



UFPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DIMITRI CARLOVICH GOUVEIA FAGUNDES

**ESTUDO QUIMIOMÉTRICO DA PREPARAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÕES
FARMACÊUTICAS**

RECIFE - PE - Brasil
2021

DIMITRI CARLOVICH GOUVEIA FAGUNDES

ESTUDO QUIMIOMÉTRICO DA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PARA APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS

Trabalho de Conclusão de Curso na forma de monografia apresentado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a conclusão do Curso de Farmácia.

Orientadora: Beate Saegesser Santos

RECIFE – PE – Brasil

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Fagundes, Dimitri Carlovich Gouveia .

Estudo quimiométrico da preparação de nanopartículas de prata para aplicações farmacêuticas / Dimitri Carlovich Gouveia Fagundes. - Recife, 2023.

52 : il., tab.

Orientador(a): Beate Saegesser Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2023.

1. Nanotecnologia. 2. Biofotônica. 3. Química Inorgânica. 4. Ciências Farmacêuticas. 5. Terapia Fotodinâmica. I. Santos, Beate Saegesser. (Orientação). II. Título.

600 CDD (22.ed.)

Dimitri Carlovich Gouveia Fagundes

ESTUDO QUIMIOMÉTRICO DA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Prof^ª. Dr^ª Beate Saegesser Santos (DCF^{ar}-UFPE)

Orientadora

Prof Dr em Ciências Farmacêuticas Antônio Castro de Gomes Neto
(UNINASSAU)

1^ª Examinador

Mestre em Ciências Farmacêuticas Cláudio Henrique Rodrigues da Silva

(IMIP)

2^º Examinador

Profa. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (DCF^{ar} – UFPE)

Suplente

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a mim mesmo, por não desistir e persistir na realização desse sonho, por buscar uma vida melhor pra mim, buscar uma profissão, me dedicar a estudar e ser feliz com o melhor que posso ser, por acreditar no meu potencial e pela realização de ser o primeiro homem trans e também a primeira pessoa trans a se tornar farmacêutico pelo Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco em 119 anos de existência do curso de farmácia, ao concluir este trabalho me torno parte da história desta instituição, e abro portas para que mais pessoas trans ocupem a academia.

Agradeço a minha companheira e melhor amiga Luana Maria da Luz Barbosa, por todo o apoio e incentivo que me deu durante meus anos de formação, por estar sempre ao meu lado, por me fornecer carinho, amor e compreensão em todos os momentos, por me proporcionar felicidade e alegria, por ser uma parceira para tudo, por ser uma mulher incrível, uma verdadeira inspiração de ser estudante, por cuidar de mim no pós-operatório de minha mastectomia masculinizadora em meio a um semestre letivo e me ajudar a prosseguir nos estudos, por toda dedicação que me tem e companheirismo e por acreditar em mim.

Agradeço aos meus gatos, Kevin, Lara e Luna, por todo o carinho que me dão, todo o amor que eles tem por mim, todos os momentos de alegria e todas as lembranças que guardo na memória e no coração do meu gatinho Kevin que partiu em meio a minha jornada de graduação. Amo muito meus 3 filhos felinos.

Agradeço a minha mãe Avanice, por me dar a vida, alimento, moradia, afeto, apoio, e por me proporcionar um ensino de qualidade que me fez chegar até a conclusão deste trabalho e irá me proporcionar um futuro profissional maravilhoso.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dr^a Beate Saegesser Santos, por ser um grande exemplo pra mim de professora e pesquisadora, por me ajudar sempre que preciso, por me dar a oportunidade de fazer pesquisa científica, por me ensinar muitas coisas, por ser minha amiga, por confiar na minha capacidade e por estar ao meu lado em minha jornada acadêmica.

Agradeço aos colegas do LINSO, em especial a Cláudio que me ensinou bastante, me ajudou em muitas coisas e deu todo o apoio possível. Agradeço também a Sara, Rômulo, Marques, Ninho, João Matheus, Joalen, Rebeca, Débora, Pámina, Nadson, Bruna, Grici, todos

que fazem parte da minha história no LINSO. E também aos meus estagiários Giulia e Leandro, pela ajuda com os procedimentos experimentais deste trabalho.

Agradeço aos meus professores de farmácia, em especial a Prof^a Dr^a Francisca Sueli Monte Moreira e ao Prof^o Dr^o Antônio Rodolfo de Faria por todos os ensinamentos ao longo da minha formação como farmacêutico, por toda a dedicação no ensino, por me concederem a oportunidade de ser monitor em suas disciplinas, por toda a atenção que me deram, e por serem verdadeiros exemplos de profissionais para mim.

Agradeço a todos os meus amigos da vida inteira, os quais carrego em minha memória e fazem parte da minha história e construção como ser humano, e aos que ainda fazem parte da minha vida, torcem pelo meu sucesso e vibram a cada conquista minha.

Agradeço a todes es pessoas trans, travestis e não binárias que conviveram comigo durante os anos de minha formação, que me incluíram em suas vidas, que me ensinaram muito, que me proporcionaram momentos felizes, boas conversas e muita diversão. Todies vocês merecem muito, assim como eu, estar ocupando o meio acadêmico. Nós somos o futuro e o exemplo para os nossos descendentes e vamos à luta por uma educação digna para a nossa população, por mais perspectiva de futuro para nossas vida, por mais vida para nós e reconhecimento profissional.

Agradeço ao Departamento de Ciências Farmacêuticas, ao Centro de Ciências da Saúde e a Universidade Federal de Pernambuco, por me receberem, por me abrigarem, por me fornecerem estrutura de estudo, alimentação e lazer durante estes 5 anos de graduação, por me garantirem essa formação, por se adaptarem a mim e a todas as outras pessoas trans estudantes da UFPE que conquistamos juntos com muita luta nossos direitos pelo uso do nome social na instituição, pelo uso do banheiro adequado a nossa identidade de gênero, pela conscientização que promove aos seus estudantes e professores cisgêneros a respeitar todas as pessoas trans que ocupam a nossa universidade. E que seja protocolada em um futuro próximo a cota para pessoas trans terem mais oportunidade de adentrarem ao meio acadêmico com o ensino de qualidade da UFPE.

"Só quando se perde o medo de perder se encontra a alegria de achar"

João W. Nery

RESUMO

As nanopartículas de prata (AgNPs), obtidas na forma coloidal, apresentam geralmente dimensões entre 10 a 100 nm. Estas nanopartículas possuem diversas propriedades úteis à área da saúde, com ênfase a sua atuação antimicrobiana sendo uma alternativa a resistência bacteriana, ação em terapia fotodinâmica, quimioterapia, radioterapia, entrega direcionada de medicamentos, entre outros. As AgNPs podem ser sintetizadas por diversas metodologias físicas, químicas e biológicas. Uma destas metodologias e a qual utilizamos no presente projeto foi proposta por Aherne *et al.* Observamos neste método falta de controle cinético do crescimento das partículas em meio coloidal, o grupo NanoBio/UFPE busca obter nanoprismas de prata de cor azul para conjugação ao azul de metileno para aplicação em terapia fotodinâmica. A síntese das AgNPs possuem variáveis experimentais (p.ex. controle da agitação magnética e de gotejamento, temperatura do processo, concentração relativa dos reagentes, etc) que resultam em grandes variações de obtenção das nanopartículas prismáticas. Estas condições experimentais podem ser melhor controladas através da automatização de alguns passos almejando uma metodologia reprodutível. Além disso, é necessário entender melhor a cinética da preparação, para isso pode-se buscar entender quais são fatores ou variáveis que possuem maior influência na síntese de nanopartículas de prata. Este estudo utilizou ensaios quimiométricos como ferramenta analítica para determinar quantitativamente a influência de 3 variáveis (frequência de agitação magnética do sistema de crescimento, volume de semente disponível a preparação e volume de prata depositado gota a gota afim de promover o crescimento das nanopartículas em reação com o ácido cítrico), em 2 níveis, se tratando de um experimento fatorial 2^3 . Das 40 amostras de AgNPs preparadas nos dois ensaios quimiométricos, 10 amostras apresentaram um comprimento de onda máximo de absorção característico de resíduo de semente com intensidade maior que o pico que representa as AgNPs crescidas, indicando um baixo rendimento no crescimento das nanopartículas de prata, bem como destas amostras apenas 9 apresentaram um máximo de absorção acima de 580 nm em sua banda plasmônica, que é de interesse ao grupo de pesquisa NanoBio/UFPE para posterior conjugação com o azul de metileno para aplicação em terapia fotodinâmica. São necessários mais estudos controlando outras possíveis variáveis que interferem na cinética desta preparação, como, temperatura, exposição de luz e taxa de gotejamento na oferta de nitrato de prata.

PALAVRAS CHAVE: nanopartículas de prata; quimiometria; ressonância plasmônica de superfície

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** (a) Variação da banda de plásmon com a variação de tamanho de nanoprismas de Ag; (b) dispersões coloidais contendo nanoprismas de Ag (18 a 40 nm) preparados pelo Grupo NanoBio/UFPE. _____ 8
- Figura 2.** Aplicações de AgNPs em saúde. _____ 12
- Figura 3.** Ressonância Plasmônica de Superfície (A) localizada e (B) polarizada. _____ 13
- Figura 4.** Espectro de absorção UV-Vis apresentando diferentes faixas de absorção da luz (banda plasmônica) de nanopartículas de prata em diferentes morfologias: fio, esfera, cubo e prisma triangular, respectivamente. _____ 14
- Figura 5.** Esquematização da preparação de AgNPs. (a) Soluções utilizadas no processo com suas devidas concentrações; (b) Preparação da semente de AgNPs; (c) Preparação para o crescimento de AgNPs, ponto de partida; (d) Crescimento de AgNPs observado pelas alterações de coloração do meio devido a sua modificação estrutural e seu poder de efeito plasmônico; (e) Finalização do processo de crescimento de AgNPs e caracterização por espectrofotometria UV/Vis identificando a banda de plásmon. _____ 18
- Figura 6.** Esquematização da preparação de AgNPs (parte 2). (d) Crescimento de AgNPs observado pelas alterações de coloração do meio devido a sua modificação estrutural e seu poder de efeito plasmônico; (e) Finalização do processo de crescimento de AgNPs e caracterização por espectrofotometria UV/Vis identificando a banda de plásmon. _____ 19
- Figura 7.** (a) Amostras de AgNPs produzidas na primeira réplica; (b) amostras de AgNPs produzidas na segunda réplica; (c) amostras produzidas na terceira réplica; do primeiro ensaio quimiométrico da síntese de AgNPs, enumeradas de 1 à 8. _____ 22
- Figura 8.** Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por letras de (a) até (h) da primeira réplica deste primeiro ensaio proposto. _____ 23
- Figura 9.** Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por letras de (a) até (h) da segunda réplica deste primeiro ensaio proposto. _____ 24
- Figura 10.** Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por letras de (a) até (h) da terceira réplica deste primeiro ensaio proposto. _____ 26

Figura 11. Cubo de delineamento fatorial do primeiro ensaio quimiométrico. _____	28
Figura 12. Cubo fatorial dos efeitos das variáveis do primeiro ensaio quimiométrico. _____	29
Figura 13. Distribuição do potencial zeta de AgNPs do primeiro ensaio quimiométrico. _____	31
Figura 14. (a) Amostras de AgNPs produzidas na primeira réplica; (b) amostras de AgNPs produzidas na segunda réplica; (c) amostras produzidas na terceira réplica; do primeiro ensaio quimiométrico da síntese de AgNPs, enumeradas de 1 à 8. _____	32
Figura 15. Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por letras de (a) até (h) da primeira réplica deste segundo experimento. _____	33
Figura 16. Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por letras de (a) até (h) da segunda réplica deste segundo experimento. _____	34
Figura 17. Cubo de delineamento fatorial do segundo ensaio quimiométrico. _____	37
Figura 18. Cubo fatorial dos efeitos das variáveis do segundo ensaio quimiométrico. _____	38
Figura 19. Distribuição do potencial zeta de AgNPs do primeiro ensaio quimiométrico. _____	39
Figura 20. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra 6 da primeira duplicata do segundo ensaio quimiométrico ($\lambda_{\text{máx}}$ 585 nm). (a,b,c) Imagens de campo claro das partículas de AgNPs. (d) Espectro de absorção correspondente da amostra. Na figura está também a estatística realizada. _____	41
Figura 21. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra 2 da primeira triplicata do segundo ensaio quimiométrico ($\lambda_{\text{máx}}$ 400 e 689 nm). (a,b,c) Imagens de campo claro de AgNPs; (d) Perfil espectral de absorção das partículas e (e) estatística de distribuição do tamanho com diâmetro médio. _____	42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Exposições das variáveis experimentais das 8 amostras obtidas em cada um dos ensaios quimiométricos propostos, realizados em triplicata. _____21
- Tabela 2.** Dados do primeiro ensaio quimiométrico. _____27
- Tabela 3.** (a) Efeitos da frequência de agitação magnética; (b) Efeitos do volume de semente; (c) Efeitos do volume de AgNO_3 ; ambos os efeitos do primeiro ensaio quimiométrico. _____28
- Tabela 4.** Efeitos de cada variável e Interações entre os efeitos das variáveis \pm o erro padrão obtido através do desvio padrão das respostas (λ) do primeiro ensaio quimiométrico. _____30
- Tabela 5.** Dados do segundo ensaio quimiométrico. _____36
- Tabela 6.** (a) Efeitos da frequência de agitação magnética; (b) Efeitos do volume de semente; (c) Efeitos do volume de AgNO_3 ; ambos os efeitos do segundo ensaio quimiométrico. _____37
- Tabela 7.** Efeitos de cada variável e Interações entre os efeitos das variáveis \pm o erro padrão obtido através do desvio padrão das respostas (λ). _____38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1 NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	11
3.2 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE.....	13
3.3 QUIMIOMETRIA.....	15
4 METODOLOGIA.....	17
4.1 PREPARAÇÃO DE AgNPs.....	17
4.2 OTIMIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO DE AgNPs UTILIZANDO QUIMIOMETRIA.....	19
4.3 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA E ESTRUTURAL DOS SISTEMAS.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1 PRIMEIRO ENSAIO QUIMIOMÉTRICO DE PREPARAÇÃO DE AgNPs	22
5.2 SEGUNDO ENSAIO QUIMIOMÉTRICO DE PREPARAÇÃO DE AgNPs	32
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRASMISSÃO	41
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é a ciência que estuda o processo de produção, caracterização e aplicação de materiais em escala de 1 a 100 nm. Partículas que se encontram em tamanhos acima desta escala podem ser consideradas nanopartículas se as propriedades químicas, físicas e biológicas forem modificadas (FDA, 2017). Materiais reduzidos a escala nanométrica dão a possibilidade de obtenção de várias características e novas propriedades físico-químicas e estruturais como, por exemplo, novas propriedades ópticas, aumento da reatividade, maior área de superfície de contato e interações específicas com sistemas biológicos (CARUSO, 2020).

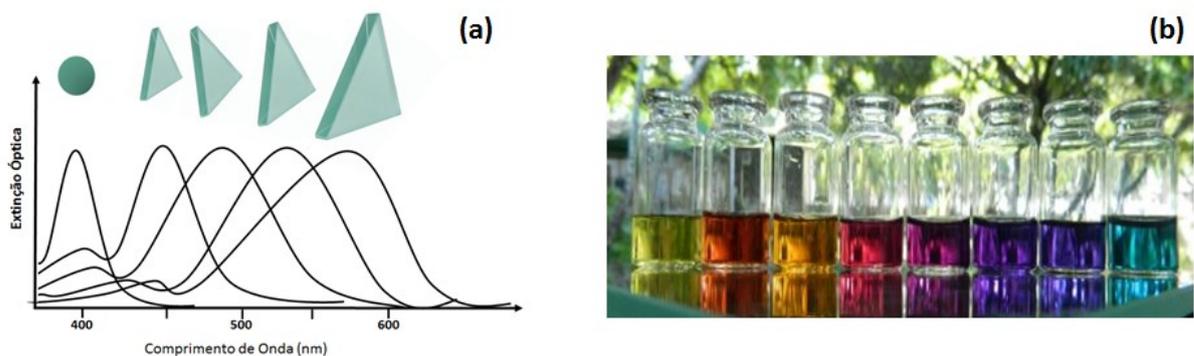
As nanopartículas de prata (AgNPs), obtidas na forma coloidal, apresentam geralmente dimensões entre 10 a 100 nm. Estas nanopartículas possuem diversas propriedades úteis à área da saúde, com ênfase a sua atuação antimicrobiana sendo uma alternativa a resistência bacteriana, ação em terapia fotodinâmica, quimioterapia, radioterapia, entrega direcionada de medicamentos, entre outros (MIRANDA *et al.*, 2022). As AgNPs podem ser sintetizadas por diversas metodologias físicas, químicas e biológicas (IRAVANI *et al.*, 2014). Uma destas metodologias é proposta por Aherne *et al.* (2008). Esta ocorre em duas etapas, inicialmente com a obtenção de esferas metálicas (sementes) com o uso de um polímero como agente surfactante, o poli(4-estirenosulfonato) - PSSS, que tem preferência por algumas faces das esferas de prata criando defeitos em sua superfície. Essa interação do PSSS é determinante para definir as faces onde ocorrerá o crescimento, segunda etapa da síntese de AgNPs, na qual ocorre a catálise das sementes sintetizadas com o polímero pelo ácido ascórbico, seguido da adição de íons Ag^+ , controlando a forma e o tamanho pela quantidade de semente adicionada no meio reacional, com predominância de formas prismáticas (>95%).

As nanopartículas metálicas de metais nobres como ouro, prata e cobre possuem o fenômeno denominado de ressonância plasmônica de superfície, que pode ser basicamente descrito como a interação entre a luz e a matéria. Quando ocorre a incidência de luz sob os elétrons localizados na banda de valência das nanopartículas metálicas, resulta na oscilação da nuvem eletrônica na superfície destas partículas promovendo a inversão eletrônica dessa superfície, devido a ressonância plasmônica os metais nobres em forma coloidal apresentam

colorações diversas influenciadas também pela geometria das nanopartículas (EUSTIS *et al.*, 2005).

As morfologias das AgNPs se apresentam geralmente como esféricas, porém podem se apresentar de diversas formas e estão ligadas intrinsecamente ao tamanho da partícula e a ressonância de plasmons em sua superfície, possibilitando inúmeras aplicações, como por exemplo, ópticas, catalíticas, farmacêuticas, biomédicas e no desenvolvimento de sensores (FAIRUZI *et al.*, 2018). Podem ainda ser utilizadas na amplificação de fluorescência por seus efeitos plasmônicos, atuando na inativação fotodinâmica de microrganismos, que com o auxílio de um fotossensibilizador e uma fonte de luz são produzidos radicais livres que inativam os microrganismos (JESUS *et al.*, 2018). A Figura 1(a) mostra a variação plasmônica de AgNPs prismáticas obtidas a partir do crescimento de esferas, decorrentes das variações de seus tamanhos. AgNPs prismáticas são obtidas através de crescimento anisotrópico em meio aquoso, podendo-se variar sua banda plasmônica em toda a região do visível (400 – 800 nm). Como demonstrado na Figura 1 (b), nosso grupo de pesquisas tem preparado vários destes sistemas. Observa-se uma fotografia que mostra dispersões coloidais de AgNPs em diferentes tamanhos de partículas prismáticas (18-40 nm), com variação na coloração destas.

Figura 1 – (a) Variação da banda de plásmon com a variação de tamanho de nanoprismas de Ag; (b) dispersões coloidais contendo nanoprismas de Ag (18 a 40 nm) preparados pelo Grupo NanoBio/UFPE.



Fonte: Grupo NanoBio

Existem dificuldades experimentais na preparação das AgNPs proposta por Aherne *et al.* (2008) com relação à falta de controle cinético do crescimento das partículas em meio coloidal, que pode ser ocasionado por diversos fatores como influência da luz, temperatura ambiente, entre outros. A síntese das AgNPs possuem variáveis experimentais (p.ex. controle da agitação magnética e de gotejamento, temperatura do processo, concentração relativa dos reagentes, etc) que resultam em grandes variações de obtenção das nanopartículas prismáticas. Isso vem sendo observado ao longo da realização dos experimentos em trabalhos anteriores de iniciação científica e diferentes comprimentos de onda de seu máximo de absorção podem surgir para partículas com o mesmo procedimento experimental utilizado. Estas condições experimentais podem ser melhor controladas através da automatização de alguns passos almejando uma metodologia reprodutível. Além disso, é necessário entender melhor a cinética da preparação, para isso pode-se buscar entender quais são fatores ou variáveis que possuem maior influência na síntese de nanopartículas de prata. Este estudo utilizou ensaios quimiométricos como ferramenta analítica para determinar quantitativamente a influência para o controle cinético de 3 variáveis (frequência de agitação magnética do sistema de crescimento, volume de semente disponível a preparação e volume de prata depositado gota a gota afim de promover o crescimento das nanopartículas em reação com o ácido cítrico), em 2 níveis, se tratando de um experimento fatorial 2^3 .

A denominação “quimiometria” foi usada pela primeira vez em 1971 pelo químico orgânico Svante Wold, que foi o autor do primeiro trabalho que menciona a palavra quimiometria, publicado na revista sueca *Kemisk Tidskrift* em 1972 (FERREIRA, 2015). De acordo com a União Internacional de Química Pura Aplicada (IUPAC), a quimiometria é a aplicação de estatística à análise de dados químicos (de química orgânica, analítica, química medicinal, etc) e o planejamento de experimentos químicos e simulações (IUPAC, 1997). Dessa forma, a quimiometria é uma importante ferramenta a ser utilizada, também para fins farmacêuticos, como no presente trabalho de conclusão de curso para aperfeiçoar a síntese de AgNPs adaptada do proposto por Aherne *et al.*, 2008. O presente estudo tem como objetivo principal a padronização da preparação de AgNPs para obtenção de nanoprismas de prata com comprimentos de onda da banda de plásmon $\lambda > 580$ nm, para aplicações farmacêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar a preparação de nanopartículas de prata crescidas por sementes (*bottom up*) utilizando a quimiometria como ferramenta analítica para melhoramento do controle cinético do crescimento das partículas em meio coloidal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar uma melhor compreensão da cinética da preparação de AgNPs utilizando quimiometria como ferramenta analítica;
- Obtenção de nanoprismas de prata com banda espectral com máximo de absorbância acima de 580 nm para aplicações farmacêuticas;
- Caracterização das AgNPs óptica (espectrofotometria de absorção), estrutural (microscopia eletrônica de transmissão – MET) e carga superficial (potencial Zeta).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

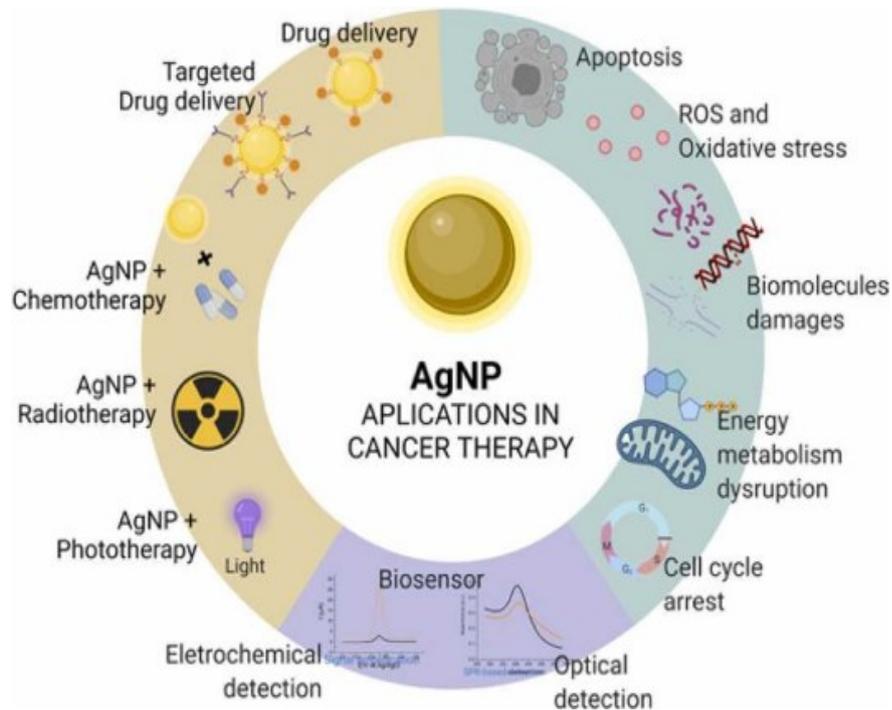
3.1 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas metálicas possuem desde um pequeno número de átomos até numerosos átomos metálicos (p.ex. uma nanoesfera de prata de 10 nm de diâmetro tem aproximadamente 32725 átomos de Ag), estabilizados por ligantes, surfactantes, polímeros ou dendrímeros em suas superfícies. A prata é um metal de transição, assim como cobre e ouro, é um metal macio, branco e brilhante, que possui alta condutividade elétrica e térmica. Tem sido amplamente conhecida devido aos seus benefícios médicos e terapêuticos. É utilizada de diversas maneiras como moedas, vasos, soluções, folhas, suturas e colóides como loções, unguentos e assim por diante. Há relatos de propriedades médicas da prata datados de mais de 2000 anos. Desde o século XIX, compostos à base de prata têm sido envolvidos na aplicação antimicrobiana (HUSSEIN, 2014).

As AgNPs foram reconhecidas por serem desenvolvidas para vários propósitos físicos, biológicos e farmacêuticos (NAM *et al.*, 2016). Estas nanopartículas desempenham um grande papel no estudo da biologia e da medicina devido às suas propriedades físico-químicas atraentes. Os produtos de prata têm sido conhecidos por terem fortes efeitos inibitórios em células, assim como um amplo espectro de atividades antimicrobianas (FIRDHOUSE *et al.*, 2015), que tem sido praticado há séculos para prevenir e cuidar de várias doenças, a maioria nomeadamente infecções (SHAKEEL *et al.*, 2016). Além disso, as nanopartículas de prata possuem atividade antifúngica, anti-inflamatória, antiviral e antiplaquetária (SHANKAR *et al.*, 2005). A Figura 2 mostra algumas das aplicações das nanopartículas de prata na área de saúde, em especial para o tratamento contra o câncer.

As propriedades químicas e físicas das nanopartículas fornecem funções úteis que podem ser aplicadas em diferentes áreas, como na medicina, biotecnologia, ciência dos materiais e setores de energia (FALCÃO-FILHO *et al.*, 2007). Novas aplicações de nanopartículas estão sendo apresentadas devido ao seu tamanho, distribuição e morfologia.

Figura 2 – Esquema representando as aplicações de AgNPs em saúde.



Fonte: MIRANDA *et al.*, 2022.

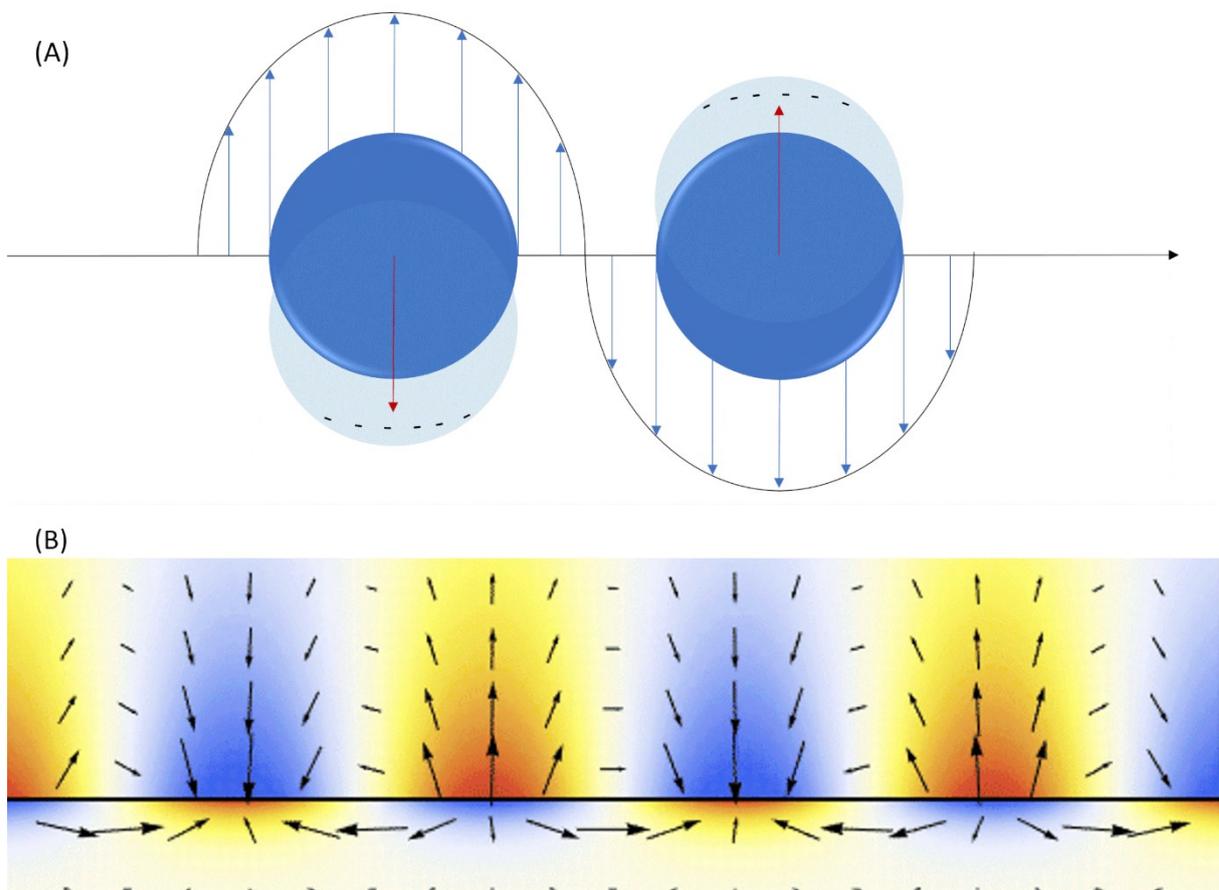
Atualmente a população é exposta diariamente aos novos vírus causadores de doenças, como AIDS, gripe aviária, síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), vírus Zika, vírus Ebola, (ALQAHTANI *et al.*, 2017; KALIMUTHU *et al.*, 2017), o novo coronavírus (COVID-19), entre outros, para tal, o uso de AgNPs como ferramenta no combate da propagação dos agentes infecciosos é foco de diversos pesquisadores devido as suas propriedades físico-químicas e biológicas únicas (KALIMUTHU *et al.*, 2017). Estas pesquisas evidenciam que as AgNPs têm grande potencial de utilidade para aplicações farmacêuticas.

Uma das aplicações citadas por MIRANDA *et al.* (2022) é a utilização de AgNPs em terapia fotodinâmica, que utiliza um fotossensibilizador e uma fonte de luz para promover dano a células malignas ao organismo. As AgNPs não atuam como fotossensibilizadores, porém seu efeito plasmônico pode amplificar os efeitos de um fotossensibilizador associado a AgNPs, como por exemplo o azul de metileno (AM), que possui um comprimento de onda máximo de absorção em 660 nm. O grupo NanoBio/UFPE busca obter conjugados AgNPs + AM para aplicações em terapia fotodinâmica, para tal é ideal que as AgNPs possuam um comprimento de onda máximo de absorção próximo ao do AM, também na coloração azul acima de 580 nm.

3.2 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE

A denominação plasmônica está atrelada às propriedades ópticas únicas apresentadas por nanopartículas metálicas, possibilitando a manipulação ativa da luz em escala nanométrica (BRONGERSMA e SHALAEV, 2010). As nanopartículas metálicas podem ser excitadas por radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta, infravermelho e visível, tendo essa última absorção denominada de banda plasmônica na região do visível ou ressonância plasmônica de superfície (*Surface Plasmon Resonance, SPR*) (NETTO-FERREIRA, 2015). Esse fenômeno acontece pela oscilação de elétrons na camada de valência dos átomos metálicos devido a excitação óptica promovido por exposição a uma fonte de luz. O comprimento de onda de absorção plasmônica (banda de plásmom) é dependente de diversos fatores como tamanho de partículas, agente estabilizante de superfície e formas geométricas (CORRÊA, 2017). Observa-se na Figura 3 a representação gráfica da ressonância plasmônica de superfície localizada (*Localized Surface Plasmon, LSP*) e polarizada (*Surface Plasmon Polariton, SPP*).

Figura 3 - Ressonância Plasmônica de Superfície (A) localizada e (B) polarizada.

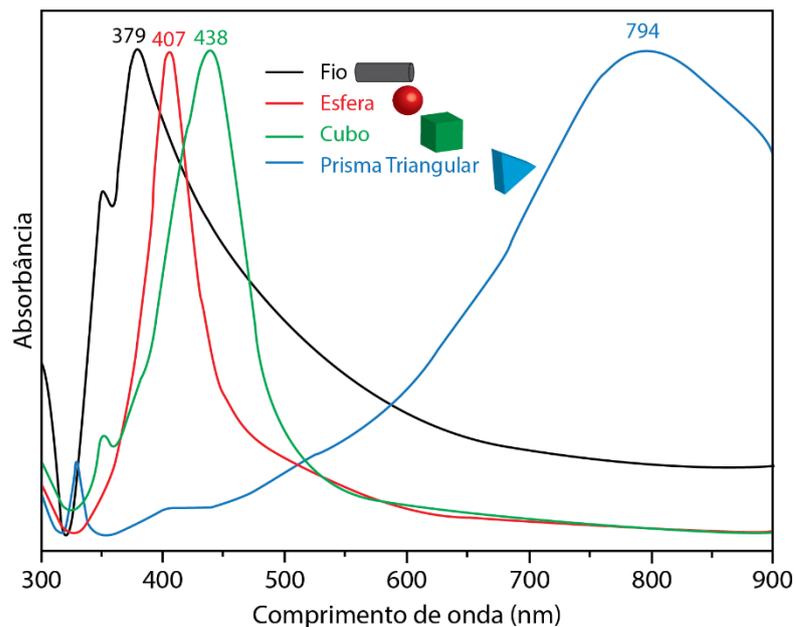


Fonte: Adaptado de HOU e CRONIN, 2013.

O SPP ocorre quando fótons de luz incidem em filmes finos metálicos e são confinados em sua superfície. O LSP ocorre quando o diâmetro da nanopartícula metálica é muito menor que o comprimento de onda incidente. Em ambos os casos ocorre ressonância, as nanopartículas de metais nobres como prata e ouro, e outros metais como cobre e cobalto, possuem sua constante dielétrica alta (-) na parte real e baixa (+) na parte imaginária, sendo reconhecidas como nanopartículas plasmônicas (HOU e CRONIN, 2013).

As partículas de metais nobres como ouro, prata e cobre, adquirem colorações características quando suspensas em meio coloidal, devido a posição da ressonância no espectro de absorção, identificado pelo pico máximo de absorbância, em consequência da absorção ou espalhamento de luz nas partículas em determinada faixa do espectro de luz visível (MENEGOTTO, 2011). As diferentes colorações são observadas as cores complementares das cores absorvidas relacionadas ao comprimento de onda em que se encontra sua absorbância, estas cores estão associadas ao tamanho e morfologia das nanopartículas, o tamanho das nanopartículas de prata aumenta com o aumento do máximo de absorbância em relação ao comprimento de onda, alterando também a morfologia que pode ser fio, esfera, cubo ou prisma triangular (DA SILVA *et al.*, 2015), como mostra a Figura 4.

Figura 4 - Espectro de absorção UV-Vis apresentando diferentes faixas de absorção da luz (banda plasmônica) de nanopartículas de prata em diferentes morfologias: fio, esfera, cubo e prisma triangular, respectivamente.



Fonte: Adaptado de DA SILVA *et al.*, 2015.

3.3 QUIMIOMETRIA

De acordo com a Sociedade Internacional de Quimiometria (*Internacional Chemometrics Society – ICS*), a quimiometria é definida como a disciplina química relacionada a medidas realizadas em um sistema ou processo químico, obtendo informações sobre o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos, empregando uma lógica formal para planejar ou selecionar procedimentos e experimentos em condições ótimas e promover o máximo de informação química relevante para a análise de dados químicos.

Em química analítica, a quantificação de um componente ou de uma propriedade em uma amostra pode ser obtida por diversas técnicas que estão condicionadas a uma calibração. A calibração univariada utiliza apenas uma variável para estabelecer a relação quantitativa, assumindo um sinal seletivo, sendo necessária a separação física ou química dos componentes da amostra para que estas sejam detectadas por meio de colunas cromatográficas ou métodos de extração. No entanto, a calibração multivariada utiliza diversas variáveis, o que permite a separação matemática dos sinais analíticos, dispensando a separação físico-química dos interferentes da amostra, não sendo necessário o requisito de sinal analítico seletivo para a variável medida, pois a seletividade se dá no conjunto de variáveis (BRERETON, 2007).

De acordo com Neves *et al.* (2002), o planejamento é representado por b^k , sendo que “k” representa o número de fatores ou variáveis e “b” o número de níveis escolhidos. Para estes autores o caso mais simples de planejamento fatorial é aquele em que cada fator k está presente em apenas dois níveis (experimento fatorial 2^k), ou seja, em um experimento com k fatores (ou variáveis) e dois níveis, são realizadas $2 \times 2 \times \dots \times 2$ (k vezes) = 2^k observações da variável resposta. Esta representação mostra que, se em um planejamento forem escolhidos 2 diferentes níveis para 3 fatores (2^3), o número de tratamentos diferentes a serem realizados será 8.

Para identificar as tentativas individuais é utilizada, dentre outras, a seguinte notação:

- Os fatores são representados por letras;
- Os níveis pelos sinais de mais (+) e de menos (-);
- O sinal de menos (-) representa o nível inferior, a condição atual ou a ausência de fator.

O presente estudo pretende analisar o comportamento plasmônico de AgNPs relacionadas a cinética variada de sua síntese. A propriedade plasmônica é relacionada as

propriedades de texturas dos nanomateriais, sendo importante o controle do tamanho, morfologia e composição para modular a aplicabilidade dessas partículas. A utilização desta estratégia é possível pela tecnologia de síntese controlada de nanopartículas, realizando o controle fino e preciso de parâmetros de processo durante e após a produção das nanopartículas de prata, tendo como a principal ferramenta deste estudo a quimiometria. O controle pode ser analisado pela técnica de Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis).

4 METODOLOGIA

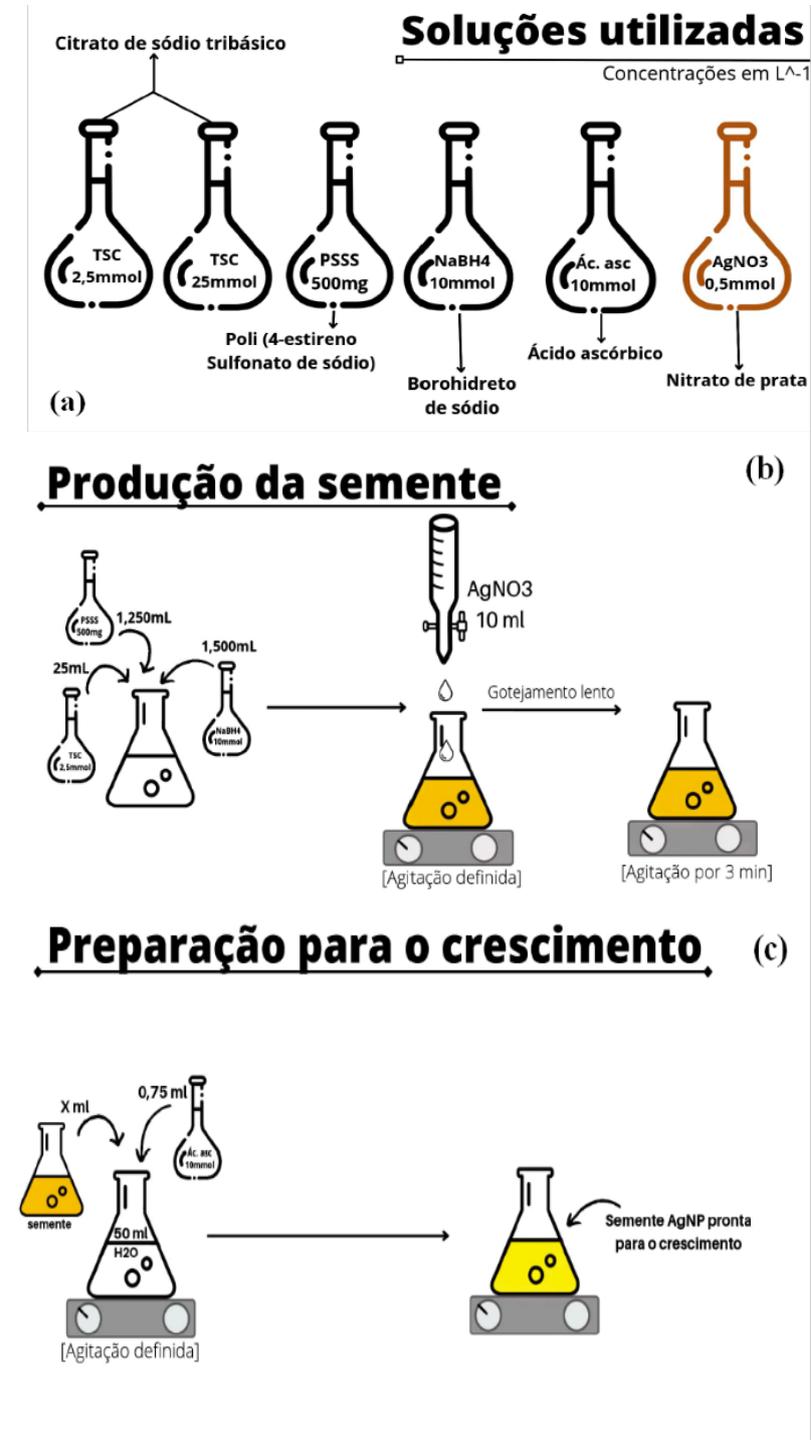
4.1 PREPARAÇÃO DE AgNPs

Reagentes: Citrato de Sódio (TSC, Sigma Aldrich, 99%); Poli(4-estirenosulfonato) (PSSS, Sigma Aldrich, 1000 kDa); Borohidreto de Sódio (NaBH_4 , Sigma Aldrich, 98%); Nitrato de Prata (AgNO_3 , Sigma Aldrich, 98%); Ácido Ascórbico (Sigma Aldrich, 99%).

Método:

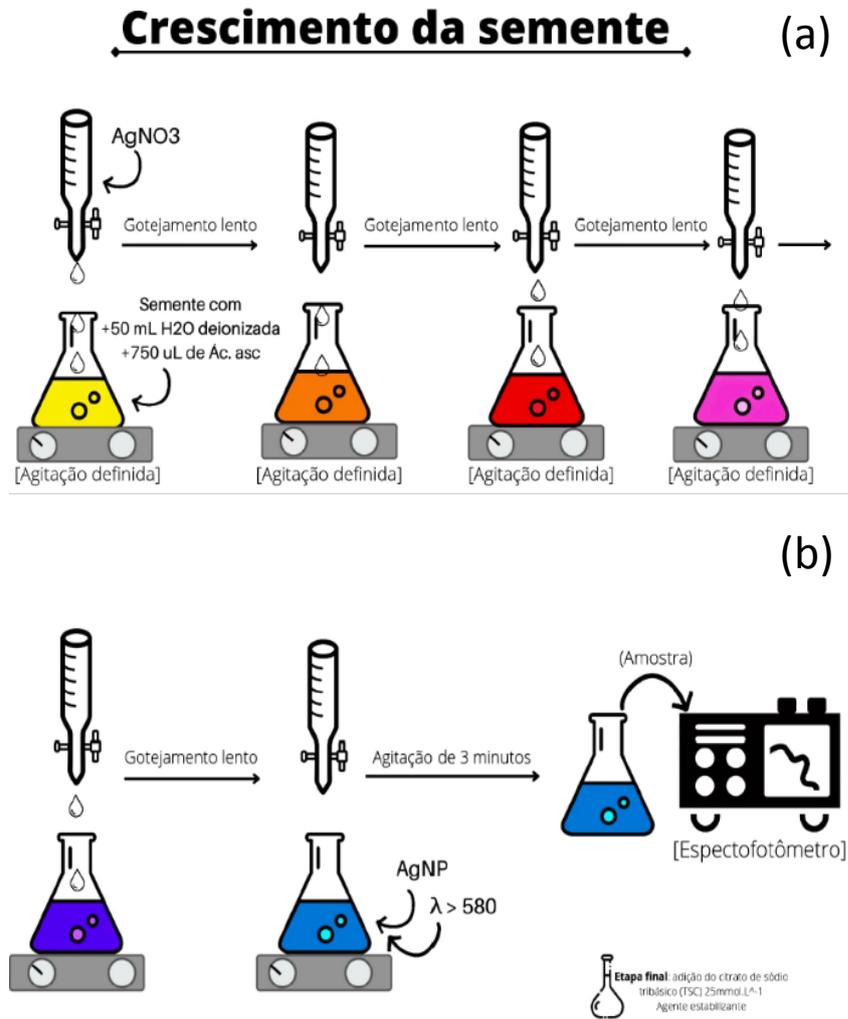
A preparação das nanopartículas foi realizada adaptando-se a metodologia de Aherne *et al.*, 2008. Resumidamente, sementes de prata foram produzidas em meio aquoso através da combinação de solução de citrato de sódio (5 mL a $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), solução de PSSS 1.000 kDa (0,25 mL, 500 mg.L^{-1}) e solução de borohidreto de sódio (NaBH_4 0,3 mL, 10 mmol.L^{-1} , recém preparada), seguido pela adição de solução aquosa de AgNO_3 ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, gota a gota). O crescimento foi realizado, sob agitação com frequência variável, com 5 mL de solução de ácido ascórbico ($75 \mu\text{L}$, 10 mmol.L^{-1}) e volumes variados da semente, seguido pela adição de solução aquosa de AgNO_3 ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) variando volume de AgNO_3 . Após o fim da síntese, foi adicionada uma solução aquosa do agente estabilizante citrato de sódio (0,5 mL a 25 mmol.L^{-1}), para evitar a agregação das partículas. As Figuras 5 e 6 ilustram a esquematização da preparação de nanopartículas de prata através do método semente/crescimento.

Figura 5 – Esquematização da preparação de AgNPs (parte 1). (a) Soluções utilizadas no processo com suas devidas concentrações; (b) Preparação da semente de AgNPs; (c) Preparação para o crescimento de AgNPs, ponto de partida.



Fonte: Grupo NanoBio

Figura 6 – Esquemática da preparação de AgNPs (parte 2). (d) Crescimento de AgNPs observado pelas alterações de coloração do meio devido a sua modificação estrutural e seu poder de efeito plasmônico; (e) Finalização do processo de crescimento de AgNPs e caracterização por espectrofotometria UV/Vis identificando a banda de plásmon.



Fonte: Grupo NanoBio

4.2 OTIMIZAÇÃO DA PREPARAÇÃO DE AgNPs UTILIZANDO QUIMIOMETRIA

Para otimizar a preparação de AgNPs e conseguir um maior controle cinético no crescimento das sementes (e portanto maior reprodutibilidade), utilizou-se do ensaio quimiométrico como ferramenta analítica onde foi selecionado 2 níveis para 3 variáveis, se tratando de um experimento fatorial 2^3 , sendo executados 8 vezes o experimento para todas as possíveis combinações. Foram definidas 3 variáveis experimentais (frequência de agitação do

sistema; volume de semente a ser adicionada na etapa de crescimento; volume de AgNO_3 a ser adicionado gota a gota na etapa de crescimento). Para cada uma destas variáveis foi atribuído um polo positivo (+) igual ao maior valor de frequência de agitação ou volume a ser adicionado no sistema, e um polo negativo (-) igual ao menor valor de frequência de agitação ou volume a ser adicionado no sistema, totalizando 8 experimentos diferentes por ensaio realizados em triplicata. Foram realizados 2 ensaios quimiométricos utilizando as mesmas 3 variáveis com alteração dos níveis de cada variável, afim de amplificar a compreensão da cinética da metodologia proposta e observar quais condições alcançam mais proximidade com a obtenção de AgNPs com máximo de absorção em um comprimento de onda acima de 580 nm. A seguir as variáveis e níveis do primeiro e segundo ensaio quimiométrico realizado no presente estudo, a Tabela 1 expõe as variáveis e níveis conforme cada amostra preparada, totalizando 8 amostras por experimento fatorial 2^3 .

➤ Primeiro Ensaio Quimiométrico – Padronização da Síntese de AgNPs

○ Variáveis Experimentais:

1. Agitação Magnética
(+) 700 rpm (-) 500 rpm
2. Volume de Semente
(+) 4 mL (-) 3 mL
3. Volume de AgNO_3
(+) 15 mL (-) 10 mL

➤ Segundo Ensaio Quimiométrico – Padronização da Síntese de AgNPs

○ Variáveis Experimentais:

1. Agitação Magnética
(+) 500 rpm (-) 300 rpm
2. Volume de Semente
(+) 3 mL (-) 2 mL
3. Volume de AgNO_3
(+) 25 mL (-) 15 mL

Tabela 1 - Exposições das variáveis experimentais das 8 amostras obtidas em cada um dos ensaios quimiométricos propostos, realizados em triplicata.

Amostras/Ensaio	1	2	3
1	+	+	+
2	+	-	-
3	+	+	-
4	+	-	+
5	-	+	-
6	-	-	+
7	-	+	+
8	-	-	-

Fonte: Próprio autor.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA E ESTRUTURAL DOS SISTEMAS

Suspensão contendo AgNPs foram caracterizados utilizando-se espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis, na região entre 350 e 800 nm, utilizando espectrofotômetro modelo Evolution 600s (Thermo Scientific®).

Foram analisados os potenciais zeta de superfície das sementes e dos nanoprismas obtidos, utilizando Zetasizer Nanoseries S90 (Malvern Analítica, UK). Aliquotas de 5 mL de cada sistema foi combinado a 50 mL de água deionizada, com posterior sonicação das amostras por 30 minutos. Cerca de 1 mL de cada amostra foi retirada para análise.

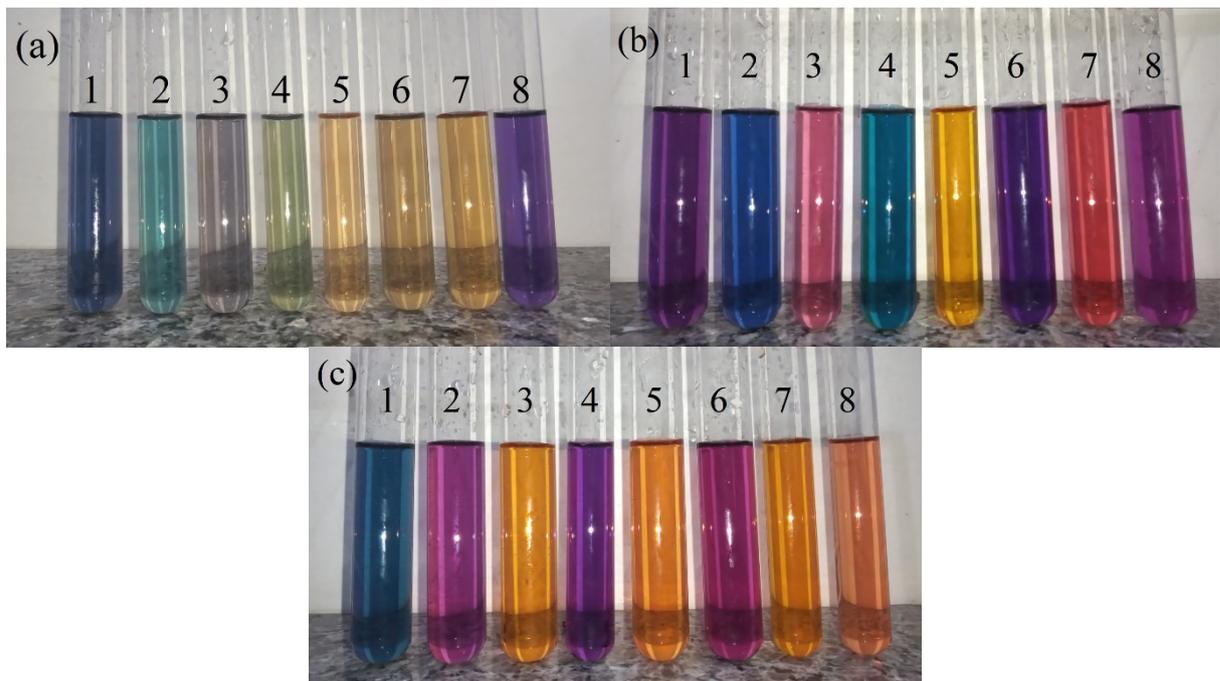
As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram adquiridas num microscópio eletrônico Spirit Biotwin G2 a 120 kV (FEI Tecnai), acoplado a uma câmera CD MegaView Olympus 2K e Eagle 4K. As amostras foram preparadas gotejando-se aproximadamente 10 µL da suspensão de AgNPs concentrada em uma grade de cobre com filme de carbono e deixando-se secar antes da visualização. Aspectos morfológicos das imagens foram analisados por meio do software ImageJ. O tamanho das partículas (D) foi definido pelo seu comprimento longitudinal (obtido de uma ponta até a base oposta), e a largura foi obtida pela medição das partículas empilhadas lateralmente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRIMEIRO ENSAIO QUIMIOMÉTRICO DE PREPARAÇÃO DE AgNPs

Este ensaio foi realizado em triplicata, e serão expostos aqui os resultados de cada uma dessas réplicas do primeiro ensaio quimiométrico de síntese de AgNPs. A Figura 7 mostra 3 fotografias das 3 réplicas dos experimentos, em cada uma das réplicas 8 amostras foram obtidas no primeiro ensaio quimiométrico. A variação das cores das amostras de AgNPs está relacionada à banda de plásmom e o número do sistema relaciona-se ao experimento fatorial utilizado.

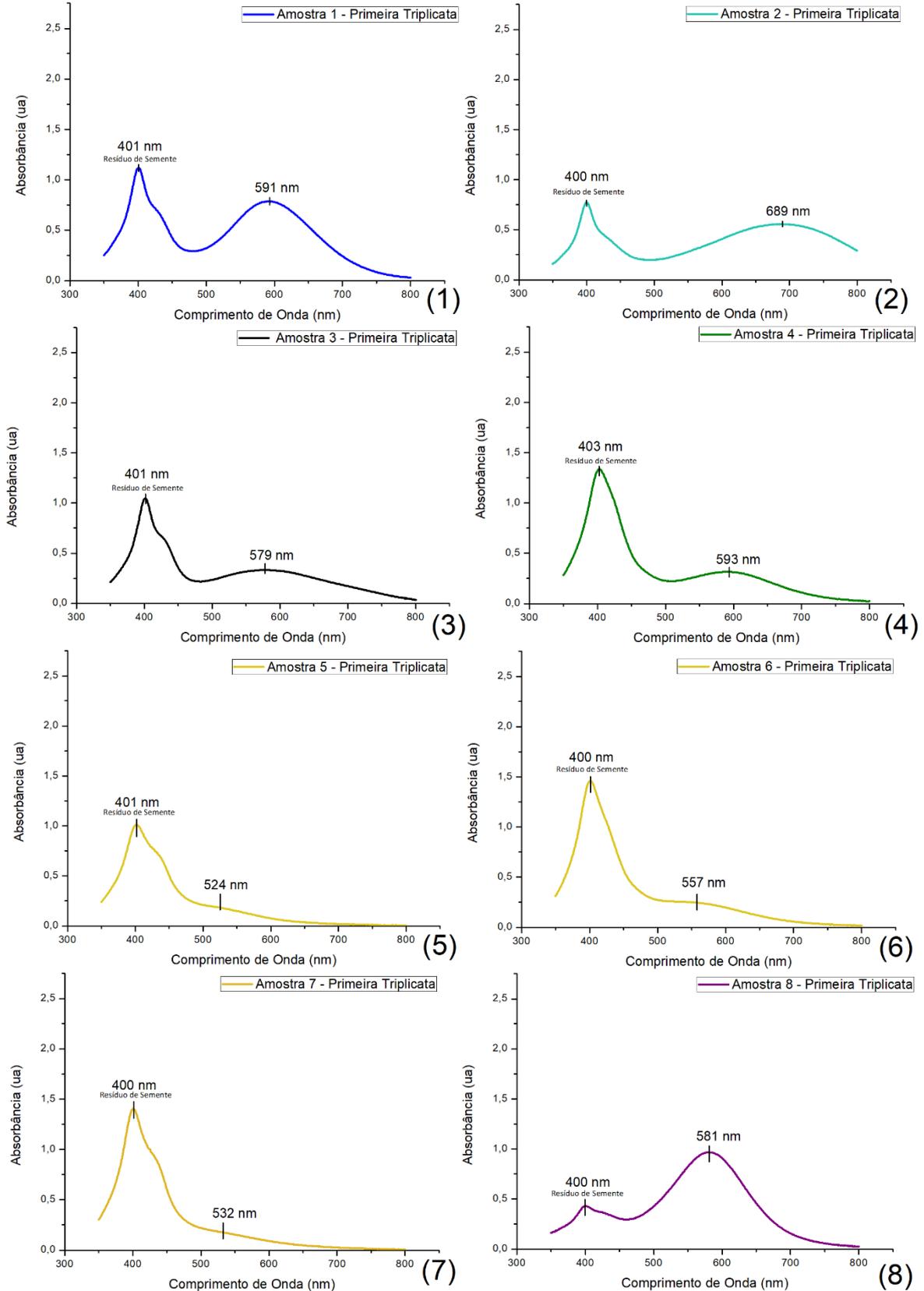
Figura 7 – (a) Amostras de AgNPs produzidas na primeira réplica; (b) amostras de AgNPs produzidas na segunda réplica; (c) amostras produzidas na terceira réplica; do primeiro ensaio quimiométrico da síntese de AgNPs, enumeradas de 1 à 8.



Fonte: Próprio autor.

Após a obtenção das amostras foi realizado a caracterização óptica através de espectrofotometria de absorção UV-Vis utilizando a faixa espectral entre 350 nm até 850nm de comprimento de onda, assim foi possível obter a banda de plásmom de cada uma das 24 amostras obtidas neste primeiro ensaio quimiométrico. A Figura 8 mostra a banda de plásmom das 8 amostras obtidas na primeira réplica deste primeiro ensaio. Apenas as amostras 1 e 2 apresentaram coloração azul.

Figura 8 – Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por números de (1) até (8) da primeira réplica deste primeiro ensaio proposto.

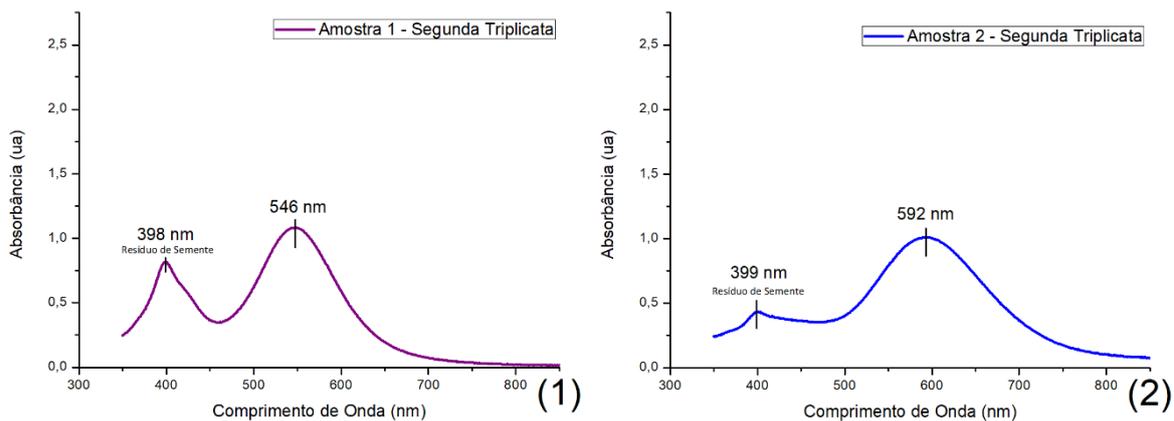


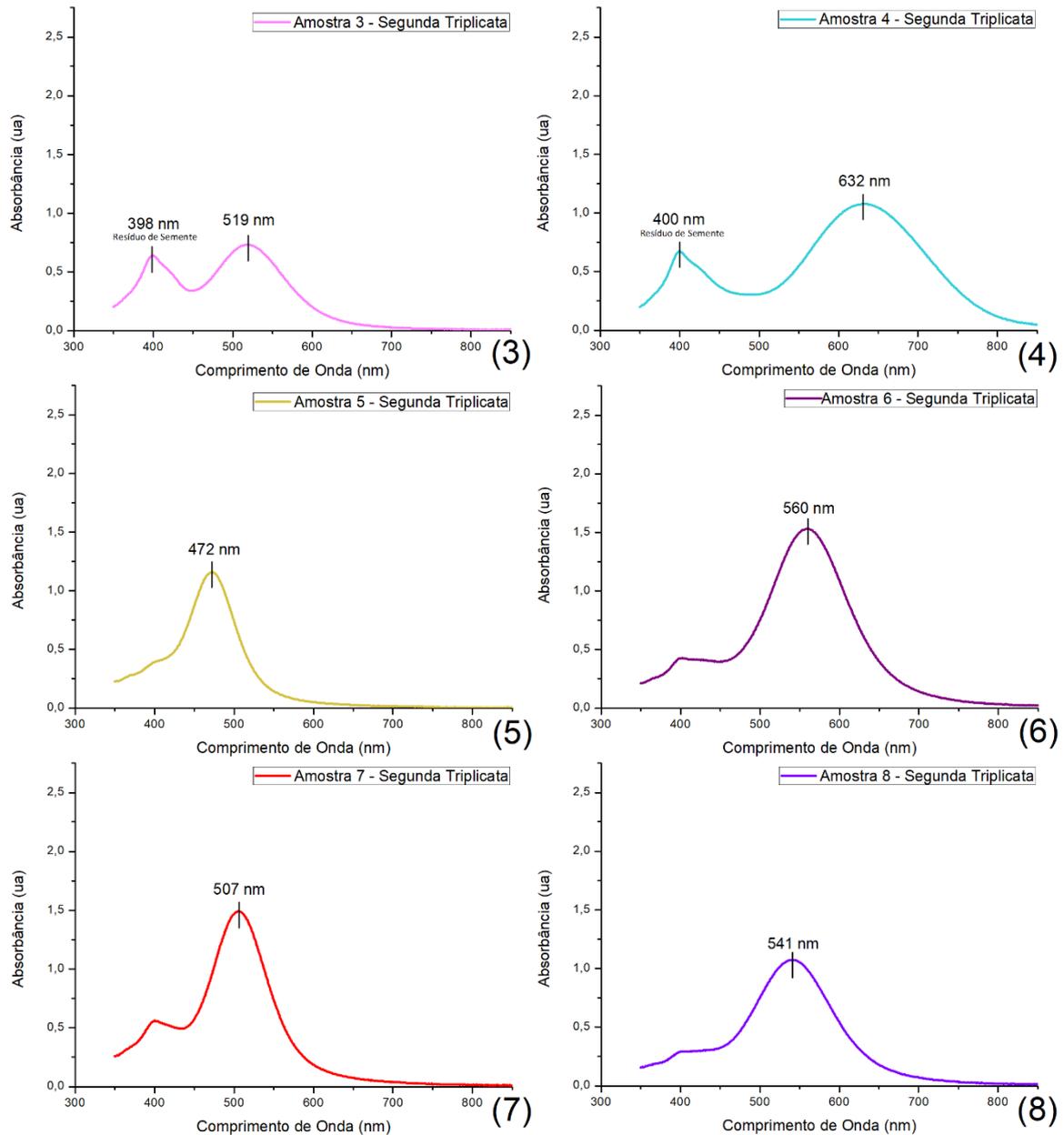
Fonte: Próprio autor.

É possível observar na Figura 8 dois máximos de absorção em todas as amostras, o primeiro, da esquerda para a direita, refere-se ao resíduo de semente que não conseguiu crescer, e o segundo referem-se às AgNPs crescidas. A preparação da semente é muito importante para o procedimento como um todo, as sementes foram preparadas todas seguindo o mesmo procedimento, um dos parâmetros muito importantes de se ter o controle nessa preparação é o gotejamento do AgNO_3 , a taxa de entrega da fonte de prata é a maior responsável pelo desenvolvimento das nanopartículas, a suspensão de sementes precisa ser pouco concentrada para promover um melhor crescimento das AgNPs. Não é favorável se ter uma intensidade de absorbância mais alta de resíduo de semente do que a banda de plásmon da AgNP produzida, pois indica baixo rendimento de produção de AgNPs crescidas. Nesta réplica apenas a amostra 8 obteve uma intensidade maior de AgNPs em comparação com o resíduo de sementes.

A Figura 9 mostra os espectros de absorção das 8 amostras da segunda réplica deste experimento fatorial. Nota-se que nenhuma das amostras obteve uma intensidade maior de resíduo de semente em comparação com a o máximo de absorbância em comprimento de onda das AgNPs crescidas. Nesta segunda réplica as amostras 2 e 4 apresentaram a cor azul com máximo de absorbância acima de 580 nm.

Figura 9 - Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por números de (1) até (8) da segunda réplica deste primeiro ensaio proposto.

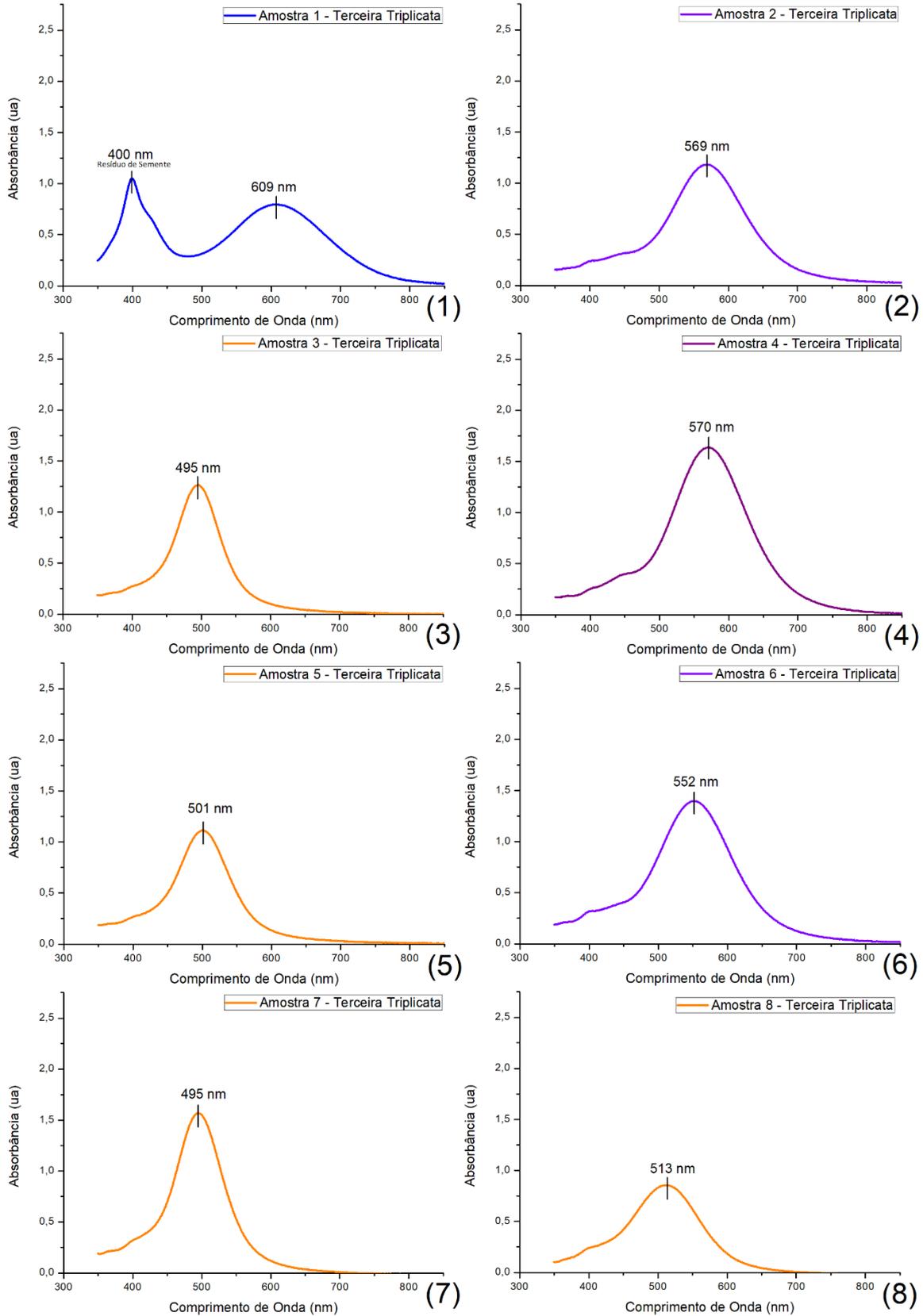




Fonte: Próprio autor.

A Figura 10 mostra as bandas de plásmon das 8 amostras da terceira réplica deste experimento. A amostra 1 obteve uma intensidade maior de resíduo de semente em comparação com a o máximo de absorbância em comprimento de onda das AgNPs crescidas, bem como também, apenas a amostra 1 alcançou a coloração azul chegando acima de 580 nm.

Figura 10 - Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por números de (1) até (8) da terceira réplica deste primeiro ensaio proposto.



Fonte: Próprio autor.

Os níveis foram denominados como (+) ou (-), indicando o nível mais baixo e o nível mais alto conforme apresentado na Tabela 2, e as variáveis abordadas na síntese de AgNPs foram (i) a frequência em rpm da agitação magnética utilizada no processo de crescimento das sementes, (ii) o volume em mL de sementes que foi adicionada ao sistema para iniciar seu processo de crescimento e (iii) o volume (mL) de AgNO₃ que em meio ao ácido cítrico promove o crescimento das sementes esféricas, atuando também em conjunto com o polímero PSSS que ordena para o formato prismático das nanopartículas de prata. A resposta (λ) é dada pela média \pm desvio padrão dos valores máximos de absorvância de plásmom obtidos em cada uma das réplicas.

Tabela 2 – Dados do primeiro ensaio quimiométrico.

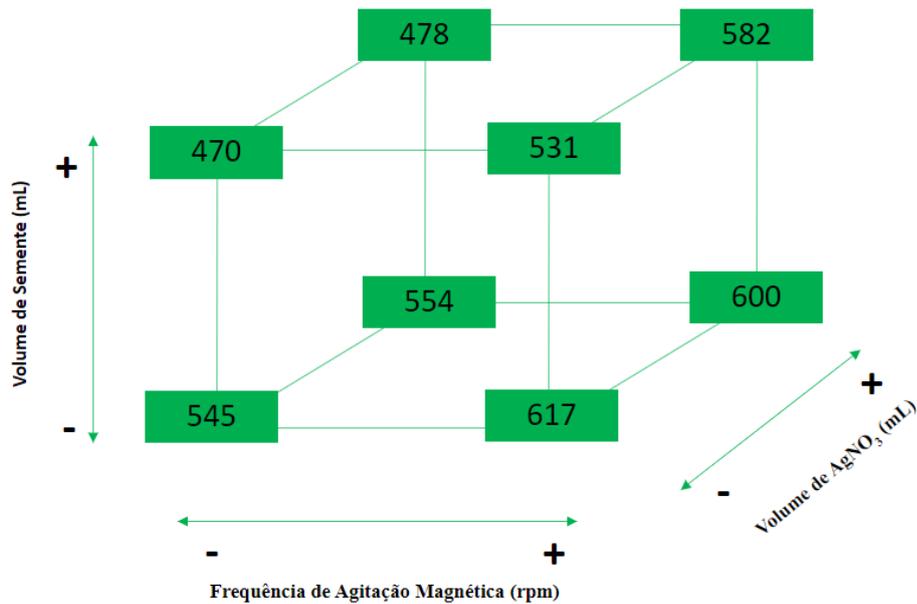
Agitação Magnética (rpm)		Volume de Semente (mL)		Volume de AgNO ₃		
(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
700	500	4	2	15	10	
Variáveis Codificadas						
Agitação Magnética		Volume de Semente		Volume de AgNO ₃		Resposta (λ)
+		+		+		582 \pm 33 nm
+		-		-		617 \pm 64 nm
+		+		-		531 \pm 43 nm
+		-		+		600 \pm 31 nm
-		+		-		470 \pm 33 nm
-		-		+		554 \pm 5 nm
-		+		+		478 \pm 41 nm
-		-		-		545 \pm 25 nm
Níveis das Variáveis						
Agitação Magnética		Volume de Semente		Volume de AgNO ₃		Resposta (λ)
700		4		15		582 \pm 33 nm
700		2		10		617 \pm 64 nm
700		4		10		531 \pm 43 nm
700		2		15		600 \pm 31 nm
500		4		10		470 \pm 33 nm
500		2		15		554 \pm 5 nm
500		4		15		478 \pm 41 nm
500		2		10		545 \pm 25 nm

Fonte: Próprio autor.

A Figura 11 traz a ilustração de um cubo de delineamento obtido a partir dos dados da Tabela 2, para leitura correta do cubo fatorial é preciso visualizar os 3 eixos x, y e z, onde x é

a frequência de agitação magnética em rpm, y é o volume de semente em mL, e z é o volume de AgNO₃ em mL. Cada eixo mostra o máximo e o mínimo dos níveis das variáveis, sendo obtida a resposta (λ) que é o comprimento de onda em nm do máximo de absorbância de cada uma das amostras sintetizadas. Busca-se obter partículas com máximo de absorbância acima de 580 nm, a partir disso avaliamos as respostas obtidas calculando os efeitos principais de cada uma das variáveis, conforme a Tabela 3.

Figura 11 – Cubo de delineamento fatorial do primeiro ensaio quimiométrico.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 3 – (a) Efeitos da frequência de agitação magnética; (b) Efeitos do volume de semente; (c) Efeitos do volume de AgNO₃; ambos os efeitos do primeiro ensaio quimiométrico.

Volume da Semente (mL)	Volume de AgNO ₃	Resposta (λ) F _{AM} (+) 700 rpm	Resposta (λ) F _{AM} (-) 500 rpm	Efeito F _{AM} (+) - F _{AM} (-)
4	15	582 nm	478 nm	104
2	15	600 nm	554 nm	46
4	10	531 nm	470 nm	61
2	10	617 nm	545 nm	72
Efeito Principal da Frequência de Agitação Magnética (Fam) (valor médio dos efeitos)				71

Agitação Magnética (rpm)	Volume de AgNO ₃	Resposta (λ) Vs (+) 4 mL	Resposta (λ) Vs (-) 2 mL	Efeito Vs (+) - Vs (-)
700	15	582 nm	600 nm	-18
700	10	531 nm	617 nm	-86
500	15	478 nm	554 nm	-76
500	10	470 nm	545 nm	-75

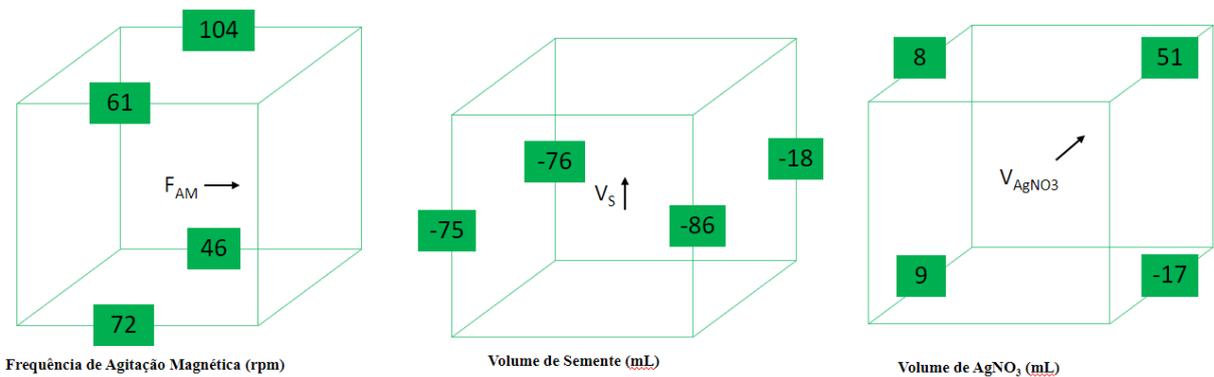
Efeito Principal do Volume da Semente (V_s) (valor médio dos efeitos)	-64
---	-----

Agitação Magnética (rpm)	Volume da Semente (mL)	Resposta (λ) V_{AgNO_3} (+) 15 mL	Resposta (λ) V_{AgNO_3} (-) 10 mL	Efeito V_{AgNO_3} (+) - V_{AgNO_3} (-)
700	4	582 nm	531 nm	51
700	2	600 nm	617 nm	-17
500	4	478 nm	470 nm	8
500	2	554 nm	545 nm	9
Efeito Principal da Volume de $AgNO_3$ (V_{AgNO_3}) (média dos efeitos)				13

Fonte: Próprio autor.

Os efeitos são obtidos calculando-se a diferença entre a resposta (λ) quando sua variável de interesse está no nível (+) menos a resposta (λ) com o nível (-) da variável de interesse. Assim, é possível obter os efeitos principais através da média dos efeitos de cada variável, 71 ± 21 para a frequência de agitação magnética em rpm, -64 ± 17 para o volume de semente em mL e 13 ± 18 para o volume de $AgNO_3$. Novamente é utilizado o cubo fatorial para ilustrar os efeitos de cada variável, na Figura 12 as arestas do cubo representam a diferença entre as respostas para cada uma das 4 combinações das variáveis fixadas, onde a seta no centro do cubo indica a direção em que a diferença foi calculada.

Figura 12 – Cubo fatorial dos efeitos das variáveis do primeiro ensaio quimiométrico.



Fonte: Próprio autor.

Observa-se na Figura 12 que os efeitos interagem entre as variáveis, para obter o efeito dessa interação é calculado, a cada duas variáveis, a média das 4 respostas quando os níveis são iguais (++) e a média das 4 respostas quando os níveis são opostos (+- e -+). Após é feito a diferença da média de níveis iguais menos a média de níveis diferentes.

Tabela 4 – Efeitos de cada variável e Interações entre os efeitos das variáveis \pm o erro padrão obtido através do desvio padrão das respostas (λ) do primeiro ensaio quimiométrico.

Fatores, Interações e Efeitos \pm Erro Padrão

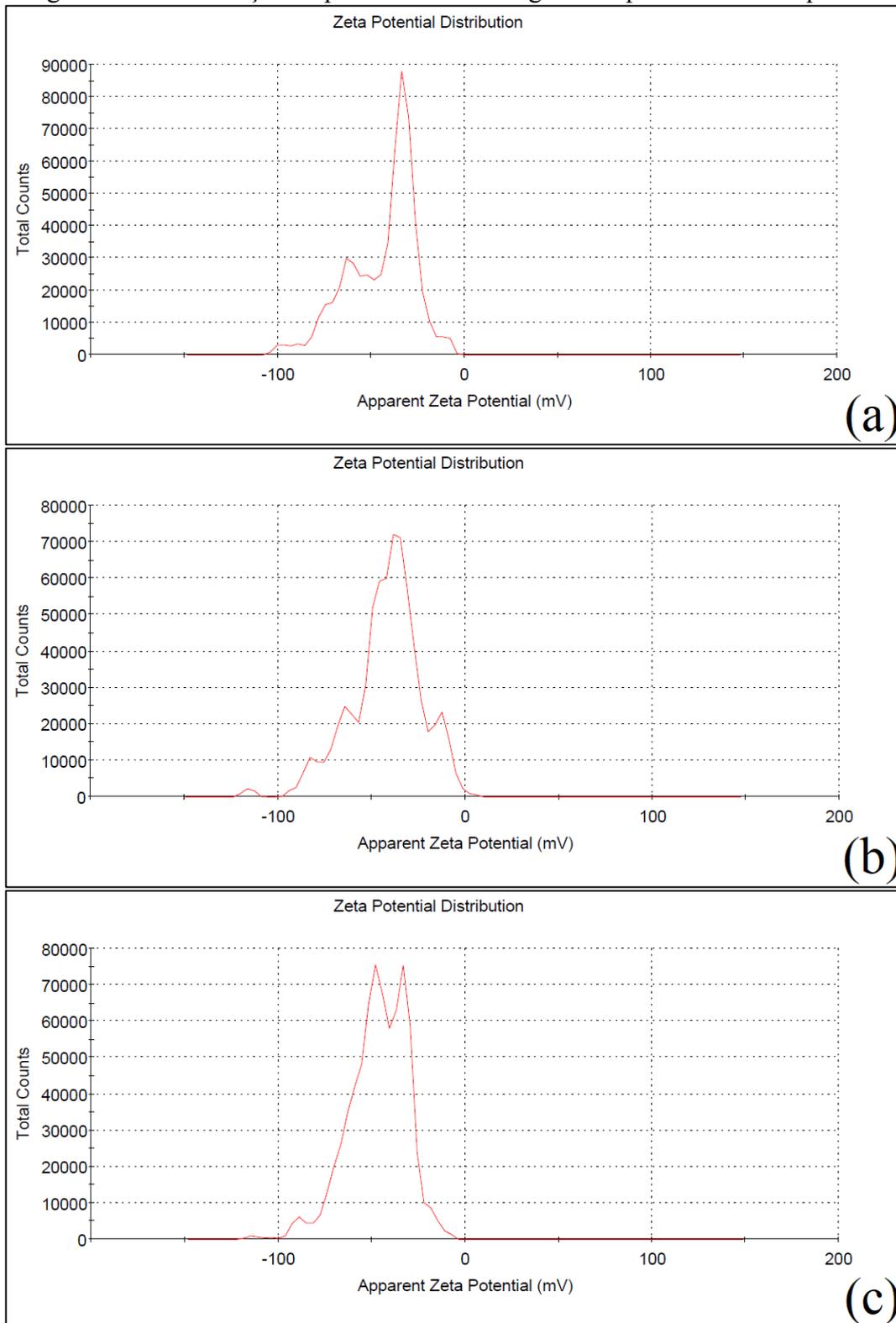
Frequência de Agitação Magnética (F_{AM})	71 \pm 19
Volume de Semente (V_S)	-64 \pm 19
Volume de $AgNO_3$ (V_{AgNO_3})	13 \pm 19
$F_{AM} \times V_S$	12 \pm 19
$F_{AM} \times V_{AgNO_3}$	4 \pm 19
$V_S \times V_{AgNO_3}$	17 \pm 19

Fonte: Próprio autor.

Um efeito é significativo se temos evidências o suficiente para dizer que o valor o qual ele estima é diferente de zero. Neste caso, o efeito estimado deve ser consideravelmente maior que o seu erro padrão, caso contrário a imprecisão da estimativa não nos permite garantir que ela está estimando algo diferente de zero (MONTGOMERY, 2009). Assim, baseado na teoria estatística de planejamento de experimentos, foi considerado como significativos os efeitos que são 2.3 vezes maior que o erro padrão. O erro padrão calculado foi \pm 19, ou seja os efeitos significativos neste primeiro ensaio quimiométrico são a frequência de agitação magnética e o volume de semente. No entanto, nenhuma interação entre as variáveis foi significativa neste ensaio.

O potencial zeta foi analisado para a amostra 2 e realizada em triplicata (como mostrado na Figura 13). A primeira triplicata, Figura 13 (a), apresentou um potencial zeta de $\zeta = -43,8 \pm 18$ mV e uma condutividade de 0,0138 mS/cm. Nesta análise foram observados 3 picos, o primeiro em $\zeta = -32,9$ mV (área = 61,6%), o segundo em $\zeta = -65,9$ mV (área = 24,2%) e o terceiro em $\zeta = -52,1$ mV (área = 11,3%). A segunda triplicata, Figura 13 (b), apresentou um potencial zeta de $\zeta = -42,0 \pm 19$ mV e uma condutividade de 0,0235 mS/cm. Nesta análise foram observados 3 picos, o primeiro em $\zeta = -38,7$ mV (área = 67,6%), o segundo em $\zeta = -64,6$ mV (área de 14,7%) e o terceiro em $\zeta = -12,9$ mV (área de 11,6%). A terceira triplicata, Figura 13 (c), apresentou um potencial zeta de $\zeta = -46,7 \pm 16$ mV e condutividade de 0,0201 mS/cm. Para esta última análise foram observados 3 picos, o primeiro em $\zeta = -53,6$ mV (área = 58,8%), o segundo em $\zeta = -32,6$ mV (área = 38,7%) e o terceiro em $\zeta = -89,3$ mV (área = 2,1%). De acordo com RODRIGUES *et al.* (2020), a medição do potencial Zeta das partículas de AgNPs mostrou como esperado, valores muito negativos indicando uma grande estabilidade do sistema coloidal, e que as cadeias PSSS estão revestindo as partículas.

Figura 13 – Distribuição do potencial zeta de AgNPs do primeiro ensaio quimiométrico.

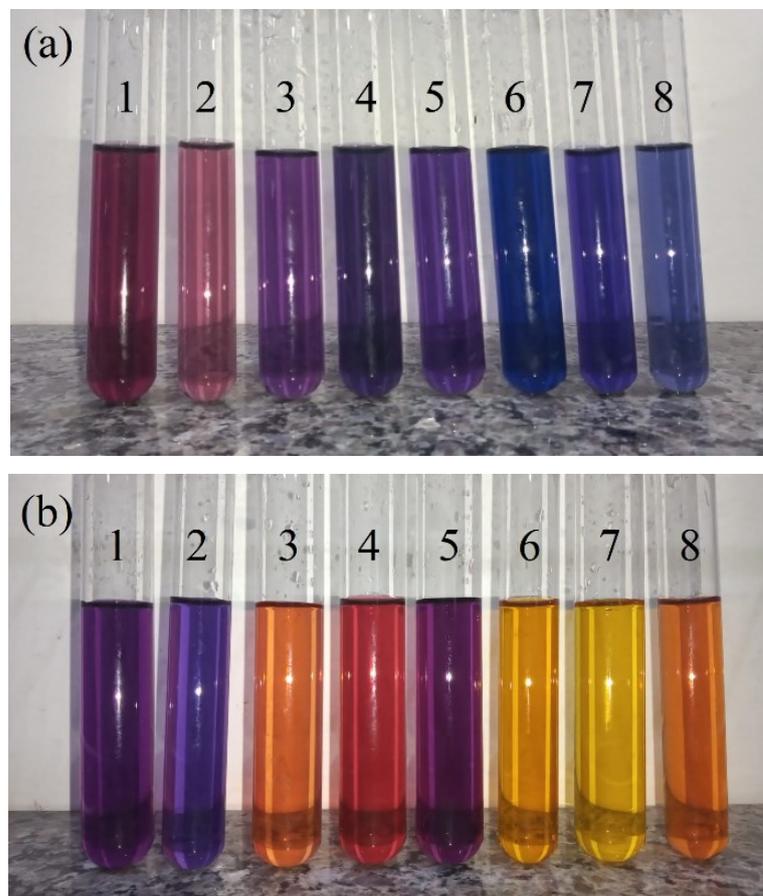


Fonte: Próprio autor.

5.2 SEGUNDO ENSAIO QUIMIOMÉTRICO DE PREPARAÇÃO DE AgNPs

Este ensaio foi realizado em duplicata, e serão expostos aqui os resultados de cada uma dessas réplicas do segundo ensaio quimiométrico de síntese de AgNPs. A Figura 14 mostra 2 fotografias das 2 réplicas dos experimentos, em cada uma das réplicas 8 amostras foram obtidas no segundo ensaio quimiométrico. Observa-se novamente a variação das cores das amostras.

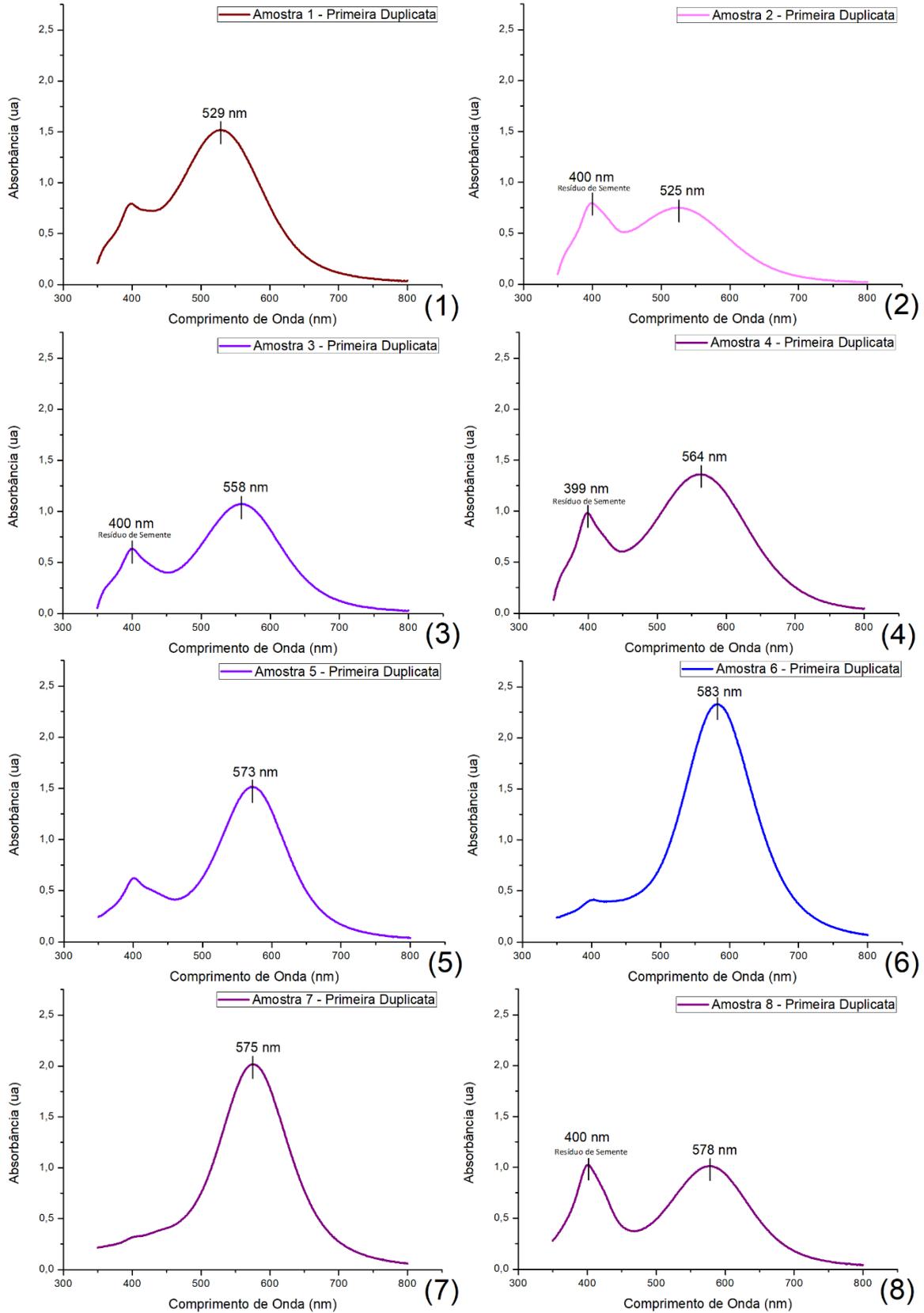
Figura 14 – (a) Amostras de AgNPs produzidas na primeira réplica; (b) amostras de AgNPs produzidas na segunda réplica; (c) amostras produzidas na terceira réplica; do primeiro ensaio quimiométrico da síntese de AgNPs, enumeradas de 1 à 8.



Fonte: Próprio autor.

A partir da preparação de cada uma das amostras foi realizada a caracterização óptica por espectrofotometria de absorção UV-Vis para se obter a banda de plásmon de cada uma delas. A Figura 15 observam-se os espectros de absorção das 8 amostras obtidas na primeira réplica deste segundo ensaio quimiométrico.

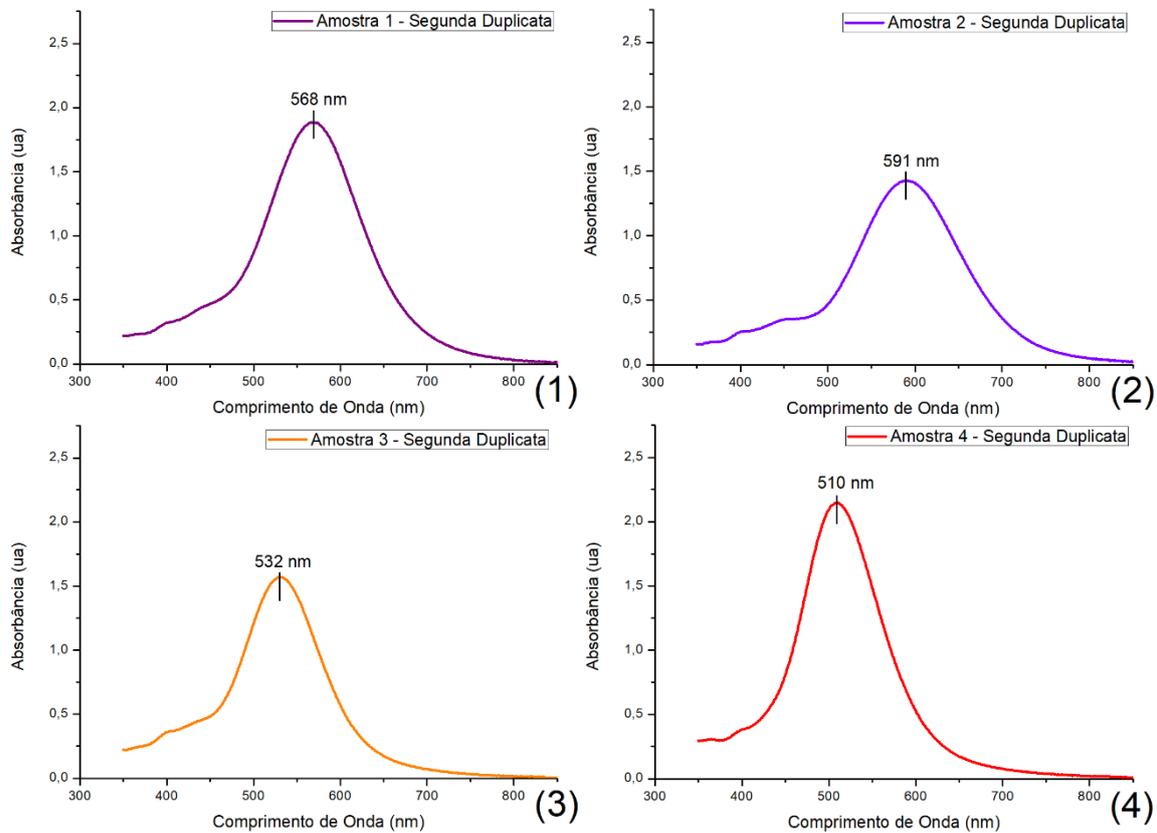
Figura 15 - Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por números de (1) até (8) da primeira réplica deste segundo experimento.

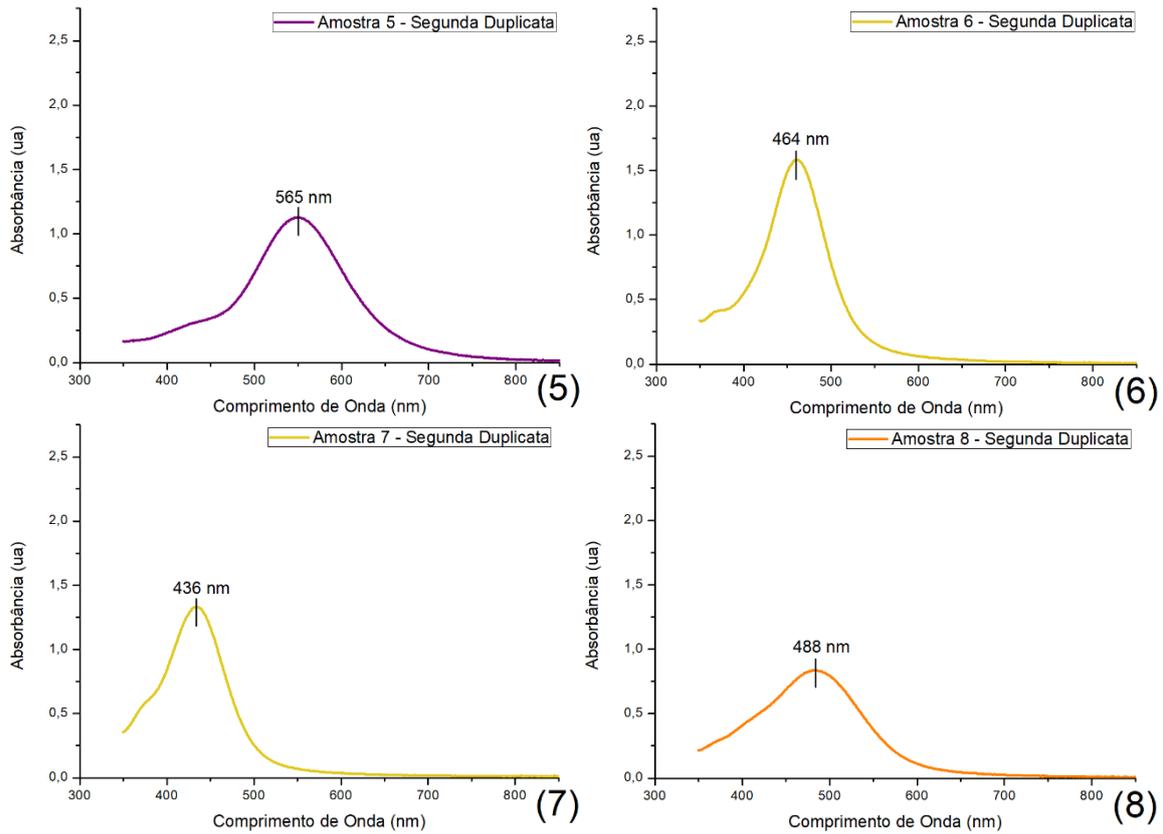


Fonte: Próprio autor.

Como exposto na Figura 15, as amostras 2 e 8 apresentaram um máximo de absorção no comprimento de onda correspondente ao resíduo de semente na suspensão com intensidade maior que a banda de AgNPs, e apenas a amostra 6 atingiu a cor azul tendo sua banda de plásmon com máximo acima de 580 nm. A Figura 16 representa as 8 amostras preparadas na 2ª réplica deste ensaio quimiométrico, nenhuma das 8 amostras apresentou máximo de absorção equivalente a resíduo de semente o que demonstra uma melhora no rendimento da preparação, e apenas a amostra 2 apresentou seu máximo da banda de plásmon acima de 580 nm.

Figura 16 - Espectros de absorção das 8 amostras, identificadas respectivamente por números de (1) até (8) da segunda réplica deste segundo experimento.





Fonte: Próprio autor.

Os níveis denominados como (+) ou (-), foram alterados neste segundo ensaio quimiométrico conforme apresentado na Tabela 2, e as variáveis abordadas na síntese de AgNPs permaneceram as mesmas sendo, (i) a frequência em rpm da agitação magnética utilizada no processo de crescimento das sementes, (ii) o volume em mL de sementes que foi adicionada ao sistema para iniciar seu processo de crescimento e (iii) o volume (mL) de AgNO_3 que em meio ao ácido cítrico promove o crescimento das sementes esféricas, atuando também em conjunto com o polímero PSSS que ordena para o formato prismático das nanopartículas de prata. A resposta (λ) é dada pela média \pm desvio padrão dos valores máximos de absorbância de plásmon obtidos em cada uma das réplicas com os resultados demonstrados na Tabela 5.

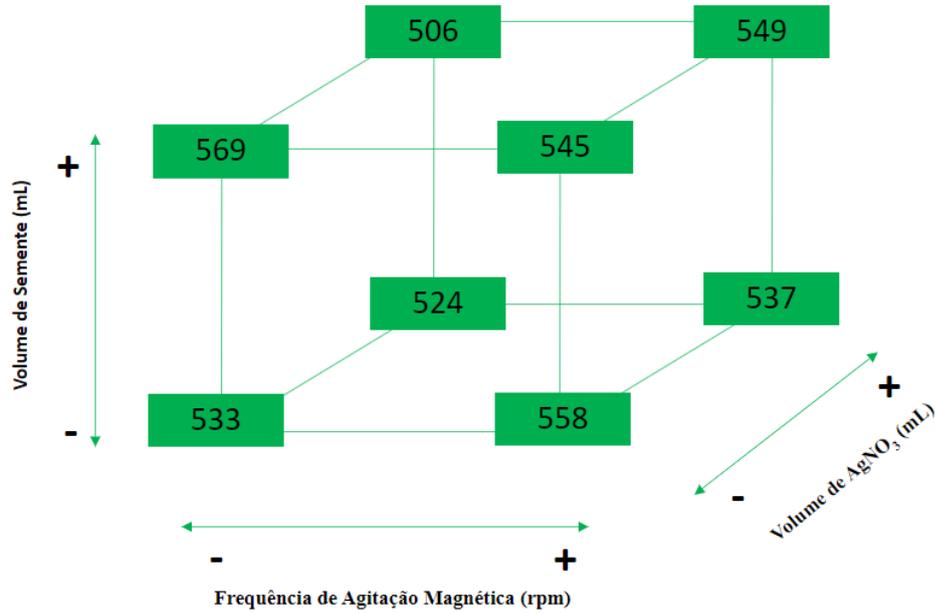
Tabela 5 – Dados do segundo ensaio quimiométrico.

Agitação Magnética (rpm)		Volume de Semente (mL)		Volume de AgNO ₃		
(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
500	300	3	2	25	15	
Variáveis Codificadas						
Agitação Magnética		Volume de Semente		Volume de AgNO ₃		Resposta (λ)
+		+		+		549 ± 20 nm
+		-		-		558 ± 33 nm
+		+		-		545 ± 13 nm
+		-		+		537 ± 27 nm
-		+		-		569 ± 4 nm
-		-		+		524 ± 50 nm
-		+		+		506 ± 70 nm
-		-		-		533 ± 44 nm
Níveis das Variáveis						
Agitação Magnética		Volume de Semente		Volume de AgNO ₃		Resposta (λ)
500		3		25		549 ± 20 nm
500		2		15		558 ± 33 nm
500		3		15		545 ± 13 nm
500		2		25		537 ± 27 nm
300		3		15		569 ± 4 nm
300		2		25		524 ± 50 nm
300		3		25		506 ± 70 nm
300		2		15		533 ± 44 nm

Fonte: Próprio autor.

A Figura 17 traz a ilustração de um cubo de delineamento obtido a partir dos dados da Tabela 5, o cubo fatorial foi elaborado conforme exposto no primeiro ensaio quimiométrico. A partir das médias dos máximos de absorvância das amostras é calculado os efeitos conforme a Tabela 6.

Figura 17 – Cubo de delineamento fatorial do segundo ensaio quimiométrico.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 – (a) Efeitos da frequência de agitação magnética; (b) Efeitos do volume de semente; (c) Efeitos do volume de AgNO₃; ambos os efeitos do segundo ensaio quimiométrico.

Volume da Semente (mL)	Volume de AgNO ₃	Resposta (λ) F _{AM} (+) 500 rpm	Resposta (λ) F _{AM} (-) 300 rpm	Efeito F _{AM} (+) - F _{AM} (-)
3	25	549 nm	506 nm	43
2	25	537 nm	524 nm	13
3	15	545 nm	569 nm	-24
2	15	558 nm	533 nm	25
Efeito Principal da Frequência de Agitação Magnética (Fam) (valor médio dos efeitos)				14

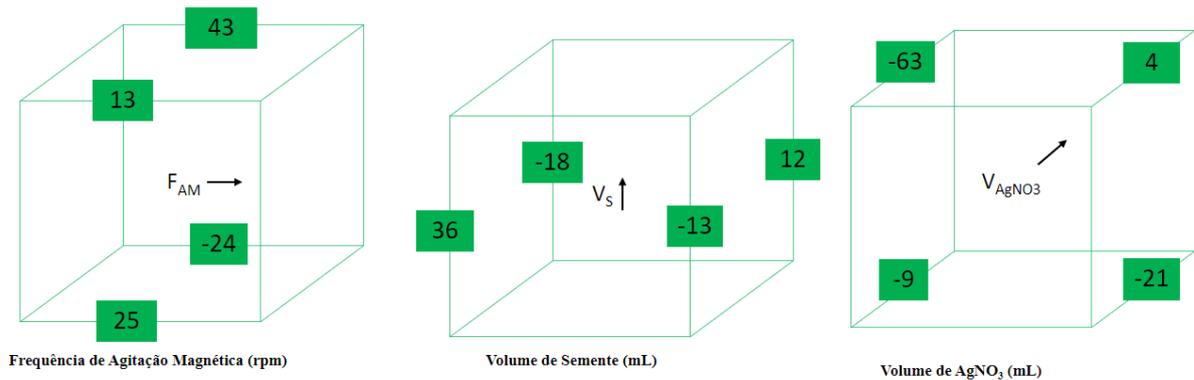
Agitação Magnética (rpm)	Volume de AgNO ₃	Resposta (λ) Vs (+) 3 mL	Resposta (λ) Vs (-) 2 mL	Efeito Vs (+) - Vs (-)
500	25	549 nm	537 nm	12
500	15	545 nm	558 nm	-13
300	25	506 nm	524 nm	-18
300	15	569 nm	533 nm	36
Efeito Principal do Volume da Semente (Vs) (valor médio dos efeitos)				17

Agitação Magnética (rpm)	Volume da Semente (mL)	Resposta (λ) V _{AgNO₃} (+) 25 mL	Resposta (λ) V _{AgNO₃} (-) 15 mL	Efeito V _{AgNO₃} (+) - V _{AgNO₃} (-)
500	3	549 nm	545 nm	4
500	2	537 nm	558 nm	-21
300	3	506 nm	569 nm	-63
300	2	524 nm	533 nm	-9
Efeito Principal da Volume de AgNO₃ (V_{AgNO₃}) (média dos efeitos)				-89

Fonte: Próprio autor.

Os efeitos foram calculados conforme descrito no primeiro ensaio quimiométrico. Foi obtidos os efeitos principais através da média dos efeitos de cada variável, 14 ± 21 para a frequência de agitação magnética em rpm, 17 ± 21 para o volume de semente em mL e -89 ± 21 para o volume de AgNO_3 . Novamente é utilizado o cubo fatorial para ilustrar os efeitos de cada variável, na Figura 18 as arestas do cubo representam a diferença entre as respostas para cada uma das 4 combinações das variáveis fixadas, onde a seta no centro do cubo indica a direção em que a diferença foi calculada.

Figura 18 – Cubo fatorial dos efeitos das variáveis do segundo ensaio quimiométrico.



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 18 nota-se que os efeitos interagem entre as variáveis, para obter o efeito dessa interação é calculado, a cada duas variáveis, a média das 4 respostas quando os níveis são iguais ($++$ e $--$) e a média das 4 respostas quando os níveis são opostos ($+ -$ e $- +$). Após é feito a diferença da média de níveis iguais menos a média de níveis diferentes, conforme a Tabela 7.

Tabela 7 – Efeitos de cada variável e Interações entre os efeitos das variáveis \pm o erro padrão obtido através do desvio padrão das respostas (λ).

Fatores, Interações e Efeitos \pm Erro Padrão

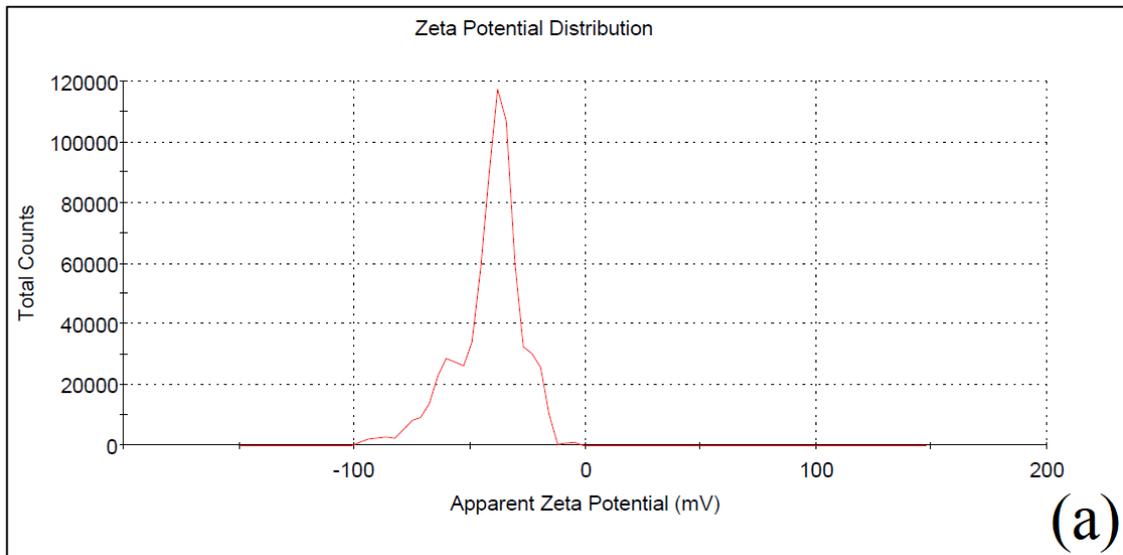
Frequência de Agitação Magnética (F_{AM})	14 ± 21
Volume de Semente (V_s)	17 ± 21
Volume de AgNO_3 (V_{AgNO_3})	-89 ± 21
$F_{AM} \times V_s$	-5 ± 21
$F_{AM} \times V_{\text{AgNO}_3}$	14 ± 21
$V_s \times V_{\text{AgNO}_3}$	-7 ± 21

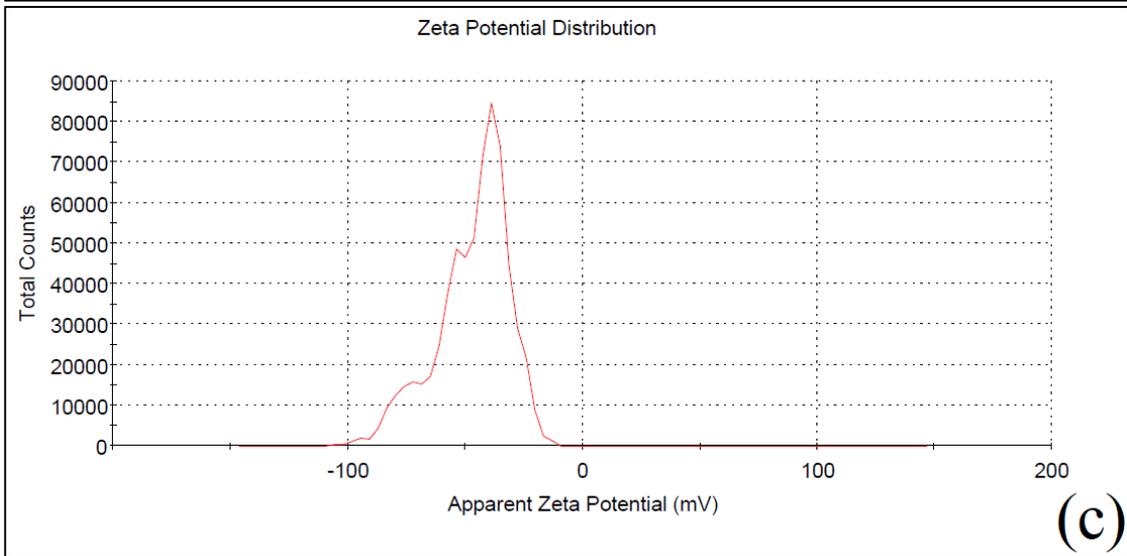
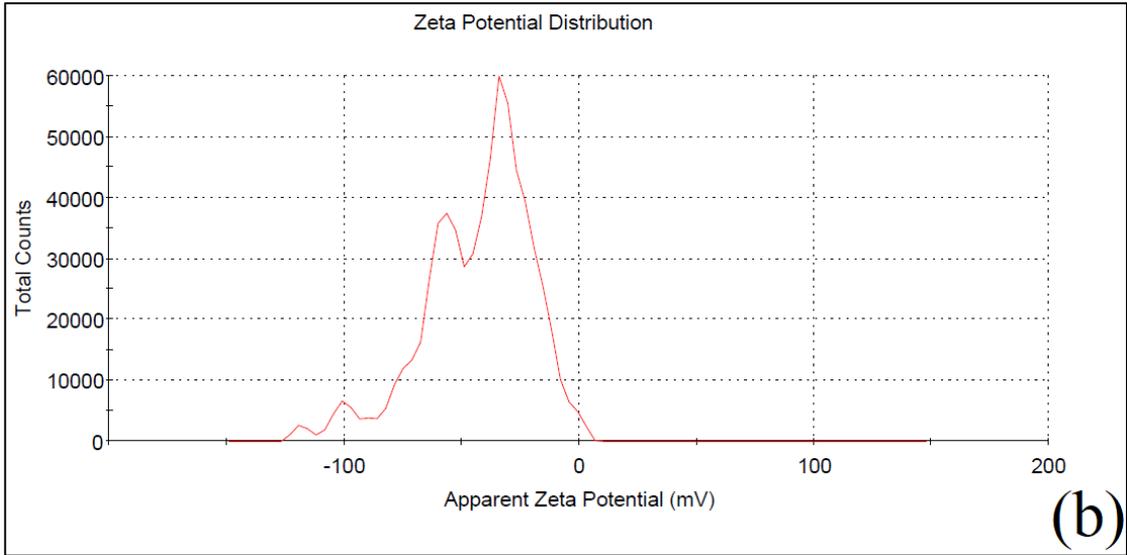
Fonte: Próprio autor.

O erro padrão calculado foi ± 21 , ou seja, o efeito significativo neste segundo ensaio quimiométrico é apenas o volume de AgNO_3 que não foi significativo no primeiro ensaio. Mais uma vez nenhuma interação entre as variáveis foi significativa neste ensaio.

Foi analisado o potencial zeta em uma das amostras deste estudo (amostra 6) realizado em triplicata, a Figura 19 mostra os gráficos obtidos. A primeira triplicata, Figura 19 (a), apresentou um potencial zeta $\zeta = -41,7 \pm 14$ mV e condutividade de 0,0211 mS/cm. Para esta análise foram observados 3 picos, o primeiro em $\zeta = -36,6$ mV (área = 79,0%), o segundo em $\zeta = -62,1$ mV (área de 19,3%) e o terceiro em $\zeta = -89,9$ mV (área de 1,5%). A segunda triplicata, Figura 19 (b), apresentou um potencial zeta $\zeta = -43,0 \pm 23$ mV e condutividade de 0,0209 mS/cm. Nesta análise foram observados 3 picos, o primeiro em $\zeta = -29,8$ mV (área de 62,5%), o segundo em $\zeta = -60,9$ mV (área = 31,6%) e o terceiro em $\zeta = -100$ mV (área de 3,3%). A terceira triplicata, Figura 19 (c) apresentou um potencial zeta $\zeta = -46,7 \pm 15$ mV e condutividade de 0,0211 mS/cm. Nesta análise foram observados 3 picos, o primeiro em $\zeta = -38,0$ mV (área = 61,8%), o segundo em $\zeta = -56,6$ mV (área de 26,9%) e o terceiro em $\zeta = -76,1$ mV (área = 10,5%). Mais uma vez de acordo com RODRIGUES *et al.* (2020), a medição do potencial Zeta das partículas de AgNPs mostrou como esperado, valores muito negativos indicando uma grande estabilidade do sistema coloidal, e que as cadeias PSSS estão revestindo as partículas.

Figura 19 – Distribuição do potencial zeta de AgNPs do primeiro ensaio quimiométrico.



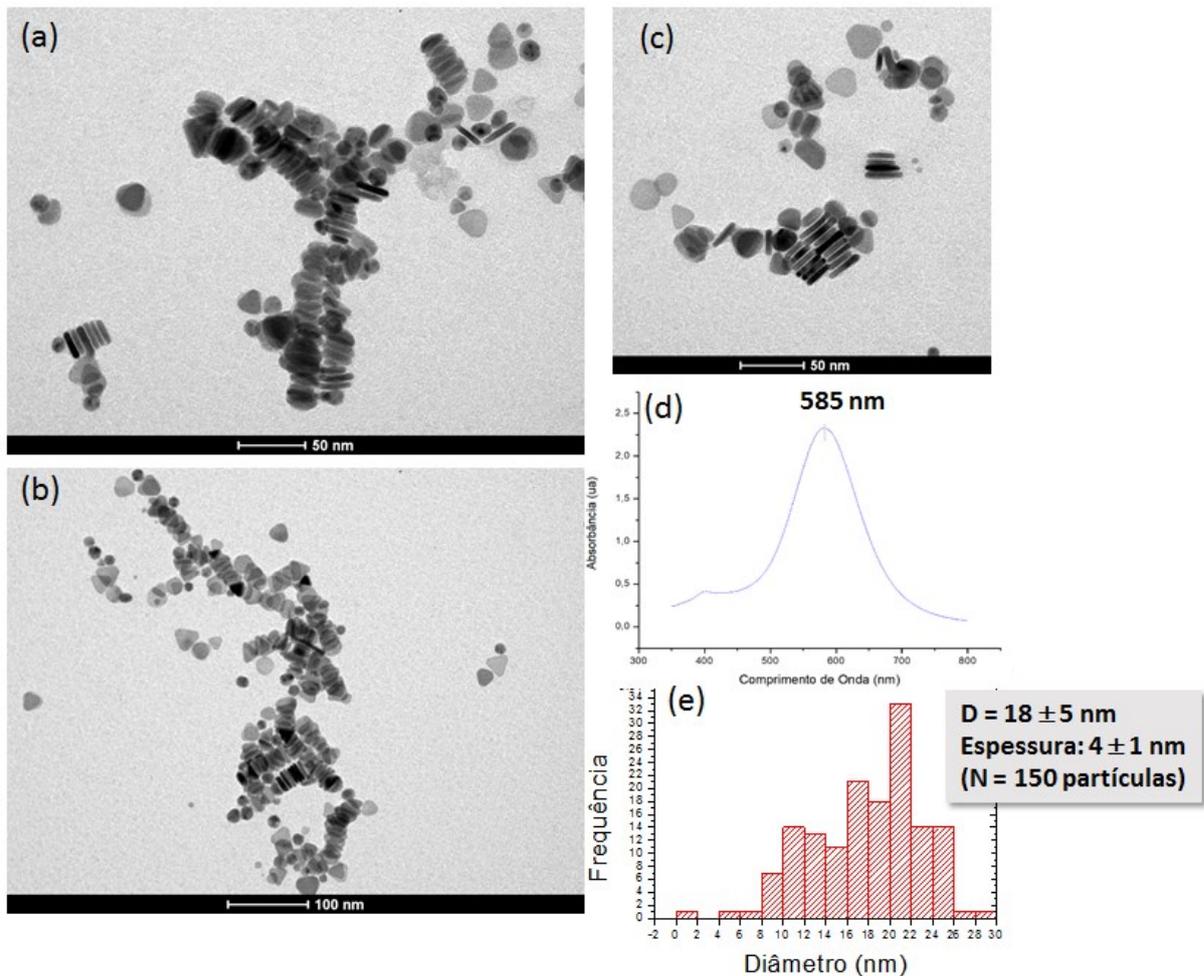


Fonte: Próprio autor.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRASMISSÃO

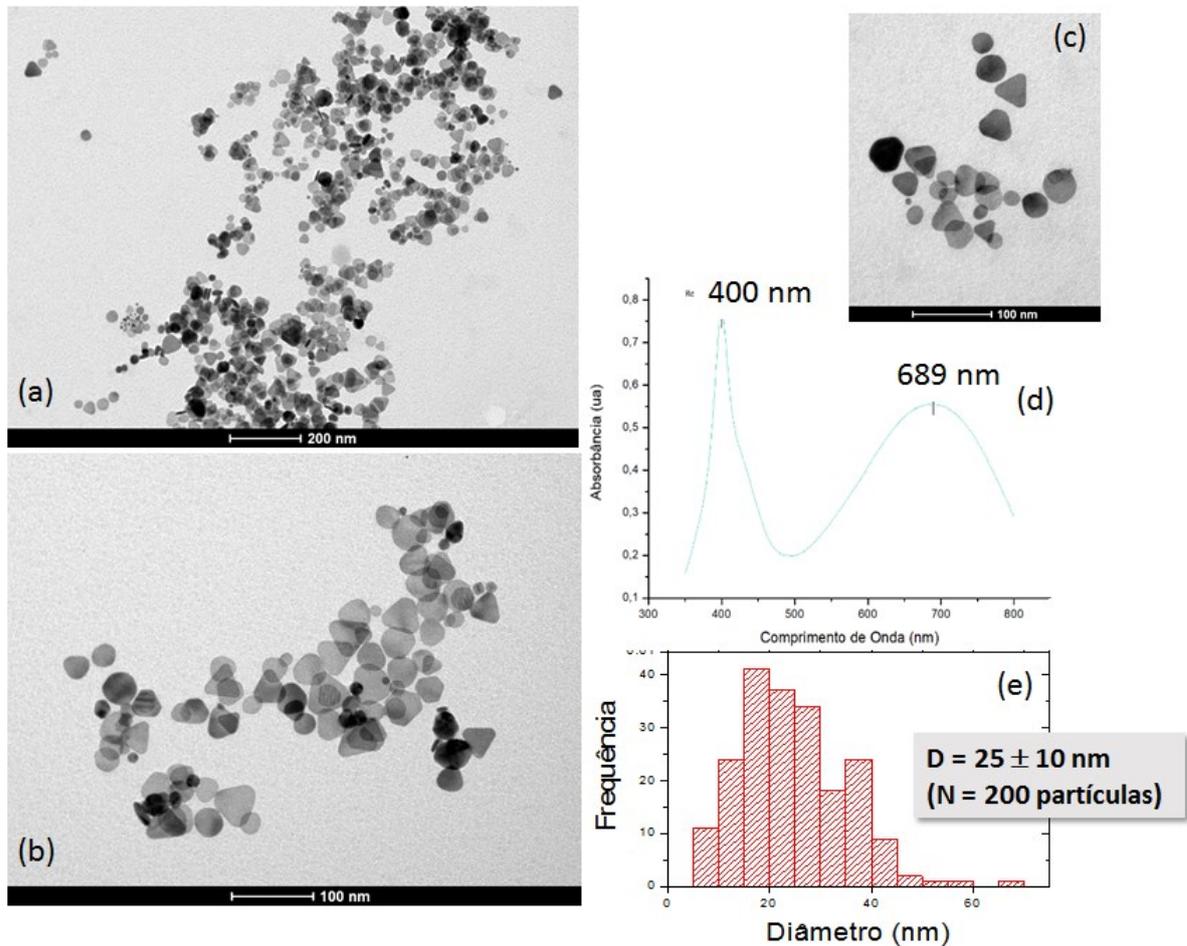
Imagens de microscopia de duas amostras (amostra 2 do primeiro ensaio e 6 do segundo ensaio quimiométrico) estão apresentadas nas Figura 20 e Figura 21. YARAKI *et al.* (2020) fez a microscopia eletrônica de transmissão em três amostras de AgNPs que mostraram uma distribuição uniforme de tamanhos de partículas com um diâmetro médio de 14 ± 3 (14 nm AgNPs), 40 ± 9 nm (40 nm AgNPs) e 80 ± 13 nm (80 nm AgNPs), respectivamente, alcançando valores do diâmetro médio de AgNPs maiores do que no presente estudo, conforme discutido a seguir.

Figura 20 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra 6 da primeira duplicata do segundo ensaio quimiométrico ($\lambda_{\text{máx}}$ 585 nm). (a,b,c) Imagens de campo claro das partículas de AgNPs. (d) Espectro de absorção correspondente da amostra. Na figura está também o histograma realizado.



Fonte: Próprio autor.

Figura 21 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra 2 da primeira triplicata do segundo ensaio quimiométrico ($\lambda_{\text{máx}}$ 400 e 689 nm). (a,b,c) Imagens de campo claro de AgNPs; (d) Perfil espectral de absorção das partículas e (e) histograma de distribuição do tamanho com diâmetro médio.



Fonte: Próprio autor

Observam-se em todas as imagens partículas de diferentes morfologias (triangulares, semiprismáticas e circulares) porém observa-se que se tratam de partículas de espessura fina. De fato, nas amostras da Figura 20 conseguiu-se observar variadas partículas que secaram mantendo-se associadas umas às outras em sequência possibilitando a estimativa da espessura. Nestas a espessura média ficou em $4 \pm 1 \text{ nm}$. Na distribuição das amostras apresentadas na Fig. 20 observa-se uma população maior para partículas maiores, comparadas às sementes. Em contraste, na Figura 21 observam-se quase que duas populações, condizendo com o perfil espectral, onde se observa a presença de uma expressiva população de sementes, além das outras partículas crescidas.

6 CONCLUSÃO

O estudo quimiométrico realizado mostrou evidenciou uma falta de controle cinético da preparação de AgNPs pelo método de crescimento por sementes. Foram analisadas as variáveis taxa de agitação, volume de semente utilizado para o crescimento e volume de AgNO_3 ofertado no crescimento gota a gota. Das 40 amostras de AgNPs preparadas nos dois ensaios quimiométricos, 10 amostras apresentaram um comprimento de onda máximo de absorção característico de resíduo de semente com intensidade maior que o pico que representa as AgNPs crescidas, indicando um baixo rendimento no crescimento das nanopartículas de prata, bem como destas amostras apenas 9 apresentaram um máximo de absorção acima de 580 nm em sua banda plasmônica, que é de interesse ao grupo de pesquisa NanoBio/UFPE para posterior conjugação com o azul de metileno para aplicação em terapia fotodinâmica. São necessários mais estudos controlando outras possíveis variáveis que interferem na cinética desta preparação, como, temperatura, exposição de luz e taxa de gotejamento na oferta de nitrato de prata. Pois é possível observar que outros fatores podem também ser significativos para esta metodologia de preparação de AgNPs.

REFERÊNCIAS

- AHERNE, D.; LEDWITH, D. M.; GARA, M.; KELLY, J. M. Optical Properties and Growth Aspects of Silver Nanoprisms Produced by a Highly Reproducible and Rapid Synthesis at Room Temperature. *Advanced Functional Materials*. 18, 2005-2016, 2008.
- ALQAHTANI, F.S.; ALSHEBLY, M.M.; GOVINDARAJAN, M. Green and facile biosynthesis of silver nanocomposites using the aqueous extract of *Rubus ellipticus* leaves: toxicity and oviposition deterrent activity against Zika virus, malaria and filariasis mosquito vector. *J. Asia Pac. Entomol.*, n. 20, p. 157-164, 2017.
- BRERETON, R. G. *Applied Chemometrics for Scientists*. Chichester, Inglaterra: Wiley, 2007.
- BRONGERSMA, M. L.; SHALAEV, V. M. The Case for Plasmonics. *Science Magazine*, v. 328, ed. 5977, p. 440-441, 2010.
- CARUSO, Glaucia Rigotto. Efeito da inativação fotodinâmica em fungos utilizando fotossensibilizadores fenotiazínicos associados à nanopartículas de prata. Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2020.
- CORRÊA, N. F. Estudo de propriedades ópticas de colóides de nanopartículas de prata dispersa em BMI.BF4. 2017. 60 f. Tese (Doutorado em Materiais) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL.
- DA SILVA, A. G.; M. RODRIGUES, T. S.; WANG, J. The Fault in Their Shapes: Investigating the Surface-Plasmon-Resonance-Mediated Catalytic Activities of Silver Quasi-Spheres, Cubes, Triangular Prisms, and Wires. *Langmuir*. v. 31, n. 37 p. 10272-10278, 2015.
- EUTIS, S.; EL-SAYED, M. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*. Vol. 35. p. 209-217. 2005.
- FALCÃO-FILHO, E. L.; DE ARAÚJO, C. B.; RODRIGUES JR, J. J. High-order nonlinearities of aqueous colloids containing silver nanoparticles. *JOSAB*, v. 24, n. 12, p. 2948-2956, 2007.
- FDA *et al.* Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials - Guidance for Industry. [s. l.], 2017. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>>. Acesso em: 28 de março de 2022.

FERREIRA, Márcia Miguel Castro. *Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações*. Campinas, SP. Editora da Unicamp, 2015.

FIRDHOUSE, M. J.; LALITHA, P. Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications. *J. Nanotechnol.* n.10, p. 18, 2015.

GOGOS, A.; KNAUER, K.; BUCHELI, T.D. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *J. Agric. Food Chem.*, n. 60, p.9781-9792, 2012.

HOU, W.; CRONIN, S. B. A Review of Surface Plasmon Resonance-Enhanced Photocatalysis. *Adv Funct Mater.* v. 23, n. 13, p.1612-1619, 2013.

HUSSEIN, Siddiq. Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. *Nanoscale Res.* n. 9, p. 229, 2014.

INTERNATIONAL CHEMOMETRICS SOCIETY (ICS). <<http://www.namics.nysaes.cornell.edu/>>. Acesso em: 13 abril 2022.

IRAVANI, S.; KORBEKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V.; ZOLFAGHARI, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in pharmaceutical sciences*, v. 9, n. 6, p. 385-406, 2014.

IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>. Acesso em: 28 de março de 2022.

JESUS, V. P. S.; RANIERO, G. M.; BHATTACHARJEE, T. T.; CAETANO JÚNIOR, P. C.; CASTILHO, M. L. Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. v. 23, p. 212-217, 2018.

KALIMUTHU, K.; PANNEERSELVAM, C.; CHOU, C.; LI-CHUN, T.; MURUGAN, K.; KUN-HSIEN, T.; ALARFAJ, A.A.; HIGUCHI, A.; CANALE, A.; JIANG-SHIU, H.; BENELLI, G. Control of dengue and Zika virus vector *Aedes aegypti* using the predatory

copepod *Megacyclops formosanus*: synergy with *Hedychium coronarium*-synthesized silver nanoparticles and related histological changes in targeted mosquitos. *Process. Saf. Environ. Prot.*, n.109, p. 82-96, 2017.

MENEGOTTO, T. Estudo das Ressonâncias de Plasmon em filmes silicatos com nanopartículas de Ag interagentes. 2011. 127 f. Tese (Doutorado em Microeletônica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MIRANDA, R. R.; SAMPAIO, I.; ZUCOLOTTI, V. Exploring silver nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 210, 2022.

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. 7 ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2009.

NAM, G.; PURUSHOTHAMAN, B.; RANGASAMY, S.; SONG, J. M. Investigating the versatility of multifunctional silver nanoparticles: preparation and inspection of their potential as wound treatment agents. *Int. Nano*. n. 6, p. 51-63, 2016.

NETTO-FERREIRA, J.C. Reações Catalíticas Empregando o Efeito Plasmônico de Nanopartículas Metálicas Suportadas. *Rev. Virtual Quim.*, v.7, n. 1, p.165-217, 2015.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.

RODRIGUES, C. H.; SILVA, M. L. R.; FONTES, A.; MACÊDO, D. P. C.; SANTOS, B. S. Silver nanoparticles@methylene blue conjugates as a strategy in photodynamic inactivation against *candida albicans* isolated from balanitis *in vitro*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2020.

SHAKEEL, A.; MUDASIR, A.; BABU, L.S.; SAIGA, I. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *J. Adv. Res.*, n. 7, p.17-28, 2016.

SHANKAR, S.S.; RAI, A.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Sastry. Controlling the optical properties of lemongrass extract synthesized gold nanotriangles and potential application in infrared absorbing optical coatings. *Chem. Mater.*, n. 17, p. 566-572, 2005.

YARAKI, M. T.; PAN, Y.; HU, F.; LIU, B.; TAN, Y. N. Nanosilver-enhanced AIE photosensitizer for simultaneous bioimaging and photodynamic therapy. *Mater. Chem. Front.*, n. 4, p. 3074-3085, 2020.