times 1 μm , as quais foram analisadas pelo software WSxM.¹²⁹ As lâminas de vidro recobertas com os filmes branco (sem AgNPs) e com AgNPs foram colocadas diretamente no porta amostra.

4.5.8. Elipsometria

As espessuras dos filmes obtidos por *dip-coating* foram determinadas utilizando um Elipsômetro Espectral SOPRA GES-5E, no qual é utilizado um polarizador que gira em uma frequência constante de 5 Hz, criando uma polarização circular para a luz incidente, e um analisador que maximiza a refletância de luz. O software Win Elli foi utilizado para modelar o filme e obter as constantes do mesmo com base nos dados obtidos da polarização da luz após esta interagir com o filme.

4.5.9. Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS)

As análises de XPS foram realizadas para amostras da dispersão B de AgNPs seca utilizando um hemisfério Specs VSW HA 100 espectrômetro, com 20 h de tempo de aquisição. Os espectros foram corrigidos assumindo os valores 103,4 eV para a energia de ligação do Si 2p e/ou 284,6 eV para o pico 1s do carbono.

4.6. Testes de Atividade Antibacteriana da Dispersão B de AgNPs

As propriedades antibacterianas do SiDb(NO₃)₂ da dispersão B de AgNPs foram avaliadas utilizando as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923), *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, ATCC 25922). Também foram avaliadas as propriedades antibacterianas de uma solução branco, que contém todos os componentes da dispersão B, exceto as nanopartículas. As culturas foram realizadas em Caldo Trípico de Soja (TSB, Merck) na concentração de 1×10^8 CFU mL⁻¹. A inibição do crescimento das bactérias foi medida por turbidimetria, após 24 h de incubação a 37 °C. A concentração mínima inibitória (MIC) foi definida como a menor concentração de agente antibacteriano capaz de inibir o crescimento da bactéria após 12 h de incubação. Este teste foi realizado em triplicata.

4.7. Ensaio de Citotoxicidade da Dispersão B de AgNPs

A dispersão B de AgNPs e a amostra branco (sem AgNPs), foram submetidas ao teste de citotoxicidade. Para esta análise realizou-se o Teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) usando células de rins de filhotes de hamsters (BHK).¹³⁰ Este teste foi realizado em triplicata.

4.8. Teste de Atividade Antimicrobiana dos Filmes Finos de AgNPs

A atividade antimicrobiana dos Filmes B e C, bem como do filme branco, foram testadas utilizando os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, Rockville MD, USA) e *Escherichia coli* (ATCC 8099, Rockville MD, USA). Foram realizados dois procedimentos para avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes: (I) teste de Zona de Inibição (*Zone of Inhibition - ZoI*), onde é determinada a extensão da liberação dos íons e nanopartículas de prata provenientes dos filmes;¹³¹ (II) ensaio aplicado a revestimento de filmes (*Film Applicator Coating – FAC*), neste ensaio a atividade antimicrobiana é avaliada a partir da incubação direta das células bacterianas sobre os filmes.¹³¹

4.8.1. Teste de atividade antibacteriana por Zona de Inibição (ZoI)

Inicialmente, o pré-inóculo das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi preparado em Caldo BHI (Brain Heart Infusion, Merck), em um tubo de 5 mL. Posteriormente, estes microrganismos foram cultivados no mesmo meio durante 12 h com agitação a 37 °C. Após este período, alíquotas do cultivo tiveram sua absorbância a 600 nm ajustada a 0,2 e foram plaqueadas em BHI-ágar. Em cada placa de BHI-ágar foram colocadas duas amostras de forma quadrada de lado de 2 cm: a amostra do Filme Branco, como controle, e a amostra dos Filmes A ou B, os quais continham as AgNPs. Estas placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h e em seguida analisadas quanto à inibição do crescimento bacteriano (presença de halo de inibição).

4.8.2. Atividade antibacteriana por ensaio aplicado a revestimentos de filmes (FAC)

As atividades antibacterianas dos Filmes B e C e Filme Branco foram avaliadas para os mesmos microrganismos acima citados. Para o ensaio de atividade antimicrobiana cada linhagem bacteriana foi ajustado para 5×10^7 unidades formadoras de colônias (CFU mL⁻¹) em solução salina (0,9%) e em meio TSB (Caldo Tríplico de

Soja). Em seguida, 50 mL da suspensão bacteriana foi aplicada aos Filmes de AgNPs e o controle (Filme Branco), respectivamente. Posteriormente foi realizada a incubação a 37 °C destas amostras em um recipiente mantido úmido durante 24 h. Então, a suspensão bacteriana foi transferida separadamente para tubos contendo uma solução salina esterilizada, sob a forma de diluição em série, seguida pela agitação vigorosa. Em um segundo momento 10 µL de soluções bacterianas das misturas foram espalhadas uniformemente sobre placas de ágar com meio de TSA (Ágar Triptico de Soja). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h.

As células bacterianas viáveis em cada uma das placas foram contadas por quantificação do número de CFU. Cada um dos grupos foi comparado e cada teste foi executado em duplicata. O efeito antibacteriano em cada grupo foi calculado por percentagem de inibição, conforme a equação descrita abaixo:

$$\text{Razão antibacteriana} = \frac{(CFU_{controle} - CFU_{agente\ teste})}{CFU_{controle}} \times 100 \quad \text{Equação 5.}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese e Caracterização do Silsesquioxano Iônico SiDb(NO₃)₂

A síntese do SiDb(NO₃)₂ foi representada na Figura 17. Primeiramente, foi obtido o precursor organossilano iônico em ponte, a partir de uma reação de substituição nucleofílica. Posteriormente, o sistema sofreu o processo de gelificação, formando o silsesquioxano iônico em ponte contendo o grupo catiônico 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano com o contra íon cloreto, e por fim foi realizada a troca iônica do ânion cloreto pelo grupo NO₃⁻. O processo de troca iônica é necessário para evitar a formação de AgCl que apresenta baixo produto de solubilidade.

A concentração de grupos orgânicos contidos no híbrido sintetizado foi determinada por titulação potenciométrica dos íons cloreto, resultando em um valor de aproximadamente 1,25 mmol g⁻¹, em cada síntese.

O difratograma de difração de raios X do SiDb(NO₃)₂, apresentado na Figura 18a revela a presença de três picos com máximos em 2θ igual a 6,3°, 12,5° e 20°. Os dois primeiros picos correspondem a espaçamentos de Bragg de 1,40 e 0,71 nm, que são concordantes com valores obtidos para o SiDbCl₂ (Figura 18b), os quais já foram reportados em estudos anteriores.¹³² Esses picos foram atribuídos a organização da estrutura imposta pela presença do grupo orgânico catiônico.¹³² O pico em 2θ próximo a 20° é característico da sílica amorfa. Considerando este resultado, é possível afirmar que a mudança de contra íon não interfere na organização do material.

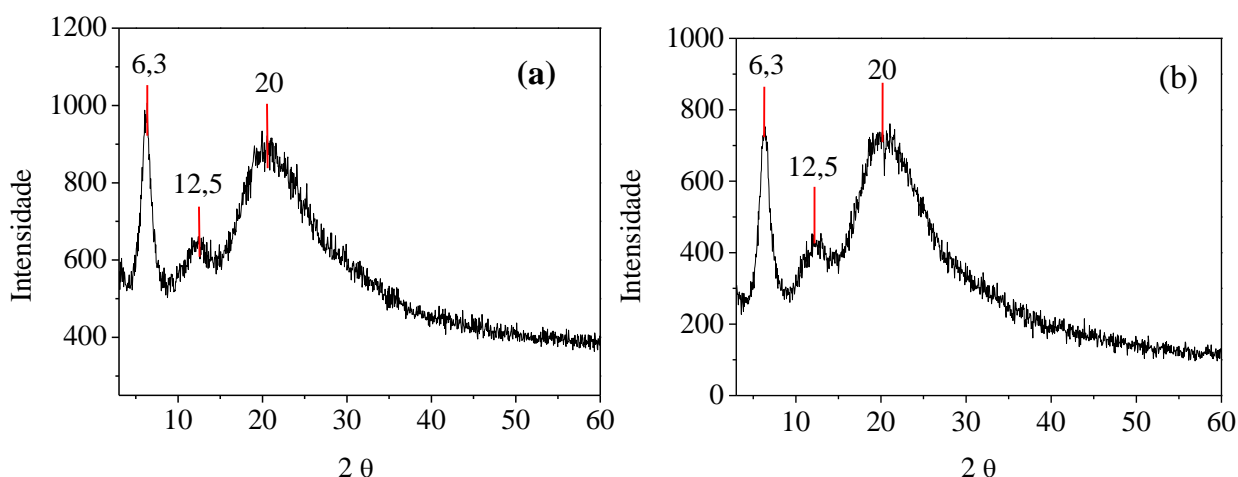


Figura 18. Difractogramas dos silsesquioxanos: (a) SiDb(NO₃)₂ e (b) SiDbCl₂.

O SiDb(NO₃)₂ também foi caracterizado por RMN de ¹³C e ²⁹Si no estado sólido, cujos resultados estão apresentados na Figura 19. O espectro de RMN de ¹³C, apresentado na Figura 19a, mostra sinais em 9,95, 12,0 e 66,5 ppm os quais são referentes aos carbonos do grupo *n*-propil. O sinal em 51,6 ppm corresponde aos carbonos do grupo DABCO, o sinal em 44,9 ppm é referente aos carbonos dos grupos metoxilas que permaneceram mesmo após o processo de gelificação do material. Este resultado é condizente com os estudos desenvolvidos anteriormente para SiDbCl₂.^{108,126,132} O espectro de RMN de ²⁹Si, apresentado na Figura 19b, mostra claramente a presença de dois sinais em -59,1 ppm e -68,5 ppm, que correspondem as espécies T²[CSi*-(OR(OSi)₂] e T³[CSi*-(OSi)₃], respectivamente, indicando que o silsesquioxano iônico SiDb(NO₃)₂ apresenta um alto grau de reticulação.^{126,133,134}

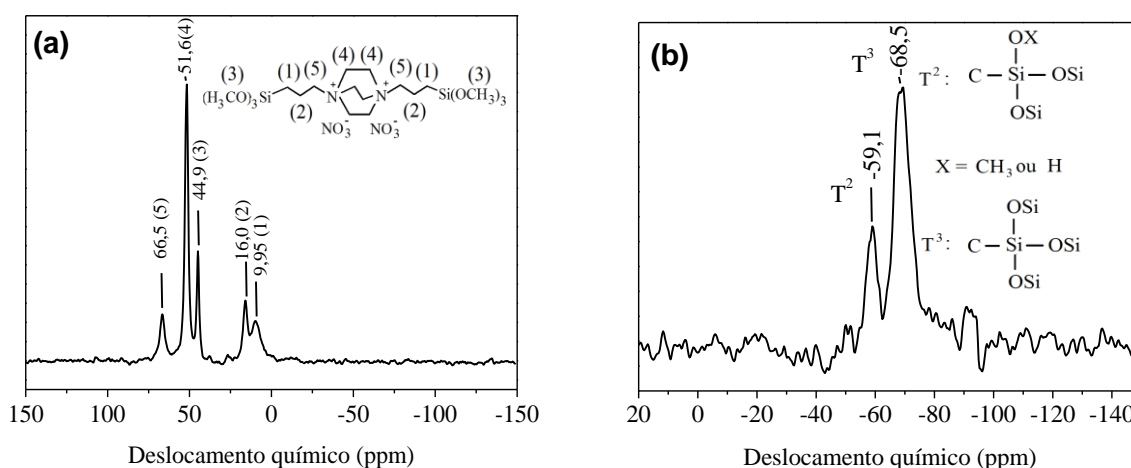


Figura 19. Espectros de RMN de (a) ^{13}C e (b) ^{29}Si do $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$.

5.2. Sistema Nanopartículas de Prata/Silsesquioxano Iônico (AgNPs/SiDb(NO_3) $_2$)

Devido ao $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$ apresentar grupos carregados o mesmo possui uma apreciável solubilidade em meios com constantes dielétricas elevadas como água, etanol e acetona. Este silsesquioxano iônico apresenta uma solubilidade em água de 10 mgmL^{-1} , desta forma permitindo a estabilização de nanopartículas de prata em meio aquoso.

5.2.1. Caracterização das dispersões de AgNPs

As dispersões A, B e C de AgNPs, preparadas na presença de $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$, apresentaram coloração amarela e um máximo de absorção em 407 nm (Figura 20). A presença de um único pico de absorção próximo a 400 nm indica a formação de AgNPs esféricas com diâmetro entre 2-10 nm.^{135,136} A cor das AgNPs deve-se ao fenômeno de Ressonância de Plasmon, no qual os elétrons da nanopartícula metálica oscilam conjuntamente com a radiação eletromagnética da luz incidente.¹³⁷ O pico único de absorção é explicado pela alta simetria das partículas esféricas.^{44,135} A diferença entre as intensidades no eixo de absorbância foi atribuída às diferenças na concentração de

prata nas dispersões. A dispersão D apresentou a formação de precipitado, impossibilitando sua utilização ao longo deste estudo.

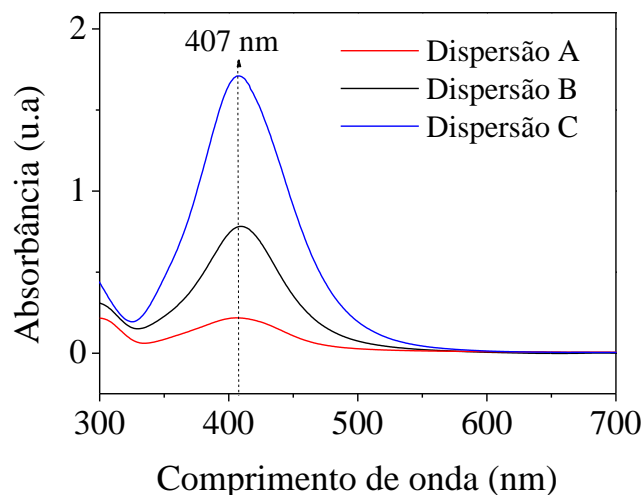


Figura 20. Espectro de absorção na região do UV-Vis das dispersões de AgNPs estabilizadas com $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$.

Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão são apresentadas na Figura 21, juntamente com o histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas. Pode-se observar que o diâmetro médio das AgNPs presentes na dispersão A foi de 5,7 nm com desvio padrão de 2,7 nm, considerando uma população de 301 partículas. Na dispersão B foi de 4,9 nm com desvio padrão de 2,6 nm, considerando uma população de 307 partículas, enquanto que o diâmetro médio das AgNPs presentes na dispersão C foi de 2,8 nm com desvio padrão de 1,3 nm, considerando uma população de 228 partículas. Portanto, os resultados obtidos por TEM mostram a diminuição do diâmetro médio das AgNPs contidas nas dispersões com o aumento da concentração de prata. Esses resultados foram interpretados considerando que na dispersão C foi observada uma pequena população de nanopartículas com diâmetros bem maiores que as demais (Figura 21c). Essas nanopartículas maiores retêm uma grande quantidade de átomos, diminuindo a concentração de prata disponível para formação das demais partículas. Assim, embora as nanopartículas maiores possam conter frações grandes da prata adicionada, em termos de quantidade de nanopartículas, não são estatisticamente representativas.

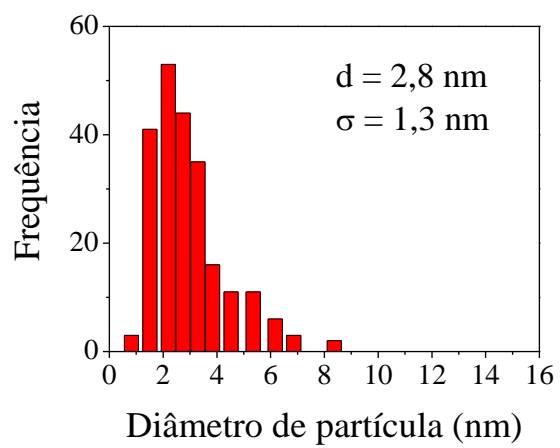
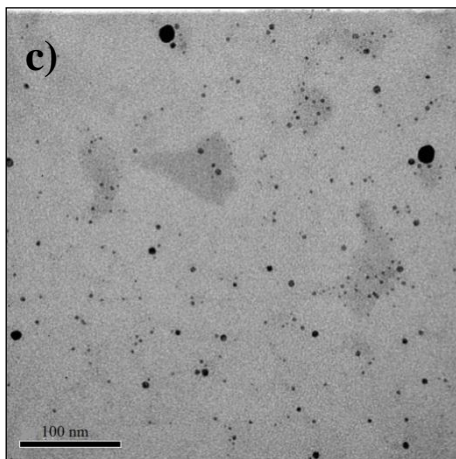
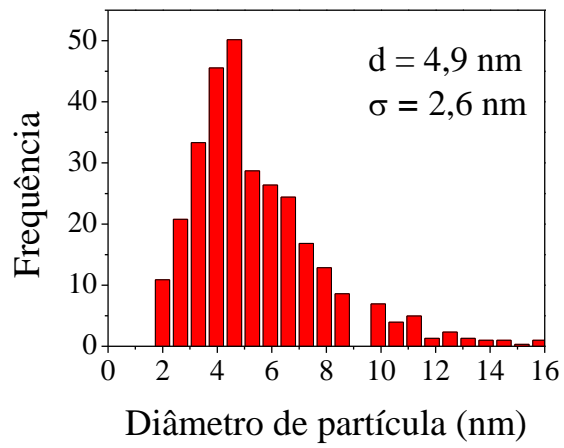
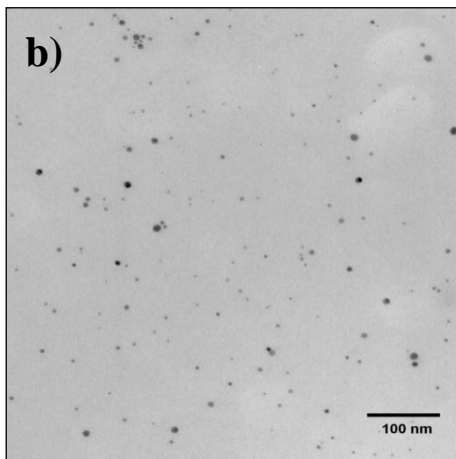
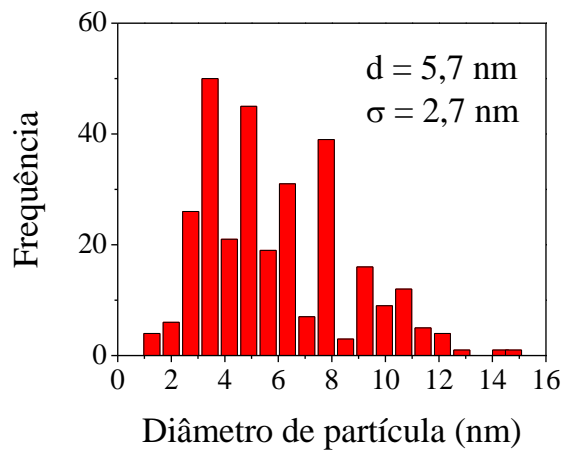
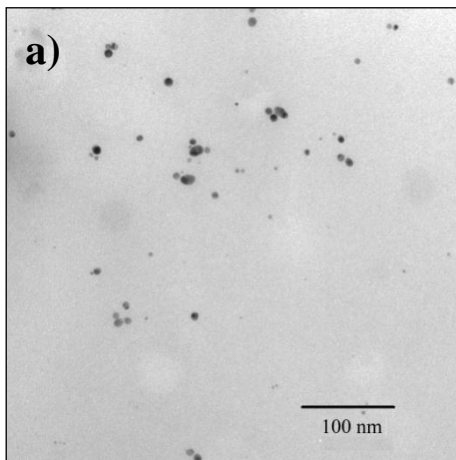


Figura 21. Histograma de distribuição de tamanho das AgNPs e imagens de TEM (a) dispersão A, (b) dispersão B e (c) dispersão C.

A Figura 21 mostra que as AgNPs contidas nas dispersões B e C apresentam maior uniformidade de tamanho se comparadas às partículas presentes na dispersão A. Desta forma, as dispersões B e C foram utilizadas ao longo dos estudos apresentados neste trabalho.

A estabilidade de sistemas coloidais pode ser determinada a partir da análise de seu potencial- ζ , o qual considera a mobilidade eletroforética das partículas sob uma diferença de potencial elétrico.^{138,127} Nesta análise o resultado em módulo indica quão estável termodinamicamente é a partícula, e o sinal matemático (+ ou -) representa o sinal da carga superficial da partícula em estudo. Segundo estudos realizados anteriormente¹²⁸, o mecanismo de estabilização de nanopartículas pode ser sugerido a partir do módulo de seu potencial- ζ . Neste caso, considera-se que partículas com potencial- ζ acima de 25 mV (positivo ou negativo) apresentam superfícies altamente carregadas, e somente acima de 40 mV (positivo ou negativo) é considerado que estas partículas apresentam-se estabilizadas exclusivamente por efeitos eletrostáticos.^{52,139}

Alguns fatores exercem influência sobre o potencial- ζ das partículas coloidais, um delas é a carga apresentada pelo agente estabilizante (caso o mesmo a possua), tal carga pode ser atribuída à superfície da partícula.¹⁹ O pH do meio também é um dos fatores que exerce influência na carga superficial das nanopartículas, por esta razão, o mesmo interfere diretamente na determinação do potencial- ζ .¹⁹

A Tabela 1 apresenta os resultados de potencial- ζ obtidos para a dispersão B de AgNPs e a amostra denominada como branco. Os resultados obtidos mostraram que a dispersão de AgNPs é estável em todos os pH analisados. No entanto, algumas horas após a mudança do pH da dispersão B as amostras com pH 2, 4, 10 e 12 apresentaram alterações na coloração, bem como, observou-se precipitado nas amostras de pH 2 e 4.

Tabela 1. Potencial- ζ (mV) em diferentes pH da dispersão B de AgNPs e amostra branco.

Amostra	pH 2	pH 4	pH 6	pH 7,5	pH 8	pH 10	pH 12
Branco	-4,1±1,4	1,32±0,2	-4,94±1,8	-6,4±1,3	-4,3±1,4	-5,3±1,4	-7,1±1,1
Dispersão B	19,7±2,0	29,0±0,8	24,1±1,1	28,4±0,8	24,6±1,3	15,5±2,0	14,8±1,6

A amostra da dispersão B com pH 6, 7,5 e 8 apresentam valores de potencial- ζ superior a + 20 mV, como mostrado na Tabela 1. Este resultado indica que a carga superficial das partículas é positiva, a qual deve-se provavelmente aos grupos catiônicos amônio quaternários presentes na rede do SiDb(NO₃)₂ (Figura 17C), bem como à provável presença de íons Ag⁺ na superfície das nanopartículas. Portanto, a carga positiva das AgNPs minimiza a agregação das mesmas devido à repulsão eletrostática.¹⁴⁰ No entanto, a estabilização deste sistema não pode ser explicada somente considerando-se o mecanismo eletrostático. A estabilização das AgNPs provavelmente apresenta componentes estéricos, considerando que o agente estabilizante é um polímero, um material híbrido à base de sílica, e que possui ligações Si-O-Si como representado na Figura 17.

A análise de potencial- ζ foi realizada somente para a dispersão B, devido a mesma apresentar menor concentração de prata quando comparada com a dispersão C, visto que, para possíveis aplicações deste sistema como agente antibacteriano deseja-se que a concentração de prata utilizada seja a menor possível. Para posteriores estudos acerca da atividade antibacteriana das dispersões e do branco, optou-se trabalhar com as amostras de pH 7,5, devido à sua estabilidade e proximidade ao pH fisiológico que é 7,35.

5.3. Atividade Antibacteriana do Sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂

A atividade antibacteriana do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ da dispersão B de AgNPs, foi avaliada pela inibição do crescimento de três bactérias: *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Existem dois grupos de bactérias as gram-positivas e Gram-negativas. Dentre as bactérias utilizadas nos testes a *S. aureus* é gram-positiva, enquanto as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* são Gram-negativas, estes tipos de bactérias diferem pela composição de suas paredes celulares. Os resultados da atividade antibacteriana da dispersão B e da amostra branco, que contém todos os componentes da dispersão B exceto as nanopartículas de prata, são apresentados na Tabela 2.

A amostra branco, a qual é definida como amostra A, apresentou atividade antibacteriana para todas as bactérias testadas na diluição 1:4, onde a concentração de grupo orgânico foi 2,3 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. No entanto, todas as bactérias testadas apresentaram resistência a ação da amostra A nas diluições 1:8 e 1:16. A dispersão de AgNPs B, definida como amostra B, apresentou atividade antibacteriana contra todas as bactérias

testadas na diluição 1:4. Na diluição 1:8, a bactéria *P. aeruginosa* apresentou resistência à ação deste sistema, o crescimento das demais bactérias foi inibido pela amostra B nesta diluição. A amostra B, apresentou atividade antibacteriana para a bactéria *S. aureus* também na diluição 1:16, onde a concentração de prata no sistema foi $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Desta forma, estes resultados mostram que a bactéria mais suscetível à ação da dispersão de AgNPs é *S. aureus*, enquanto a *P. aeruginosa* mostrou-se a bactéria mais resistente ao sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂.

Tabela 2. Atividade antibacteriana do sistema branco (A) e sistema com AgNPs (B).

Diluição		1:4		1:8		1:16	
Amostra		A	B	A	B	A	B
Concentração átomos de Ag ($10^{-9} \text{ mol.mL}^{-1}$) / ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			(18,8) / (2,0)		(10,4) / (1,1)		(5,5) / (0,6)
Concentração de grupos catiônicos orgânicos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)		2,3	2,3	1,3	1,3	0,7	0,7
Bactérias	<i>S. aureus</i>	-	-	+	-	+	-
	<i>E. coli</i>	-	-	+	-	+	+
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	+	+	+	+

+ = crescimento das bactérias; - = inibição do crescimento das bactérias; A = branco; B = AgNPs

A diferença de susceptibilidade de inibição entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sob a ação do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂, pode ser explicada pela distinção existente entre as paredes celulares destas bactérias. As membranas celulares atuam como protetores do citoplasma perante o ataque de agentes antibacterianos.⁵⁷ As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular composta por uma fina camada de peptidoglicanos, e não possuem paredes externas. Assim, devido à inexistência de membranas externas a parede celular destas bactérias as mesmas mostram-se mais sensíveis ao ataque de agentes antibacterianos.¹⁴² Por esta razão, a bactéria *S. aureus* apresentou maior susceptibilidade de inibição comparada com as demais bactérias testadas. As bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* apresentaram maior resistência de inibição sob a ação do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ devido a parede

celular das mesmas apresentar maior complexidade. A membrana celular deste tipo de bactéria é composta por duas camadas, uma interna formada por fosfolipídios e uma camada externa constituída por lipopolisacarídeos.¹⁴² A Figura 22 mostra uma representação das paredes celulares de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

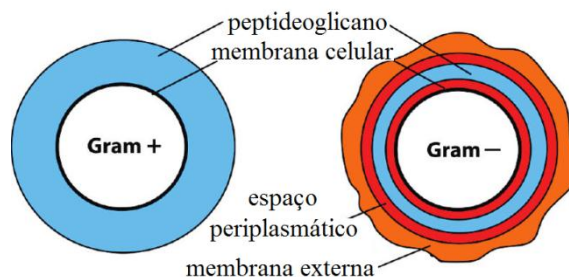


Figura 22. Representação das diferenças entre as membranas externas das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. (Adaptação da referência 143)

A amostra branco (sem AgNPs), também apresenta uma apreciável atividade antibacteriana. Esta propriedade deve-se à presença de grupos amônio quaternários na estrutura do $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$. Trabalhos relatados na literatura mostram que grupos amônio quaternário capturam as bactérias ao seu redor a partir da interação eletrostática entre as cargas do grupo catiônico e os das membranas celulares das bactérias.¹⁴⁴ Foi observado que na presença das AgNPs há um aumento significativo na atividade antibacteriana do sistema. Este resultado pode ser explicado pela interação eletrostática que ocorre entre as nanopartículas, os íons de prata e as membranas celulares das bactérias. Tal interação é atribuída ao potencial- ζ das paredes celulares das bactérias ser negativo em uma ampla faixa de pH^{145,146}, enquanto o potencial- ζ das AgNPs possui sinal positivo. A ampliação da atividade antibacteriana observada para o sistema aquoso de AgNPs/ $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$, sugere a existência de uma ação sinérgica entre o $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$, os íons e as nanopartículas de prata na atividade antibacteriana. Este sistema apresenta resultados promissores frente a outros materiais citados na literatura, pois apresenta resultados comparáveis para *E. coli* e *P. aeruginosa*, e resultados melhores para a bactéria *S. aureus*, visto que produz sua inibição em concentrações inferiores às apresentadas em outros estudos, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Ação comparativa de sistemas de AgNPs contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

AgNPs / sistema estabilizante	Diâmetro médio de partícula (nm)	Espécie bacteriana	Concentração bacteriana (CFU mL ⁻¹)	MIC (10 ⁻⁶ g mL ⁻¹)	Referência
AgNPs / quitosana	6-8	<i>S. aureus</i>	10 ⁵	10,0	(147)
		<i>E. coli</i>		10,0	
AgNPs / Na ⁺ -poli (γ-ácidoglutâmico)	17-37	<i>S. aureus</i>	10 ⁵	1,2	(148)
		<i>P. aeruginosa</i>		2,1	
AgNPs / Na ⁺ dodecil sulfato	24	<i>S. aureus</i>	10 ⁵ - 10 ⁶	259	(149)
		<i>E. coli</i>		259	
		<i>P. aeruginosa</i>		6,58	
AgNPs / Na ⁺ dodecil sulfato	9	<i>S. aureus</i>	10 ⁵ - 10 ⁶	14,38	(149)
		<i>E. coli</i>		14,38	
		<i>P. aeruginosa</i>		14,38	
Ag / Na ⁺ -ácido gálico	20-25	<i>S. aureus</i>	-	0,74	(150)
		<i>E. coli</i>		0,53	
		<i>P. aeruginosa</i>		0,37	
Ag / Na ⁺ -ácido gálico	7	<i>S. aureus</i>	10 ⁵	7,5	(151)
		<i>E. coli</i>		6,25	
Ag / Na ⁺ -ácido gálico	29	<i>S. aureus</i>	10 ⁵	16,67	(151)
		<i>E. coli</i>		13,02	
Ag / Na ⁺ -ácido gálico	89	<i>S. aureus</i>	10 ⁵	33,71	(151)
		<i>E. coli</i>		11,79	
AgNPs / cisteína	14.5	<i>S. aureus</i>	5×10 ⁸	9,72	(152)
		<i>E. coli</i>		4,32	
		<i>P. aeruginosa</i>		6,48	
AgNPs / β-ciclodextrina	4-7	<i>S. aureus</i>	10 ⁶	3,12	(153)
		<i>E. coli</i>		3,12	
		<i>P. aeruginosa</i>		12,5	
AgNPs /copolímero PVO-b-PAN	4-28	<i>S. aureus</i>	10 ⁸	2,88	(154)
		<i>E. coli</i>		0,36	
		<i>P. aeruginosa</i>		0,36	
AgNPs / SiDb(NO ₃) ₂	4.9	<i>S. aureus</i>	10 ⁸	0,60	Este trabalho
		<i>E. coli</i>		1,12	
		<i>P. aeruginosa</i>		2,03	

5.4. Citotoxicidade do Sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂

Visando a aplicação do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ como agente antibacteriano em processos de tratamento de água, bem como, em revestimento de embalagens alimentícias e instrumentos hospitalares (EDILSON), é importante realizar testes citotxicológicos deste material a fim de garantir que sua utilização possa ser realizada com segurança.

O crescimento celular pode ser analisado por testes colorimétricos como o teste de redução do MTT. Este teste permite avaliar a capacidade da enzima succinato desidrogenase de reduzir o substrato de MTT em cristais de formazan na mitocôndria das células. Devido ao formazan ser insolúvel em meio aquoso, é possível detectá-lo, pois o mesmo infere a coloração púrpura ao sistema.²⁰ Os resultados deste teste estão apresentados na Tabela 4, onde pode-se perceber que a citotoxicidade da amostra contendo as AgNPs é mais elevada se comparada com a amostra do branco (sem AgNPs). No entanto, a alta toxicidade é percebida somente na amostra com AgNPs de diluição 1:4, enquanto as demais diluições de ambas amostras apresentam um crescimento relativo das células mamíferas superior à 70%, ou seja, os sistemas apresentam biocompatibilidade em concentrações onde a dispersão B ainda apresenta atividade antibacteriana. Esta avaliação foi realizada considerando o critério da técnica que designa que os materiais que inibem o crescimento de até 30% das células mamíferas são considerados de baixa citotoxicidade.^{134,155}

Tabela 4. Resultados do teste de redução do MTT em presença da amostra com AgNPs e branco.

Amostra	Diluição	[SiDb(NO ₃) ₂] (10 ⁻⁶ molmL ⁻¹)	[AgNPs] (10 ⁻¹² molmL ⁻¹)	Crescimento relativo (%)
Branco	1:4	2,3	--	88
	1:8	1,3	--	100
	1:16	0,7	--	90
	1:32	0,3	--	90
AgNPs	1:4	2,3	5,2	58
	1:8	1,3	2,9	90
	1:16	0,7	1,5	78
	1:32	0,3	0,3	88

Em geral, a citotoxicidade está relacionada com o valor do potencial- ζ , quanto maior o potencial- ζ maior a citotoxicidade.¹⁵⁶ No entanto, apesar do potencial- ζ apresentar-se positivo o sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ mostrou baixa citotoxicidade. Resultados semelhantes já foram relatados anteriormente para outros sistemas de partículas coloidais de AgNPs.^{156,157,158} Possivelmente, a interação entre as cargas positivas do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ e a parede celular das células BHK pode ter sido dificultada pela estrutura do silsesquioxano que apresenta ligações Si-O-Si.

5.5. Filmes Finos de AgNPs/SiDb(NO₃)₂

Além do SiDb(NO₃)₂ apresentar a vantagem de estabilizar AgNPs em meio aquoso e em pH fisiológico, este silsesquioxano iônico também apresenta grupos silanóis que permitem sua aderência química à superfície de matrizes inorgânicas como sílica e alumina.^{59,108} O recobrimento da superfície do substrato ocorre a partir da reação dos grupos silanóis do silsesquioxano com os grupos silanóis da lâmina de vidro.²⁹

Neste trabalho foram utilizadas como substrato lâminas de vidro sinterizado, que foram tratadas com NaOH a fim de remover impurezas e com HCl para ativar os grupos silanóis da superfície do substrato.¹¹⁰

5.6. Caracterização dos Filmes Finos de AgNPs/SiDb(NO₃)₂

As dispersões B e C de AgNPs foram utilizadas para o recobrimento das lâminas de vidro por *dip-coating*, onde foram obtidos filmes de coloração amarela, indicando que as características das AgNPs contidas em ambas as dispersões não foram alteradas após a formação dos filmes. Foram feitas análises de espectroscopia de refletância e transmitância dos filmes provenientes da dispersão B e C, os quais foram denominados, respectivamente, como Filme B e Filme C. A partir das equações 2 e 3 foi possível obter espectros de absorção na região do visível dos filmes analisados.

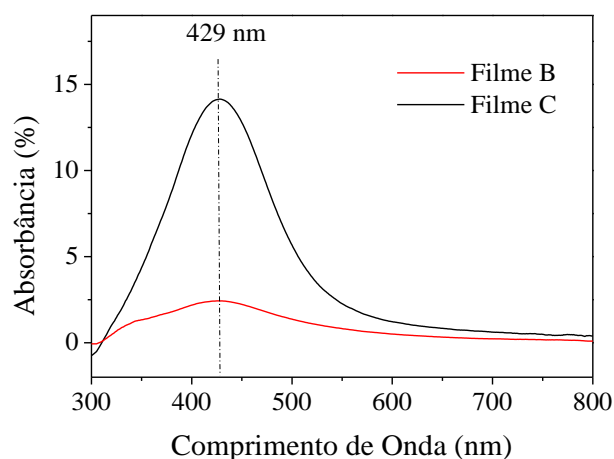


Figura 23. Espectro de absorvância no UV-Vis dos filmes finos do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂.

A Figura 23 mostra que os máximos de absorção de ambos os filmes foram em 429 nm. O deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda maiores dos filmes de AgNPs em relação ao espectro das dispersões de AgNPs, mostradas na Figura 20, foi atribuído ao maior estado de agregação das AgNPs no filme. A agregação de nanopartículas metálicas resulta em diminuição na energia de ressonância de Plasmon, produzindo deslocamentos para maiores comprimentos de onda no espectro.¹²¹

As AgNPs contidas no Filme C estão mostradas nas imagens de TEM na Figura 24. Estas AgNPs apresentam forma esférica com diâmetros entre 1,8 a 15,6 nm. A distribuição de tamanhos das nanopartículas de prata obtidas no Filme C mostrou-se estreita, apresentando um diâmetro médio de 2,9 nm, considerando o desvio padrão de 0,7 nm e população total de AgNPs de 304 partículas. Ao comparar as Figuras 21c e 24, percebe-se que as AgNPs presentes nos filmes apresentaram forma e diâmetro médio semelhantes às nanopartículas de prata contidas na dispersão C. Desta forma, pode-se afirmar que independente do sistema, sólido ou aquoso, as AgNPs mantêm sua forma e tamanho inalterados quando estabilizadas por SiDb(NO₃)₂. Devido à baixa concentração de AgNPs no Filme B, não foi possível obter uma imagem que contivesse uma população significativa de nanopartículas de prata, a partir da qual fosse possível determinar de forma confiável o diâmetro médio delas.

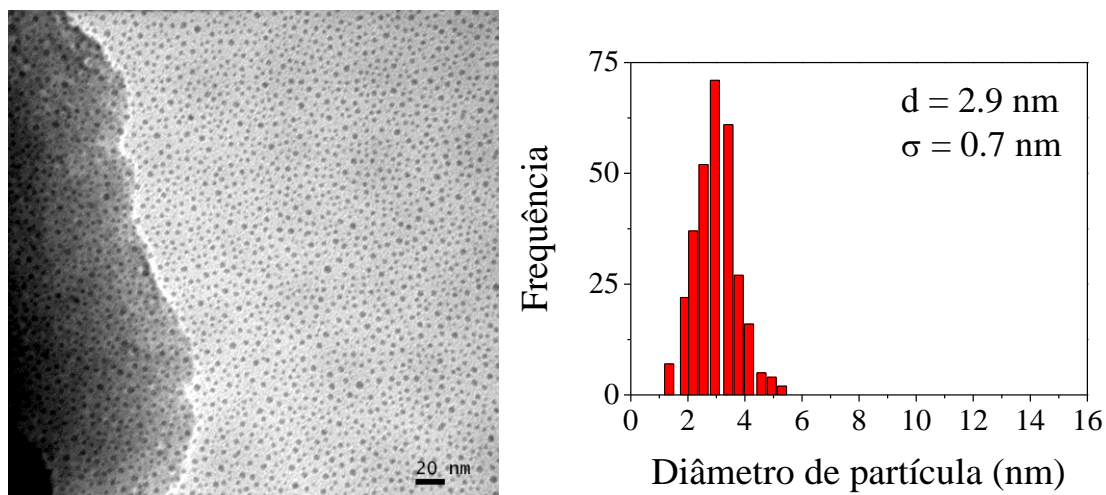


Figura 24. Imagem de TEM e histograma de distribuição do diâmetro de nanopartícula de prata no Filme C.

A Figura 25 mostra os resultados de difração de raios X das amostras dos filmes B e C na forma de pó. Observam-se picos em 2θ iguais a $6,3^\circ$, $12,5^\circ$ e $20,8^\circ$ os quais são referentes ao estabilizante. Comparando-se com a Figura 18a, observa-se que a organização da estrutura do estabilizante mantém-se similar mesmo quando o $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$ está envolvido no processo de estabilização das AgNPs. Os difratogramas apresentam um quarto pico de difração em 2θ igual a $38,9^\circ$ ($d = 0,23 \text{ nm}$), que corresponde ao plano (111) característico do empacotamento cúbico de face centrada apresentado pelas nanopartículas de prata.^{159,160,151}

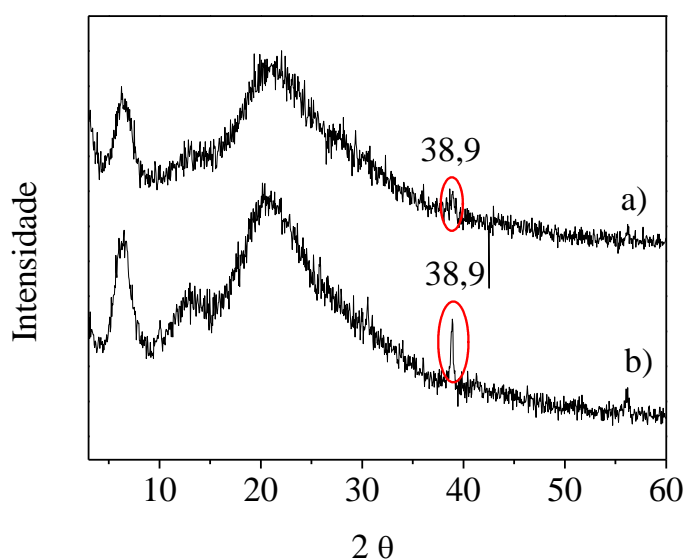


Figura 25. Difratograma de raios X do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂: a) Filme B e b) Filme C.

A Figura 26 mostra as áreas selecionadas no espectro, a partir das quais foram retiradas informações sobre a energia de ligação dos elétrons das espécies de prata presentes nas amostras. Foram detectadas bandas com máximos em 373,9 e 367,6 eV, que são referentes à prata metálica, Ag 3d_{3/2} e Ag 3d_{5/2}, respectivamente.^{161,162} Entretanto, a presença de íons de prata não pode ser descartada, pois a baixa estatística de contagem não permite realizar a deconvolução.

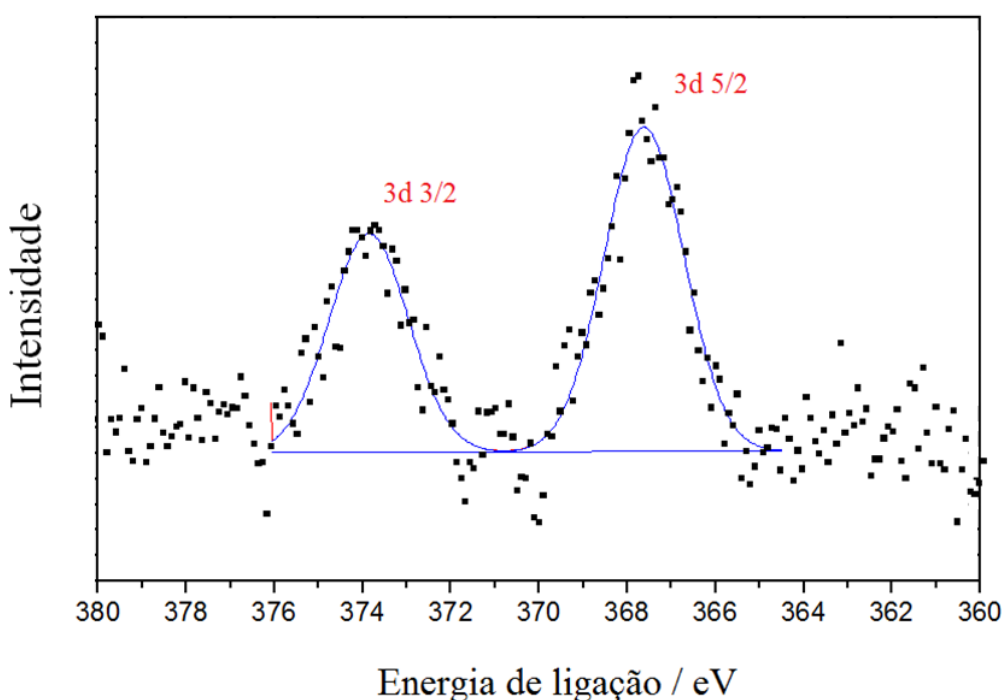


Figura 26. Espectro de XPS para a amostra em pó do Filme B.

As imagens de contraste de fase obtidas por AFM são mostradas na Figura 27. Para maximizar a contribuição das variações das propriedades viscoelásticas, o sinal (x) foi detectado no ângulo $\theta +90^\circ$. Assim, podem-se observar a existência de pontos com colorações distintas, os quais provêm da diferença de dureza existente entre os materiais contidos na superfície do filme. As regiões mais claras são referentes à presença de um material mais macio que a região escura.¹⁶³ Desta forma, considerando que as AgNPs apresentem maior dureza que o $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$, os pontos mais escuros observados na

Figura 27b indicam a presença de AgNPs próximas a superfície do filme. A imagem apresentada na Figura 27b é representativa dos Filmes B e C.

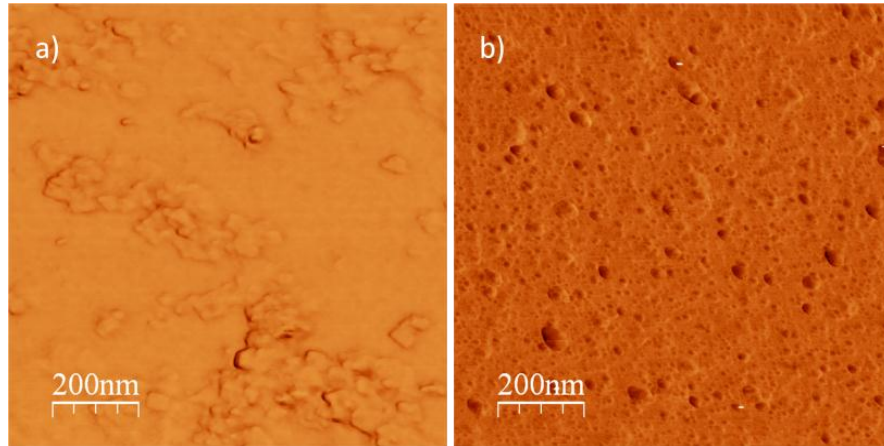


Figura 27. Imagem de contraste de fase por AFM. a) filme sem AgNps; b) Filme C de AgNPs.

Os Filmes B e C de AgNPs são transparentes à luz, assim torna-se possível a realização de medidas de suas constantes ópticas (espessura física e curva de dispersão) por medidas de Elipsometria Espectral, a qual é uma técnica óptica não destrutiva.⁸⁸

Os dados experimentais obtidos pelo Elipsômetro (Δ e ψ), foram aplicados em um software de modelagem (WinElli 2.2.6) para calcular estas constantes ópticas dos filmes analisados. O software correlaciona os resultados experimentais e as respectivas constantes do filme através da equação fundamental da elipsometria.

$$\frac{R_p(\lambda, n_0, n_s, k_s, n, k, d)}{R_s(\lambda, n_0, n_s, k_s, n, k, d)} = e^{i\Delta} \tan \psi \quad \text{Equação 6.}$$

onde λ é o comprimento de onda da luz, n_0 é o índice de refração do meio incidente (ar), n_s e k_s são os índices de refração real e imaginário do substrato, d é a espessura física do filme, n e k são os índices de refração real e imaginário do filme, Δ é a diferença de fase entre as componentes horizontal e vertical do campo elétrico e $\tan \psi$ é a razão entre as amplitudes das componentes horizontal e vertical do campo elétrico.

Os índices n e k são definidos em termos das constantes dielétricas real (ϵ_r) e imaginária (ϵ_i) do filme pela seguinte relação:

$$n = \left[\frac{(\epsilon_r^2 + \epsilon_i^2)^{\frac{1}{2}} + \epsilon_r}{2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 7.}$$

$$k = \left[\frac{(\epsilon_r^2 + \epsilon_i^2)^{\frac{1}{2}} - \epsilon_r}{2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 8}$$

Nos Filmes Branco (sem a presença das AgNPs), foi assumido que estes eram homogêneos, isotrópicos e dielétricos (absorção de luz baixa ou desprezível). Nessa condição, o modelo utilizado para curva de dispersão foi do tipo Cauchy,⁸⁸ onde as constantes dielétricas assumem a seguinte forma:

$$\epsilon_r^c = \left(A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \right)^2 + \left(\frac{D}{\lambda} + \frac{E}{\lambda^3} + \frac{F}{\lambda^5} \right)^2 \quad \text{Equação 9.}$$

$$\epsilon_i^c = 2 \left(A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \right) \left(\frac{D}{\lambda} + \frac{E}{\lambda^3} + \frac{F}{\lambda^5} \right) \quad \text{Equação 10.}$$

sendo A, B, C, D, E e F constantes características para cada amostra.

Entretanto, a inclusão de AgNPs no filme resulta na presença de uma absorção localizada na região em torno dos 400 nm, tornando necessário o acréscimo de um pico de absorção localizado (Função de Lorentz), cujas constantes dielétricas são da seguinte forma:

$$\epsilon_r^L = \frac{A \lambda^2 (\lambda^2 - E_0^2)}{(\lambda^2 - E_0^2)^2 + \gamma^2 \lambda^2} \quad \text{Equação 11.}$$

$$\epsilon_i^L = \frac{A \lambda^3 \gamma}{(\lambda^2 - E_0^2)^2 + \gamma^2 \lambda^2} \quad \text{Equação 12.}$$

sendo A , a amplitude de absorção; E_o , o comprimento de onda (λ) central e γ , a largura do pico de absorção.

As constantes finais utilizadas para a obtenção dos índices de refração assumem a seguinte forma:

$$\varepsilon_r = \varepsilon_r^c + \varepsilon_r^L \quad \text{Equação 13.}$$

$$\varepsilon_i = \varepsilon_i^c + \varepsilon_i^L \quad \text{Equação 14.}$$

Nos cálculos feitos usando este modelo, os valores dos índices de refração do substrato foram obtidos de medidas prévias de elipsometria, nessa situação a equação fundamental fornece os valores diretamente, sem necessidade de um modelo de ajuste.

Assim, como mostra a Figura 28, foi possível obter as curvas de dispersão dos filmes com AgNPs para o Filme C, o qual apresentou uma espessura de 32 nm. As demais amostras apresentaram curvas de dispersão similares e espessuras inferiores a 50 nm.

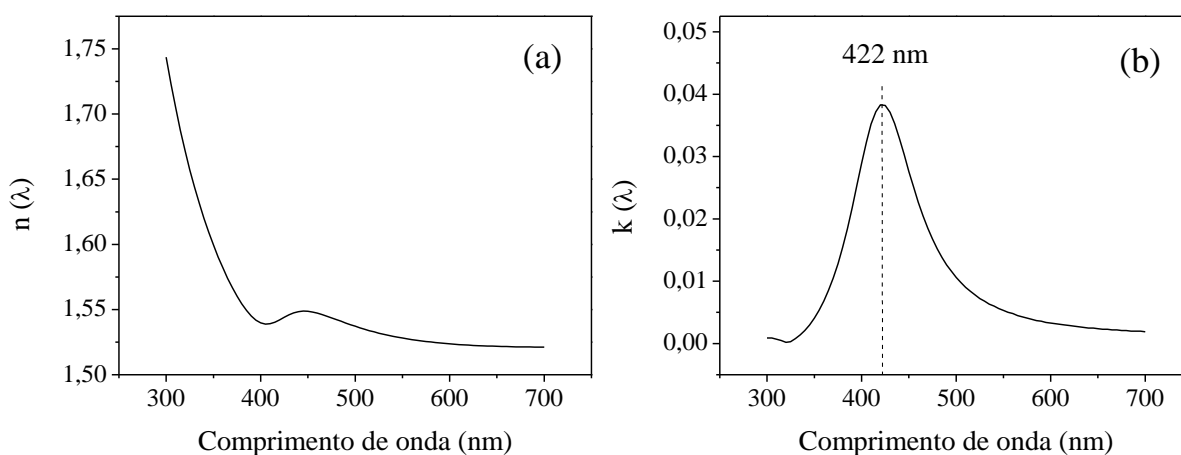


Figura 28. Distribuição dos índices de refração (a) real (n) e (b) imaginário (k) do Filme C de AgNPs.

O principal resultado obtido com a análise de Elipsometria é a confirmação da presença de AgNPs, o qual pode ser observado no gráfico da curva de dispersão para o índice de refração imaginário ($k(\lambda)$). Nele é possível observar a presença de um máximo de absorção em 422 nm, o que está de acordo com os resultados prévios obtidos por espectrofotometria na região do UV-Vis.

Além disso, um comparativo entre os filmes brancos e os com AgNPs mostrou que a inclusão dessas nanopartículas não modificou significativamente a espessura dos filmes obtidos, todas as amostras apresentaram espessuras entre 30 e 50 nm.

5.7. Atividade Antibacteriana dos Filmes Finos de AgNPs/SiDb(NO₃)₂

As atividades antibacterianas dos Filmes B e C contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram avaliadas inicialmente pelo método de Zona de Inibição (ZoI), onde o agente antibacteriano difunde-se pelo ágar inibindo o crescimento das células bacterianas e conseqüentemente formando o conhecido halo de inibição. No entanto, este procedimento não se mostrou adequado para a avaliação das amostras a que foi proposto, pois não foi observada a formação de halos de inibição ao redor das amostras dos filmes. Tal resultado pode ser devido a possibilidade das AgNPs encontrarem-se “presas” na rede do SiDb(NO₃)₂ impossibilitando a difusão das mesmas no meio, e impedindo seu contato direto com os micro-organismos contidos no ágar. Além disso, a concentração de íons de prata foi muito baixa nas dispersões de AgNPs que originaram os filmes, assim os Filmes B e C apresentavam uma concentração ainda mais baixa de Ag⁺, como relatado anteriormente. Portanto, os filmes analisados apresentavam quantidades insuficientes de espécies antibacterianas livres para difundir no ágar e inibir o crescimento das células bacterianas.

Visto que o método ZoI não apresentou resultados satisfatórios, foi utilizado o método FAC (*Film Applicator Coating*), onde testou-se inicialmente a atividade antibacteriana dos Filmes Branco, Filmes B e C contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Esta bactéria Gram-positiva foi escolhida para o teste inicial devido a mesma ter apresentado maior susceptibilidade a ação deste sistema antibacteriano em meio aquoso.

A Figura 29 mostra os resultados obtidos por esta análise, a partir da qual observou-se que houve inibição do crescimento das células bacterianas, onde o Filme C apresentou maior atividade antibacteriana que o Filme Branco, devido a presença de

AgNPs, e também maior que o Filme B, pois o Filme C continha maior concentração de AgNPs. A ação antimicrobiana pode ser verificada através do poder de inibir o crescimento bacteriano (ação bacteriostática) e o poder de eliminar os microrganismos presentes (ação bactericida). Portanto, como o caldo TSB proporciona as condições nutritivas necessárias para o crescimento das bactérias, a inibição do crescimento bacteriano neste meio indica que o Filme C possui atividade bacteriostática superior a apresentada pelos demais filmes testados. A Tabela 5 traz os resultados obtidos nesta avaliação.

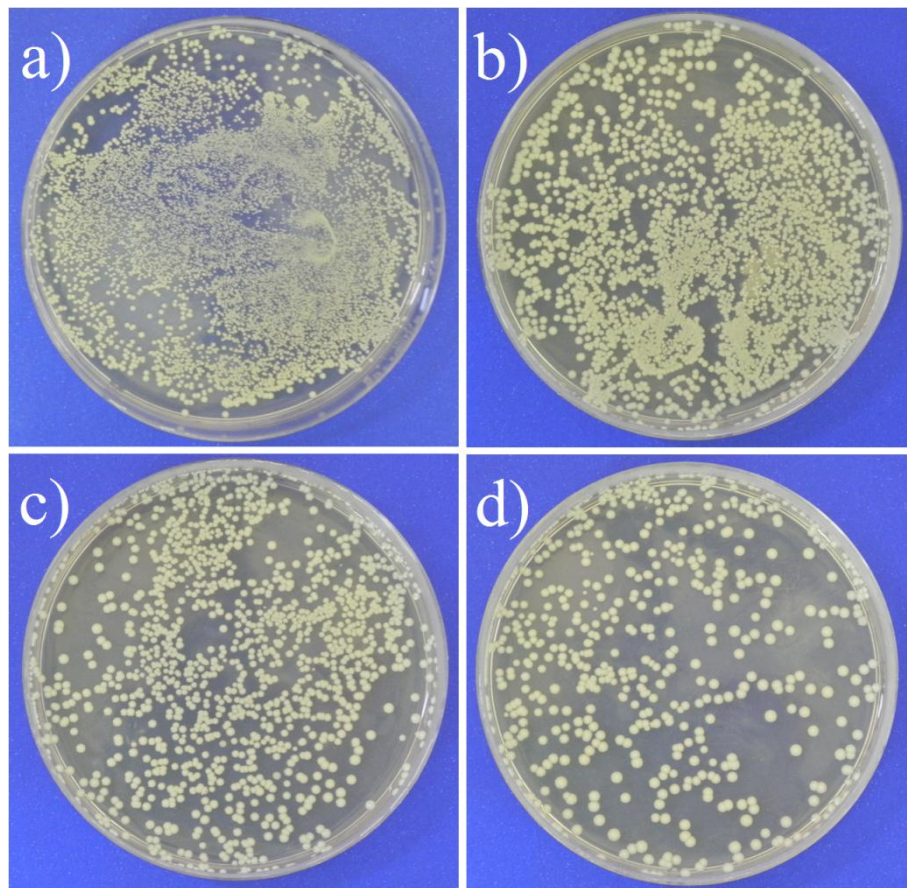


Figura 29. Placas com crescimento bacteriano de *S. aureus* na presença de (a) nenhum agente antibacteriano (controle), (b) Filme Branco ($\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$), (c) Filme B e (d) Filme C.

Tabela 5. Ação bacteriostática do Filme Branco e dos Filmes B e C contra a bactéria *S. aureus*.

Amostas	Ação bacteriostática (%)
Filme Branco	30
Filme B	70
Filme C	97

O mecanismo de ação das AgNPs e do SiDb(NO₃)₂ sobre célula bacteriana é provavelmente semelhante ao descrito na seção 5.3 onde é abordado o comportamento do sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ em meio aquoso. As bactérias são atraídas pelos grupos amônio quaternário do SiDb(NO₃)₂ e então interagem com as AgNPs, e conseqüentemente ocorre o rompimento da membrana celular da bactéria. Entretanto, o mecanismo de primeiro contato das bactérias com as AgNPs “presas” no interior do filme ainda não foi elucidado.

Como o Filme C de AgNPs apresenta elevadas atividades antibacterianas frente aos demais filmes testados, foram avaliadas as atividades bacteriostática e bactericida para *E. coli* e *S. aureus*, Tabela 6. Visto que o caldo TSA em meio salino permite que o micro-organismo inoculado mantenha sua atividade biológica exceto seu crescimento, assim, com a adição do agente antibacteriano pode ser avaliada a ação bactericida do mesmo.

Tabela 6. Ação bacteriostática e bactericida dos Filmes C e Branco frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Amostra	Ação bactericida (%)		Ação Bacteriostática (%)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Filme Branco	100	80	86	100
Filme C	100	100	100	100

As atividades bacteriostática e bactericida obtidas para o Filme Branco são atribuídas à ação sobre as células bacterianas dos grupos amônio quaternários contidas

na estrutura do $\text{SiDb}(\text{NO}_3)_2$. A presença das AgNPs no Filme C conduziu a ampliação das atividades antibacterianas do sistema, apresentando excelentes resultados como agente antibacteriano frente as bactérias testadas, este efeito deve-se ao sinergismo da ação das AgNPs e dos grupos amônio quaternários presentes no agente estabilizante.

CONCLUSÃO



6. CONCLUSÃO

Neste trabalho obteve-se com êxito um silsesquioxano iônico contendo como componente orgânico o grupo catiônico 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano apresentando como contra íon o ânion nitrato, o qual foi denominado SiDb(NO₃)₂. Esse foi o primeiro relato do uso de silsesquioxano iônico para estabilização de nanopartículas de prata. Foram produzidas AgNPs em meio aquoso com diâmetros médios de aproximadamente 3 e 6 nm para as dispersões B e C, respectivamente.

A avaliação de atividade antibacteriana da dispersão B de AgNPs mostrou excelentes resultados, pois o MIC (Concentração Mínima para Inibição) para *E. coli* apresentado por esta dispersão está entre os mais baixos encontrados na literatura, bem como, o MIC obtido para *S. aureus* foi o mais baixo dentre muitos trabalhos encontrados que relatam a ação antibacteriana de sistemas contendo AgNPs.^{147,148,149,154} Desta forma, ao apresentar biocompatibilidade, em concentrações de prata que também apresentaram ação antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, o sistema aquoso de AgNPs/SiDb(NO₃)₂ mostrou-se promissor para aplicação como agente antibacteriano em tratamento de água e fármacos de uso tópico.

Foram produzidos filmes extremamente finos (< 50 nm) que continham AgNPs com diâmetro médio de aproximadamente 4 nm. Os filmes finos de AgNPs/SiDb(NO₃)₂, também apresentaram ótimas atividades bacteriostática e bactericida contra as bactérias testadas. Desta forma, estes filmes finos de AgNPs apresenta potencial aplicação como revestimento antibacteriano, como por exemplo, de embalagens alimentícias, utensílios e equipamentos hospitalares.

Portanto, o sistema AgNPs/SiDb(NO₃)₂ mostrou-se um excelente agente antibacteriano contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, e o mesmo possui versatilidade em sua aplicação, pois tal sistema permite sua utilização em forma de dispersão aquosa e como filme fino.

Por fim, os estudos realizados neste trabalho foram importantes para a compreensão de propriedades básicas do sistema de AgNPs/SiDb(NO₃)₂ em meio aquoso e em forma de filmes finos. As perspectivas para este trabalho são investigar o mecanismo de estabilização das nanopartículas de prata utilizando SiDb(NO₃)₂ como agente estabilizante, bem como, avaliar a estabilidade térmica, química e de adesão dos

filmes finos deste sistema visando aplicações em recobrimentos de superfícies de vidro que necessitem ser submetidas a processos de esterilização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ram, J. T.; Yacaman, M. J. *Nanotechnol* **2005**, *2346*, 2346–2353.
- (2) Kyriacou, S. V.; Brownlow, W. J.; Xu, X. N. *Biochem* **2004**, *43*, 140–147.
- (3) Sondi, I.; Salopek-sondi, B. *J. Colloid Interf Sci* **2004**, *275*, 177–182.
- (4) Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V. *J Nanopart Res* **2010**, *12*, 1531–1551.
- (5) Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 1712–1720.
- (6) Chwalibog, A.; Sawosz, E.; Hotowy, A.; Szeliga, J.; Mitura, S.; Mitura, K.; Grodzik, M.; Orłowski, P.; Sokolowska, A. *Int J Nanomed* **2010**, *5*, 1085–1094.
- (7) Tolaymat, T. M.; El, A. M.; Genaidy, A.; Scheckel, K. G.; Luxton, T. P.; Suidan, M. *Sci Total Environ* **2010**, *408*, 999–1006.
- (8) Ivanova, E. P.; Hasan, J.; Truong, V. K.; Wang, J. Y.; Raveggi, M.; Fluke, C.; Crawford, R. J. *Appl Microbiol Biotechnol* **2011**, *91*, 1149–1157.
- (9) Kim, K.-J.; Sung, W. S.; Suh, B. K.; Moon, S.-K.; Choi, J.-S.; Kim, J. G.; Lee, D. G. *Biometals* **2009**, *22*, 235–242.
- (10) Kendall, K., Kendall, M., Rehfeldt, F. *Adhesion of cells, viruses and nanoparticles*; Springer: Dordrecht, 2011.
- (11) Schmid, G. *Nanoparticles: from theory to application*; Wiley: Weinheim, FRG, 2004; p. 218–229.
- (12) Tran, T.-H.; Nguyen, T.-D. *Colloids Surf B* **2011**, *88*, 1–22.
- (13) Swarnavalli, G. C. J.; Joseph, V.; Kannappan, V.; Roopsingh, D. *J Nanomater* **2011**, *2011*, 1–5.
- (14) Kuo, C.-H.; Chiang, T.-F.; Chen, L.-J.; Huang, M. H. *Langmuir* **2004**, *20*, 7820–7824.
- (15) Patil, R. S.; Kokate, M. R.; Salvi, P. P.; Kolekar, S. S. *C R Chim* **2011**, *14*, 1122–1127.
- (16) Lazarus, L. L.; Riche, C. T.; Malmstadt, N.; Brutchey, R. L. *Langmuir* **2012**, *28*, 15987–15993.
- (17) Tsuji, M.; Ogino, M.; Matsuo, R.; Kumagae, H.; Hikino, S.; Kim, T.; Yoon, S.-H. *Cryst Growth Des* **2010**, *10*, 296–301.

- (18) Panacek, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizúrova, N.; Sharma, V. K.; Nevecna, T.; Zboril, R. *J Phys Chem B* **2006**, *110*, 16248–16253.
- (19) Tan, S.; Erol, M.; Attygalle, A.; Du, H.; Sukhishvili, S. *Langmuir* **2007**, *23*, 9836–9843.
- (20) Cao, X.; Tang, M.; Liu, F.; Nie, Y.; Zhao, C. *Colloids Surf B* **2010**, *81*, 555–562.
- (21) Menezes, E. W.; Nunes, M. R.; Arenas, L. T.; Dias, S. L. P.; Garcia, I. T. S.; Gushikem, Y.; Costa, T. M. H.; Benvenutti, E. V. *J Solid State Electrochem* **2012**, *16*, 3703–3713.
- (22) Nunes, M. R.; Gushikem, Y.; Landers, R.; Dupont, J.; Costa, T. M. H.; Benvenutti, E. V. *J Sol-Gel Sci Technol* **2012**, *63*, 258–265.
- (23) Huang, J.; Koepsel, R. R.; Murata, H.; Wu, W.; Lee, S. B.; Kowalewski, T.; Russell, A. J.; Matyjaszewski, K. *Langmuir* **2008**, *24*, 6785–6795.
- (24) Park, D.; Finlay, J. a; Ward, R. J.; Weinman, C. J.; Krishnan, S.; Paik, M.; Sohn, K. E.; Callow, M. E.; Callow, J. a; Handlin, D. L.; Willis, C. L.; Fischer, D. a; Angert, E. R.; Kramer, E. J.; Ober, C. K. *Appl. Mater. Interf.* **2010**, *2*, 703–711.
- (25) Benvenutti, E. V; Moro, C. C.; Gallas, M. R. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1926–1933.
- (26) Seela, F.; Ding, P.; Budow, S. *Bioconjugate Chem* **2011**, *22*, 794–807.
- (27) Joseph, Y.; Guse, B.; Nelles, G. *Chem Mater* **2009**, *21*, 1670–1676.
- (28) Li, Z.; Lee, D.; Sheng, X.; Cohen, R. E.; Rubner, M. F. *Langmuir* **2006**, 9820–9823.
- (29) Gay, D. S. F.; Fernandes, T. H. M.; Amavisca, C. V; Cardoso, N. F.; Benvenutti, E. V; Costa, T. M. H.; Lima, E. C. *Des* **2010**, *258*, 128–135.
- (30) Duncan, T. V *J. Colloid Interf Sci* **2011**, *1*, 1–24.
- (31) Kelsall, R.; Hamley, I.; Geoghegan, M. *Nanoscale science and technology*; Wiley: West Sussex, 2005.
- (32) Lopes, E. M, Laburú, C. E. *Cad. Cat. Ens. Fis.* **2001**, *18*, 240–247.
- (33) Roco, M. C.; Mirkin, C. A.; Hersam, M. C. *Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020: Retrospective and Outlook*; World Technology Evaluation Center (WTEC) and the National Science Foundation (NSF), Ed.; Springer, 2010; pp. 1–31.
- (34) Walters, G.; Parkin, I. P. *J Mater Chem* **2009**, *19*, 574–590.

- (35) Melo, M. A. Jr.; Santos, L. S. S.; Gonçalves, M. C.; Nogueira, A. F. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 1872–1878.
- (36) Feldheim, D. L.; Foss, C. A. J. *Metal Nanoparticles: synthesis, characterization, and applications*; Headquarters: Nova Iorque, 2002.
- (37) Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chem Rev* **2004**, *104*, 293–346.
- (38) Tan, Y.; Li, Y.; Zhu, D. *ENN* **2004**, *8*, 9–40.
- (39) Schon, G.; Simon, U. *Colloid Polym Sci* **1995**, *273*, 101–117.
- (40) Pradeep, T. *Thin Solid Films* **2009**, *517*, 6441–6478.
- (41) Willets, K. a; Van Duyne, R. P. *Annu Rev Phys Chem* **2007**, *58*, 267–297.
- (42) Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. *Angew Chem* **2009**, *48*, 60–103.
- (43) El-Sayed, M. a *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 257–64.
- (44) Rycenga, M.; Cobley, C. M.; Zeng, J.; Li, W.; Moran, C. H. *Chem Rev* **2011**, *111*, 3669–3712.
- (45) Iii, J. D. A.; Finke, R. G. *J Mol Catal* **1999**, *145*, 1–44.
- (46) CALLISTER, J., W. D. *Fundamentos de ciência e engenharia dos materiais: uma abordagem integrada*; 2nd ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2006.
- (47) Hunter, R. J. *Foundations of colloid science*; 2nd ed.; Oxford: New York, 2001; pp. 1–40.
- (48) LaMer, V. K; Dinegar, R. H. *JACS* **1950**, *72*, 4847–4854.
- (49) Nath, S.; Jana, S.; Pradhan, M.; Pal, T. *J Colloid Interf Sci* **2010**, *341*, 333–352.
- (50) Chen, M.; Feng, Y.-G.; Wang, X.; Li, T.-C.; Zhang, J.-Y.; Qian, D.-J. *Langmuir* **2007**, *23*, 5296–304.
- (51) Jiménez, M. H. Teoria cinética auto-consistente para o crescimento de pontos quânticos semicondutores. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Campinas, 2003, 75 f.
- (52) Yu, W.; Xie, H. *J Nanomater* **2012**, 1–17.
- (53) Swarnavalli, G. C. J.; Joseph, V.; Kannappan, V.; Roopsingh, D. *J Nanomater* **2011**, *2011*, 1–5.
- (54) Panacek, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizúrova, N.; Sharma, V. K.; Nevecna, T.; Zboril, R. *J Phys Chem B* **2006**, *110*, 16248–16253.

- (55) Gopidas, K. R.; Whitesell, J. K.; Fox, M. A.; Carolina, N. *Nano Lett* **2003**, *3*, 1757–1760.
- (56) Rasines, B.; Hernández-Ros, J. M.; De las Cuevas, N.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; De la Mata, F. J. *Dalton Trans* **2009**, *40*, 8704–8713.
- (57) Solanki, J. N.; Murthy, Z. V. P. *Ind Eng Chem Res* **2011**, *50*, 12311–12323.
- (58) Grote, C.; Cheema, T. a; Garnweitner, G. *Langmuir* **2012**, *28*, 14395–404.
- (59) Gushikem, Y.; Benvenuti, E. V.; Kholin, Y. V. *Pure Appl Chem* **2008**, *80*, 1593–1611.
- (60) Arenas, L. T., Langaro, A., Gushikem, Y., Moro, C. C., Benvenuti, E. V., Costa, T. M. H. *J. Sol-Gel Sci. Technology* **2003**, *28*, 51–56.
- (61) Ricketts, C. R.; Lowbury, E. J.; Lawrence, J. C.; Hall, M.; Wilkins, M. D. *Br Med J*. **1970**, *1*, 444–446.
- (62) Carr, H. S.; Wlodkowski, T. J.; Rosenkranz, H. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1973**, *4*, 585–587.
- (63) Herley, P. J.; Jones, W. J. *Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, *88*, 3213–3216.
- (64) Yogev, D.; Efrima, S. *Langmuir* **1991**, *2*, 267–271.
- (65) Akhavan, O.; Ghaderi, E. *Curr Appl Phys* **2009**, *9*, 1381–1385.
- (66) Durán, N.; Marcato, P. D.; Conti, R. De; Alves, O. L.; Costa, F. T. M.; Brocchi, M. *J Brazil Chem Soc* **2010**, *21*, 949–959.
- (67) Stamplecoskie, K. G.; Scaiano, J. C. *Photochem Photobiol* **2012**, *4*, 762–768.
- (68) Rycenga, M.; Kim, M. H.; Camargo, P. H. C.; Cogley, C.; Li, Z.-Y.; Xia, Y. J. *Phys. Chem. A* **2009**, *16*, 3932–3939.
- (69) Kanchana, A.; Agarwal, I.; Sunkar, S.; Nellore, J.; Namasivayam, K. *Digest J Nanomater Biostruct* **2011**, *6*, 1741–1750.
- (70) Lee, H. Y.; Park, H. K.; Lee, Y. M.; Kim, K.; Park, S. B. *Chem. Comm* **2007**, 2959–2961.
- (71) Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J. M.; Paknikar, K. M. *Toxicol Lett* **2008**, *179*, 93–100.
- (72) Yang, W.; Shen, C.; Ji, Q.; An, H. *Nanotech* **2009**, *20*, 85102–85108.

- (73) Thorsteinsson, T.; Kristinsson, K. G.; Hja, M. A.; Hilmarsson, H.; Loftsson, T. *J Med Chem* **2003**, *46*, 4173–4181.
- (74) Kenawy, E. R. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *82*, 1364–1374.
- (75) Kawabata, N. Fujita, I. Inoue, T. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *60*, 911–917.
- (76) Roy, D.; Knapp, J. S.; Guthrie, J. T.; Perrier, S. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 91–9.
- (77) Goodson, B. O. B.; Ehrhardt, A.; Ng, S.; Nuss, J.; Johnson, K.; Giedlin, M.; Yamamoto, R.; Moos, W. H.; Krebber, A.; Ladner, M.; Giacona, M. B.; Vitt, C.; Winter, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1429–1434.
- (78) Dizman, B. Elasri M. O. Mathias, L. J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *94*, 635–642.
- (79) Wyatt, J. M.; Knowles, C. J. *Int Biodeter Biodegr* **1995**, 227–248.
- (80) Scharff, T. G. *Biochem Pharmacol* **1960**, *5*, 79–86.
- (81) Buchwald, J.Z, Franklin, A. *Wrong for the Righth Reasons*; Springer: Dordrecht, 2005; p. 78.
- (82) Ciriminna, R.; Fidalgo, A.; Pandarus, V.; Ilharco, L. M.; Pagliaro, M. *Chem Rev* **2013**, *113*, 6592–6620.
- (83) Ebelmen, J. J. In *Ann. Chem. Phys.*; 1846; p. 129.
- (84) Graham, T. F. R. S. *J. Chem. Soc* **1864**, 318–327.
- (85) Hench, L. L. West, J. . K. *Chem Rev* **1990**, *90*, 33–72.
- (86) José, N. M. Prado, L. A. S. A. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 281–288.
- (87) Hiratsuka, R. S. Santilli, C. V. Pulcinelli, S. H. *Quim. Nova* **1995**, *2*, 171–180.
- (88) Airoldi, C; Farias, R. F. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 84–88.
- (89) Union, I.; Pure, O. F.; Chemistry, A. *Pure Appl Chem* **1985**, *57*, 603–619.
- (90) Judeinstein, P.; Sanchez, C. *J. Mater. Chem.* **1996**, *6*, 511–525.
- (91) Schubert, U.; Husing, N.; Lorenz, A. *Chem. Mater* **1995**, *7*, 2010–2027.
- (92) Eder, D. *Chem Rev* **2010**, *110*, 1348–1385.
- (93) Paul, G.; Heimink, J.; Koller, H. *Chem. Comm* **2008**, *20*, 5083–5089.

- (94) Paulo, R.; Marc, A.; Benvenuti, E. V.; Costa, M. H.; Guterres, S.; Pohlmann, A. R. *Int. J. Pharm.* **2008**, *358*, 292–295.
- (95) Radin, S.; Falaize, S.; Lee, M. H.; Ducheyne, P. *Biomater.* **2002**, *23*, 3113–3122.
- (96) Faria, A. M.; Bottoli, C. B. G.; Jardim, I. C. S. F. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 300–309.
- (97) Wight, A. P.; Davis, M. E. *Chem Rev* **2002**, *102*, 3589–3614.
- (98) Lu, Z.; Lindner, E.; Mayer, H. A. *Chem Rev* **2002**, *102*, 3543–3578.
- (99) Baney, R. H.; Itoh, M.; Sakakibara, A.; Suzuki, T. *Chem Rev* **1995**, *95*, 1409–1430.
- (100) Schubert, U.; Husing, N.; Lorenz, A. *Chem. Mater* **2010**, *7*, 2010–2027.
- (101) Kaneko, Y.; Iyi, N.; Matsumoto, T.; Kurashima, K.; Fujita, T. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2058–2060.
- (102) Yu, F. T.; Yao, K.; Shi, L. Y.; Wang, H. Z.; Fu, Y.; You, X. Q. *Chem. Mater* **2007**, *19*, 335–337.
- (103) Park, E. S.; Ro, H. W.; Nguyen, C. V.; Jaffe, R. L.; Yoon, D. Y. *Chem. Mater* **2008**, *20*, 1548–1554.
- (104) Li, G.; Wang, L.; Ni, H.; Jr, C. U. P. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2002**, *11*, 123–154.
- (105) Soh, M. S.; Sellinger, A.; Yap, A. U. J. *Curr. Nanosci.* **2006**, *2*, 373–381.
- (106) Mikoshiba, S.; Hayase, S. *J. Mater. Chem.* **1999**, *1*, 591–598.
- (107) Lazzeri, P.; Rubloff, G. W.; Vanzetti, L.; Briber, R. M.; Anderle, M.; Bersani, M.; Park, J. J.; Kim, H.; Volksen, W.; Miller, R. D.; Lin, Z. *Surf Interface Anal* **2004**, *36*, 304–310.
- (108) Pereira, M. B.; Michels, A. F.; Gay, D. S. F.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. M. H.; Horowitz, F. *Opt Mater* **2010**, *32*, 1170–1176.
- (109) Akgun, B. A.; Wren, A. W.; Durucan, C.; Towler, M. R.; Mellott, N. P. *J. Sol-Gel Sci Technol* **2011**, *59*, 228–238.
- (110) Akgun, B. A.; Mellott, N. P.; Durucan, C. *J. Sol-Gel Sci Technol* **2012**, *62*, 240–251.
- (111) Wu, G.; Su, Z. *Chem Mater* **2006**, *16*, 3726–3732.
- (112) Kim, J.; Lee, S. W.; Hammond, P. T.; Shao-Horn, Y. *Chem Mater* **2009**, *21*, 2993–3001.

- (113) He, J.; Ichinose, I.; Kunitake, T.; Nakao, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 10005–10010.
- (114) Yamamoto, T.; Yoneyama, S.; Tsutsumi, O.; Kanazawa, A.; Shiono, T. *J. Appl. Phys* **2000**, *88*, 2215–2220.
- (115) Michels, A. F.; Menegotto, T.; Grieneisen, H. P. H.; Susin, M. B. *App. opt.* **2006**, *45*, 1491–1494.
- (116) Shimizu, F. M. Fabricação e caracterização de filmes finos e ultrafinos de coroas de éter com azobenzênio incorporado e estudo da birrefringência fotoinduzida. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista, 2008, 119 f.
- (117) Ro, H. W.; Kim, K. J.; Theato, P.; Gidley, D. W.; Yoon, D. Y. *Macromol* **2005**, *38*, 1031–1034.
- (118) Letailleur, A. A.; Barthel, E.; Desmazi, B.; Chemin, N. *Chem. Mater* **2011**, *23*, 5082–5089.
- (119) Brizzolara, R. A.; Stamper, D. M. *Surf Interface Anal* **2007**, *39*, 559–566.
- (120) Mitsuishi, M.; Zhao, F.; Kim, Y.; Watanabe, A.; Miyashita, T. *Chem Mater* **2008**, *13*, 4310–4316.
- (121) Jensen, T. R.; Malinsky, M. D.; Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P. *J Phys Chem B* **2000**, *104*, 10549–10556.
- (122) Deng, Z.; Chen, M.; Wu, L. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 11692–11698.
- (123) Llorens, A.; Lloret, E.; Picouet, P. a.; Trbojevich, R.; Fernandez, A. *Trends Food Sci Technol* **2012**, *1*, 19–29.
- (124) Sharma, V. K.; Yngard, R. a; Lin, Y. *Adv Colloid Interf Sci* **2009**, *145*, 83–96.
- (125) Simchi, a; Tamjid, E.; Pishbin, F.; Boccaccini, a R. *Nanomedicine : NBM* **2011**, *1*, 22–39.
- (126) Arenas, L. T.; Dias, S. L. P.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; Benvenutti, E. V; Lucho, A. M. S.; Gushikem, Y. *J Colloid Interf Sci* **2006**, *297*, 244–250.
- (127) Medina-Ramírez, I.; González-García, M.; Liu, J. L. *J Mater Sci* **2009**, *44*, 6325–6332.
- (128) White, B.; Banerjee, S.; Brien, S. O.; Turro, N. J.; Herman, I. P. *J Phys Chem C* **2007**, *2*, 13684–13690.
- (129) Horcas, I.; Fernández, R.; Colchero, J.; Gómez-herrero, J. *Rev Sci Instrum* **2007**, *78*, 13705 - 13712.
- (130) Mosmann, T. *J Immunol Methods* **1983**, *65*, 55–63.

- (131) Juan, L.; Zhimin, Z.; Anchun, M.; Lei, L.; Jingchao, Z. *Int J Nanomed* **2010**, *5*, 261–267.
- (132) Arenas, L. T.; Pinheiro, A. C.; Ferreira, J. D.; Livotto, P. R.; Pereira, V. P.; Gallas, M. R.; Gushikem, Y.; Costa, T. M. H.; Benvenutti, E. V *J Colloid Interf Sci* **2008**, *318*, 96–102.
- (133) Board, E.; Krische, H. C. A. H. M. J.; Ley, L. S. V; Thiem, M. O. J.; Vogel, M. V. P.; Yamamoto, W. H. W. H. *Topics in Current Chemistry: Solid State NMR*; J. C. c. Chan, S. Afonin, M. Berditsch, J. C. C. Fernandez, M. Ieronimo, K. Koch, A.B. Nielsen, N. C. Nielsen, M. Pruski, L. A. Strasso, A. S. Ulrich, M. Weib, J. P. Y., Ed.; Springer: Heidelberg, **2012**; pp. 192 – 197.
- (134) Sassi, Z.; Bureau, J. C.; Bakkali, A. *Vib Spectrosc* **2002**, *28*, 299–318.
- (135) Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. *Angew Chem* **2009**, *48*, 60–103.
- (136) Creighton, J. A., Blatchford, C. G., Albrecht, M. G. *J Chem Soc Faraday Trans* **1978**, *8*, 790–798.
- (137) Henry, A.-I.; Bingham, J. M.; Ringe, E.; Marks, L. D.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *J Phys Chem C* **2011**, *115*, 9291–9305.
- (138) Peleka, E. N.; Matis, K. A. *Ind Eng Chem Res* **2011**, *50*, 421–430.
- (139) Tanvir, S.; Oudet, F.; Pulvin, S.; Anderson, W. A. *Enzyme Microb. Technol.* **2012**, *51*, 231–236.
- (140) Medina-Ramírez, I.; González-García, M.; Liu, J. L. *J Mater Sci* **2009**, *44*, 6325–6332.
- (141) Æ, Æ. U. M. Æ. W. F.; Ro, K. *J Inorg Organomet Polym* **2007**, *17*, 605–613.
- (142) Simionescu, B.; Bordianu, I.-E.; Aflori, M.; Doroftei, F.; Mares, M.; Patras, X.; Nicolescu, A.; Olaru, M. *Mater Chem Phys* **2012**, *134*, 190–199.
- (143) Lichter, J. a.; Van Vliet, K. J.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **2009**, *42*, 8573–8586.
- (144) Zhang, Y.; Peng, H.; Huang, W.; Zhou, Y.; Yan, D. **2008**, *325*, 371–376.
- (145) Murugan, E.; Vimala, G. *J Colloid Interf Sci* **2011**, *357*, 354–365.
- (146) Mahtab, F.; Yu, Y.; Lam, J. W. Y.; Liu, J.; Zhang, B.; Lu, P. *Adv Funct Mater* **2011**, *21*, 1733–1740.
- (147) Wei, D.; Sun, W.; Qian, W.; Ye, Y.; Ma, X. *Carbohy. Res* **2009**, *344*, 2375–2382.

- (148) Yu, D.-G. *Colloids Surf B* **2007**, *59*, 171–178.
- (149) Guzman, M. , Dille, J. , Godet, S. *Nanomedicine : NBM* **2012**, *8*, 37–45.
- (150) Martinez-Gutierrez, F., Olive, P. L., Banuelos, A., Orrantia, E., Nino, N , Sanchez, E. M., Ruiz, F., Bach, H., Av-Gay, Y. *Nanomedicine : NBM* **2010**, *6*, 681–688.
- (151) Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mandoza, J. R., Ruiz, F. *J. Nanopart. Res* **2008**, *10*, 1343–1348.
- (152) Roy, M.; Mukherjee, P.; Mandal, B. P.; Sharma, R. K.; Tyagi, A. K.; Kale, S. P. *RSC Adv* **2012**, *2*, 6496–6503.
- (153) Jaiswal, S.; Duffy, B.; Jaiswal, A. K.; Stobie, N.; McHale, P. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *36*, 280–283.
- (154) Bryaskova, R.; Pencheva, D.; Kyulavska, M.; Bozukova, D.; Debuigne, A.; Detrembleur, C. *J. Colloid Interf Sci* **2010**, *344*, 424–428.
- (155) Borenfreund, E.; Borrero, O. *Cell Biol. Toxicol.* **1984**, *1*, 55–65.
- (156) Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. *Nat Mater* **2009**, *8*, 543–557.
- (157) Lesniak, W.; Bielinska, A. U.; Sun, K.; Janczak, K. W.; Shi, X.; Baker, J. R.; Balogh, L. P. *Nano Lett* **2005**, *5*, 2123–30.
- (158) Ding, Y.; Bian, X.; Yao, W.; Li, R.; Ding, D.; Hu, Y.; Jiang, X.; Hu, Y. *Appl. Mater. Interf.* **2010**, *2*, 1456–1465.
- (159) Siwach, O. P.; Sen, P. *J Lumin* **2009**, *129*, 6–11.
- (160) Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 1712–1720.
- (161) Zhang, L.; Shen, Y. H.; Xie, A. J.; Li, S. K.; Li, Y. M. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 1884–1893.
- (162) Mosaiab, T.; Jin, C.; Jic, G.; Ho, K.; Kug, S.; Lee, I.; In, I.; Young, S. *Mater. Sci. Engineer. C* **2013**, *33*, 3786–3794.
- (163) Raghavan, D.; Vanlandingham, M.; Gu, X.; Nguyen, T. *Langmuir* **2000**, *16*, 9448–9459.