

Universidade Estadual Paulista – UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – POSMAT

**“Filmes de borracha natural com nanopartículas de prata e pontos
quânticos”**

Caroline Silva Danna

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

Presidente Prudente

2016



Caroline Silva Danna

**“Filmes de borracha natural com nanopartículas de prata e pontos
quânticos”**

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração de Materiais Poliméricos, Híbridos e Nano-Estruturados, sob orientação do Prof. Dr. Aldo Eloizo Job.

Presidente Prudente

2016

Danna, Caroline Silva.

Filme de borracha borracha natural com nanopartículas de prata e pontos quânticos / Caroline Silva Danna, 2016

110 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Eloizo Job

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2016

1. Borracha Natural. 2. Nanopartículas de Prata. 3. Pontos Quânticos. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE CAROLINE SILVA DANNA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

Aos 29 dias do mês de fevereiro do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNESP/Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB - Orientador(a) do(a) Departamento de Física / FCT/UNESP - Câmpus de Presidente Prudente, Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO BIANCHI do(a) Instituto de Ciências Exatas e Biológicas/ Departamento de Física / Universidade Federal de Ouro Preto, Profª. Drª. DALITA GOMES SILVA MORAES CAVALCANTE do(a) FCT - UNESP de Presidente Prudente / Departamento de Física, Química e Biologia, Prof. Dr. ANTONIO HERNANDES CHAVES NETO do(a) Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Prof. Dr. FELIPE SILVA BELLUCCI do(a) Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - SETEC / Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de CAROLINE SILVA DANNA, intitulada **Filmes de borracha natural com nanopartículas de prata e pontos quânticos**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ALDO ELOIZO JOB

Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO BIANCHI

Profª. Drª. DALITA GOMES SILVA MORAES CAVALCANTE

Prof. Dr. ANTONIO HERNANDES CHAVES NETO

Prof. Dr. FELIPE SILVA BELLUCCI

Dedico este trabalho à minha mãe,
Clzei Catarina Silva, que mesmo
estando longe geograficamente,
sei que sempre está ao meu lado
para tudo e para sempre.

Se o caminho era este, não sei! Sei que estou bem longe de onde parti e sei bem como cheguei até aqui. O 'estranho' é que a chegada não se parece com o que imaginei. Será que passou de forma despercebida? Ou será que de tanto caminhar sonhando alonguei a medida? Mas sei que é tempo de registrar a batalha vencida. E de fato, depois de tanto e tudo, sou a mesma menina que tropeça ao caminhar apressada, olhando o horizonte que teima em se afastar. Mesmo assim, prossigo no caminho. Agora novo caminho. Vou descobrindo que há distâncias maiores e que só existe fim para quem para de sonhar!

AGRADECIMENTOS

- *Agradeço a minha mãe, Cleci, que amo muito e que sempre me apoiou em tudo mas que também me puxou a orelha nas horas mais necessárias, e essas horas ela sabia sem nem mesmo eu falar. Acho que é coisa de Mãe!*
- *Agradeço imensamente ao Prof. Aldo que me orientou, me aconselhou e me mostrou o caminho do amadurecimento como profissional e pessoal; agradeço por toda a confiança que depositou em mim, mesmo quando eu não tinha certeza que podia;*
- *Agradeço aos integrantes da banca, tanto da qualificação quanto da defesa, que são Dr. Aldo E. Job (orientador), Prof. Dr. Rodrigo F. Bianchi, Dr. Dalita G. S. M. Cavalcante, Prof. Dr. Antonio H. C. Neto e Dr. Felipe S. Bellucci, assim como os suplentes o Prof. Dr. Deuber L. S. Agostini e o Prof. Dr. Elton A. P.dos Reis.*
- *Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo F. Aroca que me recebeu durante o período de estadia (doutorado sanduíche) na University of Windsor no Canadá;*
- *Agradeço, de forma especial, ao Dr. Igor O. Osorio Román que durante a estadia no Canadá me ajudou com as necessidades diárias no laboratório além de colaborar com a realização de um dos capítulos desse trabalho abrindo para mim e para o grupo LTBA uma nova possibilidade de linha de pesquisa.*
- *Agradeço a Glenda Gonçalves de Souza e extendo o agradecimento a todos que me auxiliaram na realização das técnicas de caracterização apresentadas nesse trabalho.*
- *Agradeço a todos da Família Silva (minha família), com quem posso sempre contar e sei que são meu porto seguro;*
- *Agradeço em especial as minhas primas, Lizandra (Mala) e Luciana (Lolo), pela amizade de sempre e por me aguentarem todo o tempo, amo vocês!*

- *Agradeço minhas amigas (os) e companheiras (os) de vida e/ou república Edilene, Talita (Bracho), Marcos (Tone/Vizinho), Maria Luisa (Malu), Nathália, Gabriele (Gabi), Lucas (Lulu), saibam que vocês fazem meus dias mais leves.*

- *Agradeço as companheiras de laboratório e vida Leandra que sempre me apoiou, Dalita que me ensinou tanto sobre assuntos diversos, a Andressa que é a melhor I.C. que eu conheço, e a todos os outros com quem convivo diariamente no Morumbi e também aos que já passaram por lá desde quanto cheguei, pois a convivência com vocês é essencial para as tomadas de decisão para o futuro;*

- *Agradeço aos bons amigos (muchachada) de Canadá Igor, José Pedro Simão (Juca), Paulo Henrique Cardoso, Laura Carvalho de Barros, Adriana Terra e Paulo Kastrup, que fizeram do meu ano de 2014 um ano mais que especial.*

- *Agradeço a Capes e ao CNPq/Ciência sem Fronteira pelo apoio financeiro.*

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	3
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica.....	6
2.1 <i>Látex e Borracha Natural</i>	<i>6</i>
2.2 <i>Nanopartículas de Prata.....</i>	<i>9</i>
2.3 <i>Biomateriais.....</i>	<i>11</i>
2.4 <i>Pontos Quânticos</i>	<i>14</i>
Capítulo 3 – Objetivos	18
Capítulo 4 - Técnicas de Caracterização	19
4.1 <i>Espectroscopia de Ultravioleta Visível (UV-Vis)</i>	<i>19</i>
4.2 <i>Espectroscopia de Infra Vermelho (FT-IR).....</i>	<i>23</i>
4.2. <i>Espectroscopia de Infravermelho modo ATR</i>	<i>24</i>
4.3 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	<i>25</i>
4.4 <i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....</i>	<i>27</i>
4.5 <i>Testes de Citotoxicidade</i>	<i>28</i>
4.6 <i>Teste de Genotoxicidade</i>	<i>30</i>
Capítulo 5 - Materiais e Métodos	32
5.1 <i>Obtenção do Látex</i>	<i>32</i>
5.2 <i>Membrana de Borracha Natural</i>	<i>33</i>

5.3	<i>Solução de Nitrato de Prata</i>	34
5.4	<i>Processo de Síntese e Obtenção das Membranas de BN/Ag</i>	35
5.5	<i>Espectroscopia de Ultra Violeta Visível</i>	36
5.6	<i>Espectroscopia de Infravermelho modo ATR</i>	36
5.7	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	36
5.8	<i>Microscopia de Força Atômica</i>	36
5.9	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	36
5.10	<i>Linhagem Celular</i>	37
5.11	<i>Teste de Citotoxicidade</i>	37
5.11.1	Obtenção do extrato líquido (EL)	37
5.11.2	Ensaio MTT	38
5.11.3	Contato Direto	40
5.11.4	Adesão Celular	41
5.12	<i>Teste de Genotoxicidade</i>	42
5.13	<i>Espectroscopia de Emissão Óptica acoplado a Plasma Induzido (ICP-OES)</i>	45
5.14	<i>Síntese dos QDs-CdTe</i>	45
5.14.1	Preparação da Solução Tampão de Citrato/Borax	45
5.14.2	Síntese dos Pontos Quânticos de Telureto de Cádmio	46
5.14.3	Concentração dos QDs-CdTe	47
5.15	<i>Preparação dos Filmes de Borracha Natural e QDs-CdTe</i>	47

Capítulo 6 - Resultados e Discussões.....	49
6.1 <i>Caracterização das membranas de BN/Ag.....</i>	49
6.1.1 Espectroscopia de Ultravioleta Visível (UV-Vis).....	49
6.1.2 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) modo ATR.....	50
6.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise Elementar por EDS	56
6.1.4 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	59
6.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	60
6.1.6 Análise dos Extratos Líquido.....	62
6.2 <i>Avaliação da Citotoxicidade.....</i>	63
6.2.1 Testes de Citotoxicidade para o Filme de BN Pura	63
6.2.2 Testes de Citotoxicidade para os Filmes de BN pura e BN/Ag	67
6.2.3 Contato Direto.....	68
6.2.4 Adesão Celular.....	71
6.3 <i>Avaliação da Genotoxicidade</i>	73
6.4 <i>Filmes Flexíveis Fluorescentes.....</i>	74
6.4.1 Espectroscopia de Ultravioleta-Visível.....	76
6.4.2 Espectroscopia de Fluorescência	77
6.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise Elementar por Raios –X.....	78

6.4.4 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	80
Capítulo 7 – Conclusão.....	82
Capítulo 8 – Perspectivas Futuras.....	85
Capítulo 9 – Referências Bibliográficas.....	86

Índice de Figuras

Figura 1 - Imagem ilustrativa para comparativo de escala de tamanho. [2].....	3
Figura 2 - Dados do Mercado Internacional de Nanocompósitos entre os anos de 2012 a 2018. Adaptado de [5].	4
Figura 3 - Processo de sangria da seringueira e em destaque o látex coletado.	6
Figura 4 - Modelo proposto para partícula de borracha natural [22].	7
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química do poli-cis-isopreno [11].....	8
Figura 6 – Imagens de um sistema indutor de neoformação tecidual utilizando a borracha natural e seguimento clínico de um paciente que fez uso do material [32]	9
Figura 7 - Esquema representativo de mecanismos de ação antimicrobianas da prata. Adaptado de Li et al [47].	11
Figura 8 - Exemplos de biomateriais. Em (A) pele artificial ^[1] ; (B) prótese metálica de joelho ^[1] ; (C) e (D) estruturas de polietileno para reconstrução auricular e implante de queixo ^[1] ; (E) implante dentário.	13
Figura 9 - Infográfico sobre as etapas para a criação de um biomaterial [Adaptado de]. .	14
Figura 10 - (a) Estrutura representativa para um quantum dot; (b) distintas soluções de quantum dots; (c) quantum dots em estado sólido[67, 68].	16
Figura 11 –Esquema ilustrativo para relação entre o tamanho de nanopartícula e comprimento de onda de emissão. [67, 68 e 69]	17
Figura 12 - Representação da oscilação da nuvem eletrônica da nanopartícula interagindo com um campo elétrico externo.	19
Figura 13 - Esquema geral de um espectrofotômetro.	21

Figura 14 - Equação para a intensidade da absorbância.	21
Figura 15 - Representação da atenuação do feixe incidente após interação com a amostra.	22
Figura 16 - Equação da Lei de Beer.	22
Figura 17 - Quadro de frequências na região do espectro de infravermelho. Fonte: https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/ infrared.htm [59].	24
Figura 18 - Esquema ilustrativo da emissão de raios-X [62].....	26
Figura 19 - Princípio de funcionamento do equipamento de microscopia eletrônica de varredura (MEV).	27
Figura 20 - Esquema Ilustrativo de um Equipamento de DSC.	27
Figura 21 - Imagem mostrando o processo de sangria para a coleta de látex. Local: Fazenda Indiana.	33
Figura 22 - Látex em placa de Petri antes e depois do processo de secagem.	34
Figura 23 - Membranas de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução.	35
Figura 24 - Esquema do teste de MTT.	39
Figura 25 - Equema do processo de fixação das células sobre os filmes.	42
Figura 26 - Esquema ilustrativo do ensaio de cometa.....	44
Figura 27 - Soluções de QDs-CaTe (a) sem incidência de luz UV; (b) com incidência de luz UV. As soluções estão dispostas em ordem crescente de tempo de síntese....	47
Figura 28 - Ilustração do processo de preparação do filme de BN/QDs.	48
Figura 29 - Espectros de UV-Vis para os filmes de borracha natural e prata.....	50
Figura 30 - Espectros de FT-IR para os filmes de borracha natural pura e com nanopartículas de prata nos diferentes tempos de redução.	51

Figura 31 - Espectros FT-IR/ATR para os filmes de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução. Estudo da região entre 4000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1}	53
Figura 32 - Espectros FT-IR/ATR para os filmes de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução. Estudo da região entre 1600 cm^{-1} a 800 cm^{-1}	54
Figura 33 - Esquema de um possível modelo de reação para a formação de AgNPs no filme de BN.....	55
Figura 34 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o filme de borracha natural pura (a) formada pelos elétrons secundários (SE) e (b) formada pelos elétrons retroespalhados (backscattering electron) BSE..	56
Figura 35 - (a) gráfico da análise elementar e (b) tabela de porcentagens e atribuições dos picos obtidos para o filme de BN pura.	57
Figura 36 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o filme BN/Ag 120'.	58
Figura 37 - Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) para os filmes de BN pura, BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120'.....	59
Figura 38 - Comparativo entre as curvas de DSC para os filmes de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução.....	61
Figura 39 – Resultados das análises dos extratos líquidos por Espectroscopia de Emissão Óptica acoplado a Plasma Induzido (ICP).....	62
Figura 40 - Viabilidade celular da linhagem CCD 1059sK para o extrato líquido com BN pura em meio de cultura.	64
Figura 41 - Comparativo visual para as células CCD 1059 sK expostas ao extrato com meio de cultura, no início do experimento (a), (c) e (e); e depois de transcorrido o período de 24 horas (b), (d) e (f).	65

Figura 42 - Viabilidade celular da linhagem CCD 1059 sK para o extrato de BN pura em água.....	66
Figura 43 - Comparativo visual para as células expostas ao extrato com água, no início do experimento (a) e (c) e depois de transcorrido o período de 24 horas (b) e (d).	67
Figura 44 - Gráfico da porcentagem de viabilidade celular para os extratos obtidos para os filmes de BN pura, BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120'.....	68
Figura 45 - Foto da medida dos halos, com o auxílio de uma régua milimétrica em todas as condições- testes.	69
Figura 46 - Imagens das células visualizadas através de microscópio óptico no aumento de 100X, para todas as condições testadas.	70
Figura 47 - Imagens de MEV para o filme de BN (A) sem células aderidas e (B) com as células aderidas na superfície.	71
Figura 48 - Imagens de MEV em diferentes magnitudes para as distintas amostras com células aderidas na superfície.	72
Figura 49 – Teste do Cometa para os filmes de BN e BN/Ag nos diferentes tempos de redução. Na parte superior do gráfico se pode observar as imagens do cometa para o controle positivo (a); controle negativo (b); para o filme de BN pura (c) e a BN/Ag120' (d).	73
Figura 50 - Mistura do látex com solução de QDs. As placas estão dispostas de forma crescente de acordo com o tempo de síntese dos QDs.	75
Figura 51 - Filmes de BN/QDs-CdTe após o tempo de secagem (a) luz ambiente, e (b) iluminadas com lâmpada UV.....	75

Figura 52 - Espectroscopia UV-Vis para os filmes de BN pura e para as diferentes membranas de BN/QD. Inset: imagem das membranas com e sem a incidência de luz ultravioleta.	76
Figura 53 - Espectro de fluorescência dos filmes BN/DQ2, BN/QD3 e BN/QD4. Linha de excitação 514 nm.	77
Figura 54 - Imagem de MEV para a membrana de BN/QD.	78
Figura 55 – Imagem de microscopia de transmissão eletrônica (TEM) da solução de DQs. [96]	80
Figura 56 - Imagens de AFM pra os filmes de BN Pura e BN/QD1, BN/AD2, BN/QD3 e BN/QD4.....	81

Índice de Tabelas

Tabela I - Classificação dos Danos ao DNA. [85]	31
Tabela II - Grau de citotoxicidade baseado no tamanho do halo observado macroscopicamente.....	41
Tabela III - Grau de citotoxicidade baseado no nas condições observadas microscopicamente das células.....	41
Tabela IV - Designação para os filmes de BN e BN/Ag.	52
Tabela V - Valores para a análise elementar da membrana de BN/Ag120'.	58
Tabela VI - Valores em cm do tamanho dos halos encontrados entre as células e as membranas testadas e a classificação de citotoxicidade correspondente baseada na ISO 10993/2009.....	69
Tabela VII - Resultado das observações microscópicas das células em todas as condições experimentais, baseado na classificação de grau de citotoxicidade da ISO 10993/2009.	70
Tabela VIII - Resultado da análise elementar do filme BNQD4.	79

DANNA, Caroline Silva. Filmes de borracha natural com nanopartículas de prata e pontos quânticos. 2016. Tese (Ciências e Tecnologia de Materiais) – UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente, 2016.

RESUMO

Filmes de borracha natural (BN), fabricadas a partir do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, foram utilizadas neste trabalho como substratos ativos para a obtenção de nanopartículas de prata (AgNPs) e como substrato inativo para nanopartículas semicondutoras fluorescentes, os pontos quânticos ou *quantum dots* (QDs). O filme de BN agiu como um reator para a síntese das AgNPs, sendo ele o agente redutor, estabilizador e substrato destas. A síntese pode ter ocorrido devido a interação de amidas, provenientes das proteínas presentes no látex, com os íons prata, provenientes da dissociação do nitrato de prata (AgNO_3) em água, dando origem a um processo de síntese verde de nanopartículas (NP). O processo de síntese foi realizado por imersão dos filmes de BN na solução de AgNO_3 por diferentes tempos, sendo os filmes obtidos após este processo denominados filmes de BN/Ag com distintas concentrações de AgNPs, sendo estas com formato esférico e tamanho variando entre 25 nm a 60 nm. Estudos de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*, foram realizados utilizando as linhagens celulares CCD 1059 sk (fibroblasto humano normal) e CHO K1 (fibroblasto de ovário de hamster) e a avaliação dos resultados destes ensaios demonstram que os filmes, tanto de BN e de BN/Ag, não geram danos ao metabolismo celular para as linhagens estudadas e também não se observou dano ao DNA de tais células. Ainda neste trabalho foi obtido filmes flexíveis fluorescentes devido a mistura líquido-líquido do látex de borracha natural com a solução de QDs de Telureto de Cádmio; após o processo de secagem obteve-se um filme flexível fluorescente com emissão em diferentes comprimentos de onda do espectro visível sendo que as amostras em estado sólido apresentam emissão de igual comprimento de onda das soluções de QDs, demonstrando assim

a boa miscibilidade entre os dois materiais, podendo então a BN ser aplicada como substrato inerte para tais nanopartículas a fim de se obter um filme flexível fluorescente.

Palavras-chave: borracha natural, nanopartículas de prata, síntese verde de nanopartículas, citotoxicidade, pontos quânticos, *quantum dots* Cd/Te, filme flexível fluorescente.

ABSTRACT

Natural rubber films (NR), made from latex of *Hevea brasiliensis*, were used in this study as active substrates to obtain silver nanoparticles (AgNPs) and as inactive substrate for fluorescent semi-conductor nanoparticles, quantum dots (QDs). The NR film plays as a reactor, reduce agent, stabilizer and substrate for AgNPs synthesis. The synthesis may be due to interaction amides derived from proteins present in latex, with the silver ions from the dissociation of silver nitrate (AgNO_3) in water giving rise to a process of green synthesis of nanoparticles (NP). The synthesis process was carried out by immersing the BN film on AgNO_3 solution for different times, and the films obtained after this process called BN films/Ag with different concentrations of AgNPS, which are spherical shape and size between 25 nm 60 nm. Cytotoxicity and genotoxicity studies *in vitro* were performed using the cell line CCD 1059 sk (normal human fibroblast) and CHO-K1 (hamster ovary fibroblast) the results of these assays demonstrate that films, BN and BN/Ag, do not generate damage to cell lineage metabolism and also there was no damage to the DNA of these cells. Still, in this work, was obtained flexible fluorescent films from liquid-liquid mixture between the natural rubber latex and QDs solution; after the drying process there was obtained a fluorescent flexible film and those emissions can be observed for different wavelengths in the visible spectrum while the samples in the solid state, exhibit same the emission of QDs solutions, thus demonstrating the good miscibility between the two materials, then the BN may be applied as inert substrate for this nanoparticles in order to obtain a flexible fluorescent film.

Key-words: natural rubber, silver nanoparticles, green synthesis of nanoparticles, cytotoxicity studies, Cd/Te quantum dots, flexible fluorescent films.

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Introdução

A nanotecnologia utiliza de materiais e/ou dispositivos onde pelo menos um dos materiais está em escala nanométrica, ou seja, de materiais que variam de 0,1 até 100 nanômetros de tamanho; é uma ciência multidisciplinar que envolve diferentes ramos de pesquisa, como a Física, Química, Biologia, Medicina e Engenharia [1,2]. Na Figura 1 é possível observar a ilustração de uma escala comparativa entre tamanhos de algumas estruturas que apresentam dimensões de 0,1 nm como os átomos de silício e uma espécie de formiga que apresenta dimensões na escala de centímetros.

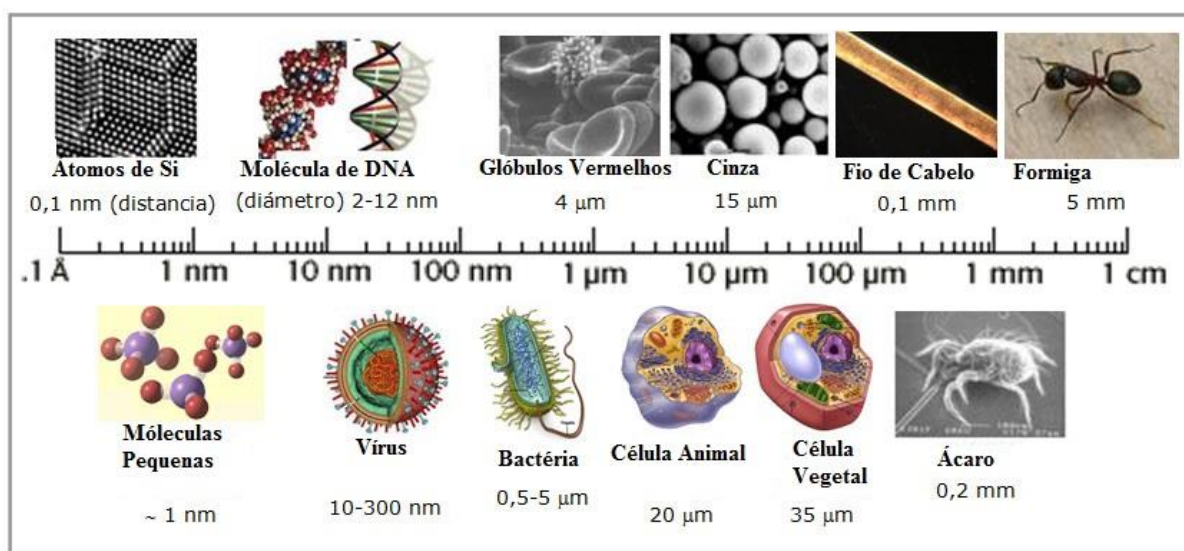


Figura 1 - Imagem ilustrativa para comparativo de escala de tamanho. [2]

O conceito de Nanotecnologia tem sua origem no século XX, com Richard Feynman, que tratava da importância de materiais em escala atômica, e este conceito pode ter sido o precursor para estudos de desenvolvimento de equipamentos com precisão atômica para que os materiais nanométricos pudessem ser mais bem conhecidos [3]. Assim, com o desenvolvimento e domínio das técnicas de produção e caracterização de nanomateriais cada vez mais se pode controlar, de forma precisa, a morfologia das nanoestruturas dando assim melhor direcionamento para aplicações em variados campos da ciência; a possibilidade de

“ver” as estruturas nanométricas possibilita que essas sejam mescladas com estruturas macrométricas para gerar novos materiais, que são chamados nanocompósitos.

Um material denominado compósito é uma classe de materiais que apresentam ao menos duas fases, sendo uma das fases contínuas, a matriz, e a outra dispersa. As propriedades das fases conjuntas se diferem das propriedades de cada fase individual, e esse fato faz do compósito um material singular, assim quando uma das fases do compósito está em escala nanométrica, este compósito é denominado nanocompósito e apresenta forte crescimento no cenário industrial, principalmente, devido às propriedades mecânicas á ele associados, tais como leveza e resistência á aplicação de altas cargas. Como exemplo, podemos citar a utilização de um nanocompósito, tendo plástico como matriz polimérica e fibras de carbono como agente reforçador, utilizado na fabricação da parte exterior da BMW I3[4].

A produção de nanocompósitos poliméricos nos dias de hoje ultrapassa a produção de alumínio, cobre e todos os compósitos não-ferrosos [5] sendo que em 2105 a produção chegou próximo a seiscentos milhões de toneladas e estima-se que a receita gerada seja superior à 3 bilhões de dólares americanos[5], essas informações e a estimativa de produção e receita gerada até o ano de 2018 está apresentada na Figura 2.

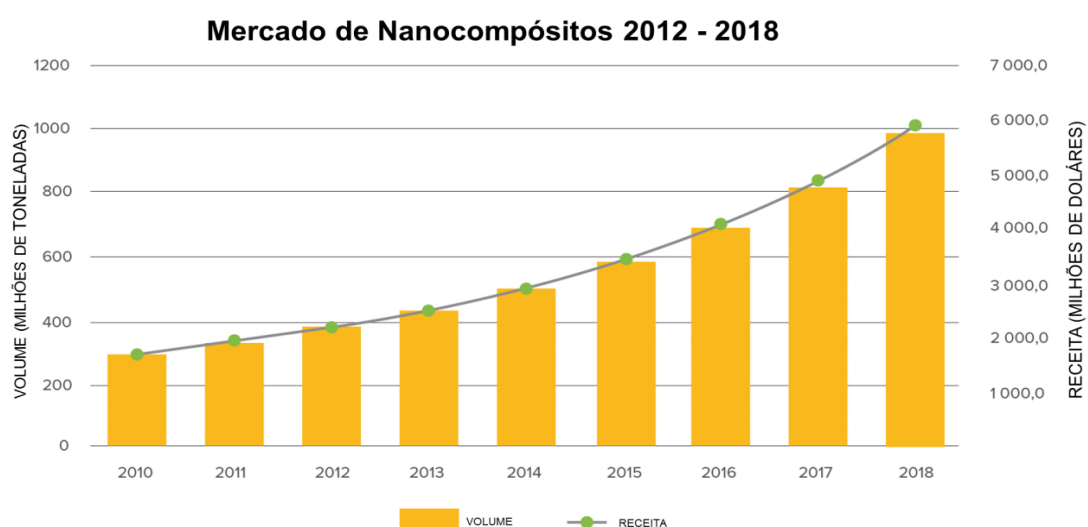


Figura 2 - Dados do Mercado Internacional de Nanocompósitos entre os anos de 2012 a 2018. Adaptado de [5].

Nanocompósitos com uma das fases sendo nanopartículas, em especial as metálicas e a outra fase polimérica, recebem atenção diferenciada devido a gama de possíveis aplicações como, sensores de vários tipos [6, 7] à aplicações biológicas [8, 9] como por exemplo a utilização de nanopartículas de ouro e prata para fabricação de um biossensor ultrasensível para identificação de DNA em soluções de baixa concentração [10].

Os materiais poliméricos também empregados em pesquisas nas áreas que englobam a nanotecnologia como matriz para as nanoestruturas [11, 12] como por exemplo a utilização da borracha natural como agente redutor para nanopartículas de ouro [11] ou matriz para sistema controlado de liberação da nanopartículas de prata (AgNPs) [13] e também a utilização do látex para a obtenção de coloides de prata [14] não sendo necessário a utilização de outros agentes redutores, isso faz da borracha natural um material promissor para essa área de aplicação.

A borracha natural é um polímero obtido da seiva da árvore da espécie *Hevea brasiliensis*, mais conhecida como seringueira e os produtos fabricados usando este polímero como matéria-prima atingem um mercado amplamente diversificado que vão desde artefatos de uso hospitalar (luvas cirúrgicas, cateteres, garrotes, próteses entre outros); de uso na indústria da moda (tecidos impermeáveis, elásticos para diversos usos, etc.) [15, 16]; indústria automobilística (piso antiestático [17], pneus, coxins, câmara de ar, etc.). Algumas das características que fazem deste polímero indispensável no cenário industrial atual são: a alta elasticidade, flexibilidade, resistência à abrasão e corrosão, impermeabilidade, e também pode ser considerado um material de baixo custo e de fácil aquisição. Visto as inúmeras possibilidades de aplicação de tal polímero, este foi utilizado na obtenção dos filmes obtidos e estudados neste trabalho dando origem há dois diferentes nanocompósitos poliméricos, um com nanopartículas metálicas de prata que foi utilizado para estudos biológicos e outro com nanopartículas semicondutoras fluorescentes para obtenção de um filme flexível fluorescente.

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será apresentada a revisão bibliográfica de forma separada para cada material aplicado no desenvolvimento desta tese além de uma revisão bibliográfica sobre biomateriais. Os itens apresentados são: Látex e Borracha Natural; Nanopartículas de Prata e Biomateriais.

2.1 Látex e Borracha Natural

O látex é um sistema coloidal estável, de um polímero em meio aquoso, a $\text{pH} \sim 6.0 - 7.2$, de partículas de borracha polidispersas em um soro composto de sais minerais e proteínas aniônicas [18, 19], com densidade de $0,975 \text{ g/cm}^3$ sendo esse sistema coloidal a seiva da árvore da espécie *Hevea brasiliensis*, conhecida popularmente como seringueira. A seiva é obtida através do processo chamado sangria da árvore, onde se faz um corte no caule da mesma para a retirada da seiva, que é o látex. Na Figura 3 é possível observar uma árvore de *Hevea brasiliensis* durante o processo de sangria e no destaque da imagem se tem o látex coletado.



Figura 3 - Processo de sangria da seringueira e em destaque o látex coletado.

A proporção da composição do látex é de aproximadamente 30 – 45% em massa de hidrocarbonetos, 3 – 5% de componentes não-borracha que é uma mistura de proteínas, lipídios e ácidos graxos de cadeias longas que circundam a molécula de isopreno, fazendo com que a partícula de borracha adquira uma carga negativa [20]. Essas proteínas, além de estarem adsorvidas na superfície da partícula, podem ser encontradas no interior das mesmas [21]. Na Figura 4 se tem um esquema ilustrativo para a formação da partícula de borracha que foi acima descrito; essas partículas podem variar de 5 a 3000 nm [22].

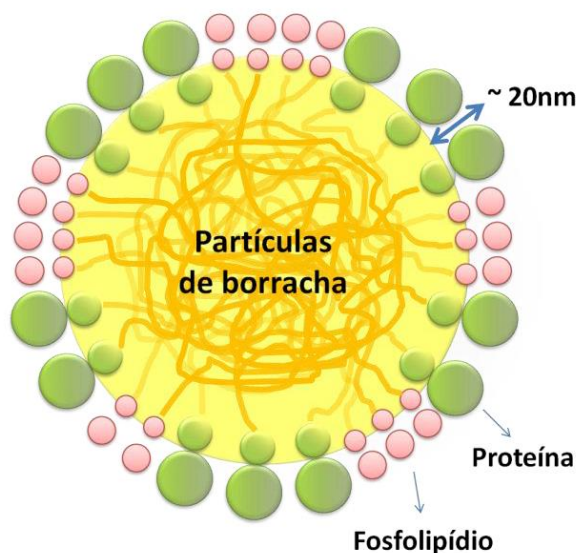


Figura 4 - Modelo proposto para partícula de borracha natural [22].

A borracha natural apresenta peso molecular médio de aproximadamente 1×10^6 g/mol e estrutura molecular composta de pela unidade 2 – *trans* – isoprênica, ligada a uma longa cadeia *cis* – isoprênica, que dá a característica amorfa do polímero [23]. A fórmula química da borracha natural é o 2-metil-1,3-butadieno $(C_5H_8)_n$, onde n assume valores entre 2.000 a 10.000, que representa o número de meros da cadeia polimérica. Na Figura 5 é possível observar um arranjo estrutural da cadeia polimérica do poli- *cis*- isopreno [11].

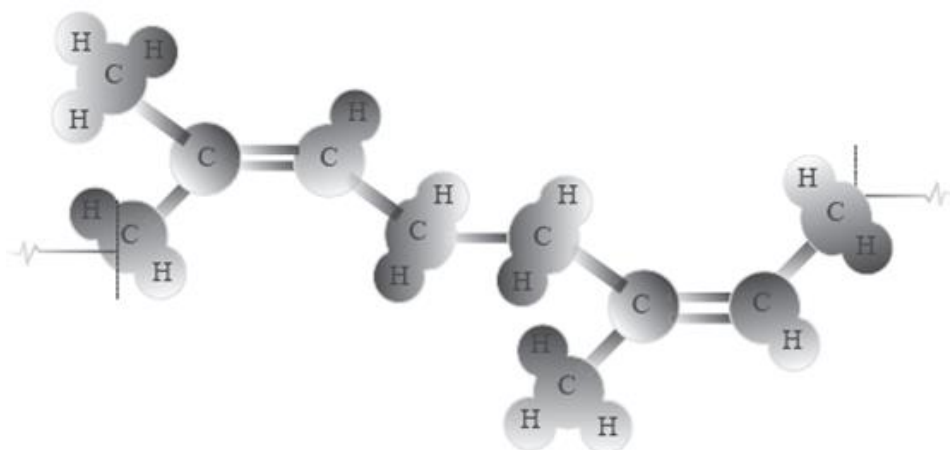


Figura 5 - Representação esquemática da estrutura química do poli-cis-isopreno [11].

Quando exposto ao ar, o látex pode permanecer de 12 a 24 horas na forma líquida e após esse tempo, se inicia o processo de coagulação espontânea do material, que ocorre devido á processos químicos e bioquímicos, que fazem com que o pH da solução se torne mais ácido. Esse processo gera a separação das fases borracha e não-borracha. Para evitar esse processo, se faz necessário à estabilização do látex pela adição de agentes químicos, geralmente por adição de amônia que mantém o pH do látex estável por mais tempo [24]. O processo de secagem do látex a temperaturas controladas permite a evaporação do solvente e assim a obtenção de um filme de borracha natural com espessura controlável.

Estudos mostram que o látex promove a neoformação de tecidos e reparação óssea [25, 26, 27], quando em contato com o organismo não causa rejeição e as reações alérgicas a este produto são mínimas [26], este fato se dá pois poli-isoprenos, em cadeias maiores, também são encontradas em tecido dos animais superiores [26]. É um material vegetal, assim, não existe a preocupação com possível transmissão de vírus patogênicos para o homem. Esses fatores fazem com que os materiais à base de borracha natural tenham um grande espectro de aplicação [28, 29, 30, 31] com destaque para área que engloba os nanomateriais. Na Figura é possível observar o desenvolvimento do processo cicatrizatório de uma lesão no pé de um paciente com diabetes; uma membrana de borracha natural, na forma

de uma palmilha, foi utilizada como agente de tratamento juntamente com o uso de LEDs, esses resultados são de um trabalho de doutorado realizado no ano de 2013 na Faculdade de Tecnologia na Universidade de Brasília [32] e comprova a propriedade que a borracha natural apresenta de indução de neoformação tecidual.

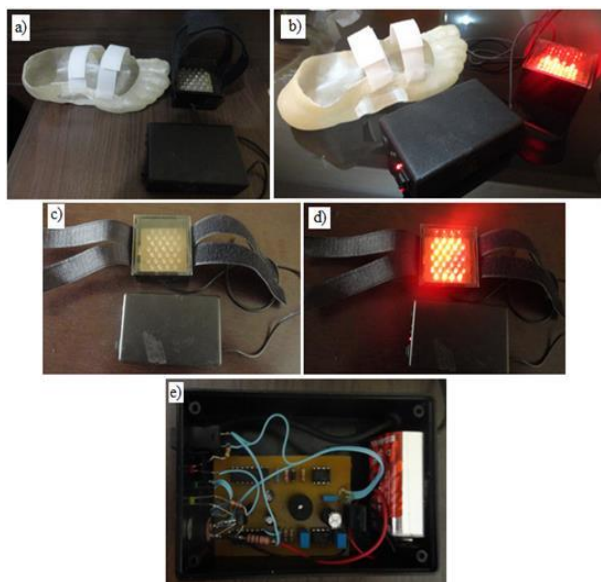


Figura 4.6 - Sistema indutor de neoformação tecidual composto pela palmilha cicatrizante e o circuito eletrônico de regeneração tecidual: (a) palmilha cicatrizante com os LEDs apagados; (b) palmilha cicatrizante com os LEDs acesos; (c) e (d) circuito eletrônico de regeneração tecidual (e) vista interna do circuito.



Figura 5.12 - Seguimento clínico fotográfico. Paciente 3 (úlcer 3) – Grupo Experimental: a) início (antes do sistema indutor de neoformação tecidual); b) pós-tratamento (depois de usar o sistema indutor de neoformação tecidual) - 1 semana; c) 2 semanas; d) 4 semanas.

Figura 6 – Imagens de um sistema indutor de neoformação tecidual utilizando a borracha natural e seguimento clínico de um paciente que fez uso do material [32]

2.2 Nanopartículas de Prata

Uma partícula que apresenta tamanho menor que 100 nm é considerada uma nanopartícula e sua dimensão lhe proporciona área superficial maior que seu tamanho *bulk* e consequentemente maior reatividade que permite interações distintas com uma grande diversidade de materiais. As nanopartículas metálicas são extensamente estudadas com direcionamento pra aplicações que vão desde dispositivos optoeletrônicos [33] a aplicações médicas [34, 35, 36].

O efeito antisséptico da prata é utilizado desde o ano 1000 a.C, onde reservatórios

para manter a água potável eram feitos de prata; durante a Idade Média a prata foi utilizada para tratamento de diversas doenças, como distúrbios nervosos e sífilis e na era moderna, final do Século XIX, a prata foi indicada para tratamento de gonorreia e conjuntivite[33].

A utilização da prata coloidal é datada do fim do século 18 [37] sendo que na década passada a sua utilização comercial atingiu cerca de 320 toneladas em produtos manufaturados. No mercado atual, várias são as formas de comercialização da prata, seja na forma iônica ou nanoparticulada [38] sendo que esses produtos podem ser encontrados em pomadas para queimaduras, com o princípio ativo Sulfadiazina de Prata, para uso tópico, cateteres e até curativos; já no mercado de perfumaria podem ser encontrados em desodorantes sendo a marca mais evidente no mercado a da linha *Nívea Silver Protect®*; a indústria também utiliza materiais com prata pra embalagem que prometem conservar por mais tempo produtos alimentícios mantendo-os livre de bactérias por exemplo [38, 39].

Nanopartículas metálicas de prata (AgNPs) apresentam ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [40,41] além de influenciarem no desenvolvimento de fungos [42, 43] e vírus. O primeiro relato do uso da prata para fins bactericida foi realizado por Von Naegelis, que estudou a interação dos íons prata com algas. As nanopartículas de prata e também os íons prata podem interagir de distintas formas com os organismos, e essa interação ainda apresenta várias lacunas para o completo entendimento [36], no entanto podemos descrever algumas das formas de interação da prata nanométrica que interage eletrostaticamente com as células podendo causar ruptura da membrana celular, num mecanismo chamado morte celular por ruptura da membrana celular via prata [44, 45]. Outra forma de interação das AgNPs com a célula é por proteínas que apresentam grupos contendo enxofre e fósforo em sua composição, tanto as AgNPs, quanto os íons prata tem afinidade com esses grupos, e formam ligações estáveis do tipo –S–Ag que inibem a transferência de hidrogênio e de elétrons inativando as enzimas respiratória e assim

são capazes de atingir o interior da célula, onde podem ainda interagir com o DNA e impedir sua replicação [44]. As AgNPs ainda podem interagir com as células através da dissociação da nanopartícula que faz com que íons prata sejam liberados no interior celular causando estresse oxidativo, uma vez que o íon prata atinge o interior celular, pode desencadear processos que levam a formação de radicais livres [46, 47].

Ainda estudos mostram que os danos causados pela prata, seja eles à bactérias ou a outros tipos de células, é inversamente proporcional ao tamanho da partícula, assim, NPs que tem seu tamanho variando entre 5-10 nm, apresentam-se mais reativas em relação às partículas que apresentam tamanhos maiores [36, 44, 46]. A Figura 7 traz uma ilustração da interação das nanopartículas de prata e os íons prata com a estrutura celular de bactérias.

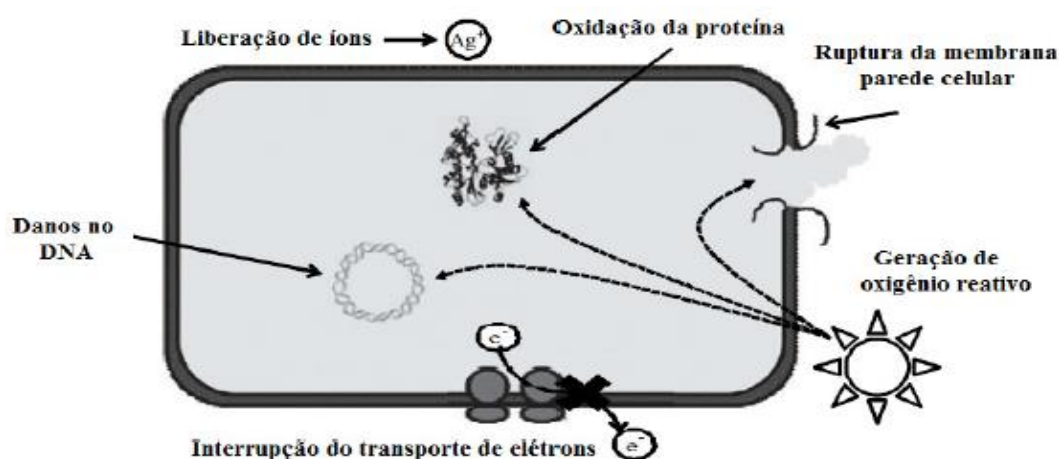


Figura 7 - Esquema representativo de mecanismos de ação antimicrobianas da prata. Adaptado de Li *et al* [47].

Pesquisadores brasileiros demonstraram que é possível utilizar o látex de borracha natural para obter uma solução coloidal de AgNPs [14] e também pode reduzir nanopartículas de ouro [11], realizando então uma síntese verde, *green synthesis* de NP.

2.3 Biomateriais

Com o avanço da tecnologia muitos pesquisadores direcionam seus esforços a fim de desenvolver novos materiais que contenham características que permitam a aplicação para

substituição de estruturas compatíveis com o corpo humano. Esses materiais são denominados biomateriais, pois se enquadram na seguinte definição “um biomaterial pode ser definido como qualquer material usado na fabricação de dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de forma segura, econômica e fisiologicamente aceitável” [48]. Um biomaterial ainda pode combinar duas ou mais substâncias desde que farmacologicamente inertes.

Inicialmente, as pesquisas neste ramo eram focadas em compostos de origem biológica para enxertos e transplantes. Esses compostos são divididos em autógenos, onde o material é doado pelo próprio receptor; alógenos ou homólogo, onde o doador e o receptor apresentam espécie coincidente; e xenógenos ou heterólogo, onde as espécies do doador e do receptor são distintas [49].

Materiais sintéticos também podem ser utilizados como um biomaterial e estes são divididos em metálicos, ferrosos e não ferrosos; cerâmicos; poliméricos e compósitos [48]. Um biomaterial, sintético ou natural, deve apresentar biocompatibilidade, ser atóxico, não carcinogênico, bioestável, suas propriedades mecânicas, peso e densidade deve ser adequado para sua aplicação, ser reprodutível, de baixo custo e fácil fabricação [48], além disso, devem também promover resposta biológica específica associada a sinais originários em nível molecular, que são obtidos pela funcionalização da estrutura do biomaterial.

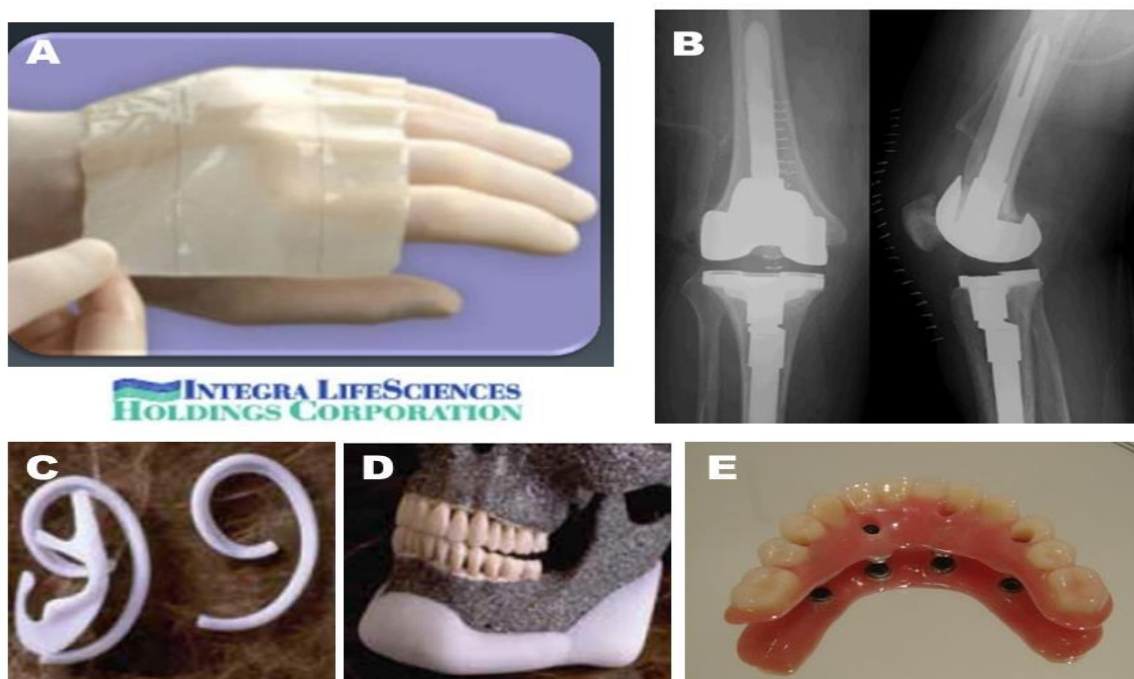


Figura 8 - Exemplos de biomateriais. Em (A) pele artificial^[50]; (B) prótese metálica de joelho^[51]; (C) e (D) estruturas de polietileno para reconstrução auricular e implante de queixo^[52]; (E) implante dentário.

A citotoxicidade de um material e/ou biomaterial se refere à sua capacidade intrínseca de gerar alterações metabólicas em culturas celulares, podendo ou não causar a morte das mesmas e estes são os mecanismos necessários para entender de interação de novos materiais com culturas celulares a fim de aplica-los em seres vivos [53]. Sendo assim são recomendados para todos os materiais utilizados na área de saúde testes onde se podem seguir as seguintes normas, por exemplo, a ISO 10995/5 [54], a ASTM F813 [55] e F619 [56], entre outras. Os testes realizados em culturas celulares em laboratório, os testes *in vitro*, estão substituindo testes *in vivo*, pois apresentam custos reduzidos, alta reprodutibilidade, demanda sustentável do mercado consumidor, além da rápida avaliação, que devido a sua sensibilidade, permitem que materiais tóxicos a essas células sejam descartados previamente aos experimentos com animais [57]. Na Figura 9 é apresentado um infográfico com as etapas para obtenção de um biomaterial.

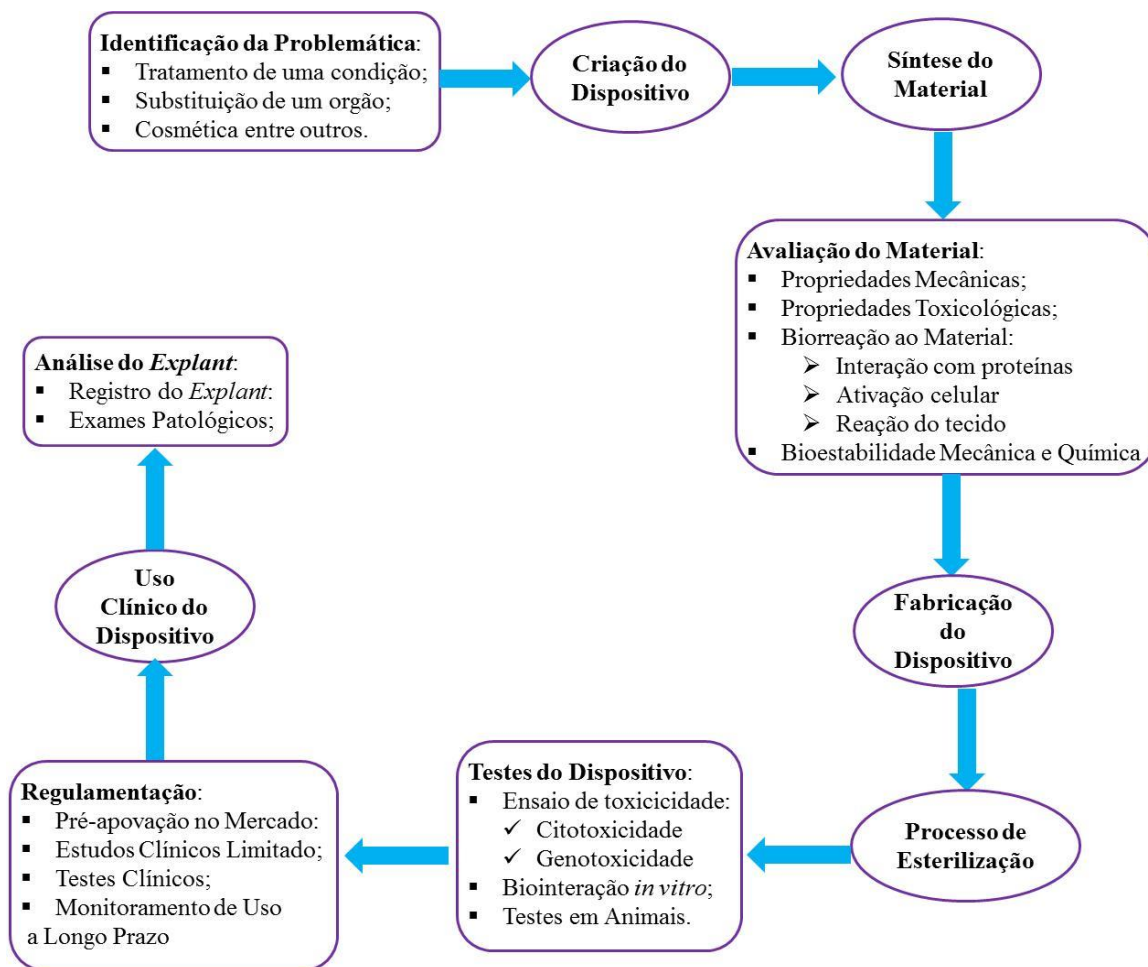


Figura 9 - Infográfico sobre as etapas para a criação de um biomaterial [Adaptado de 58].

Um material citotóxico pode gerar diversos efeitos decorrentes de alterações funcionais em alguma via específica. O efeito citotóxico de um material é desencadeado por um irritante primário que é seguido de distintas reações dependendo da toxicidade do irritante primário, de sua concentração e do tempo de exposição. Dessa forma, conhecer a citotoxicidade de um material é crucial quando se trata de materiais que irão ser aplicados na área médica e estes estudos são realizados em sub-grupos de estudos que são: estudos *in vitro*, onde se utilizam culturas de celulares; *in vivo*, utilizando experimentos em animais e os ensaios clínicos onde os estudos já são realizados em humanos [48,53].

2.4 Pontos Quânticos

Materiais flexíveis luminescentes, que apresentam boa resistência mecânica, ou seja, que se pode dobrar sem causar danos à sua matriz, atraem grande interesse da comunidade

científica devido à sua ampla aplicação em dispositivos optoeletrônicos como diodos emissores de luz, células fotovoltaicas, displays flexíveis, sensores de biomoléculas entre muitas outras aplicações [59, 60].

Entre os vários materiais com os quais é possível a formação de filmes flexíveis, a utilização de polímeros com propriedades fluorescentes é extremamente atraente pelo fato de que eles podem favorecer o ajuste de cor e a transparência do filme [61, 62]. No entanto, a gama deste tipo de material é bastante limitada, assim a possibilidade de se unir dois materiais distintos, a fim de gerar filmes flexíveis fluorescentes, ganha cada vez mais atenção uma vez que se tem relatos da boa compatibilidade entre polímeros e algumas nanopartículas fluorescentes [62] como os pontos quânticos.

Os *quantum dots* são um tipo de nanopartículas cristalinas, ou nanocristais, de semicondutores que se destacam, principalmente, por sua propriedade fluorescente única [63], sendo essa propriedade ligada, diretamente, ao tamanho de partícula e decorrentes do seu confinamento quântico. Essas estruturas foram relatadas pela primeira vez pelos pesquisadores Louis E. Brus [64] e Alexei I. Ekimov [65] na década de 80 onde eles se referiam a elas como “fluoróforos semicristalinos condutores”. Essas estruturas semicristalinas são, geralmente, formadas por um sistema binário tendo um dos semicondutores no centro, chamado de *core*, e este centro é envolto por outro semicondutor, chamado *shell*, formando uma estrutura *core-shell* [66] como é mostrada na Figura 10(a), na Figura 10(b) se pode observar uma imagem com diferentes soluções de *quantum dots* emitindo em diferentes comprimentos de onda [67] e na Figura 10(c) se observa distintos *quantum dots* na forma de pó [66].

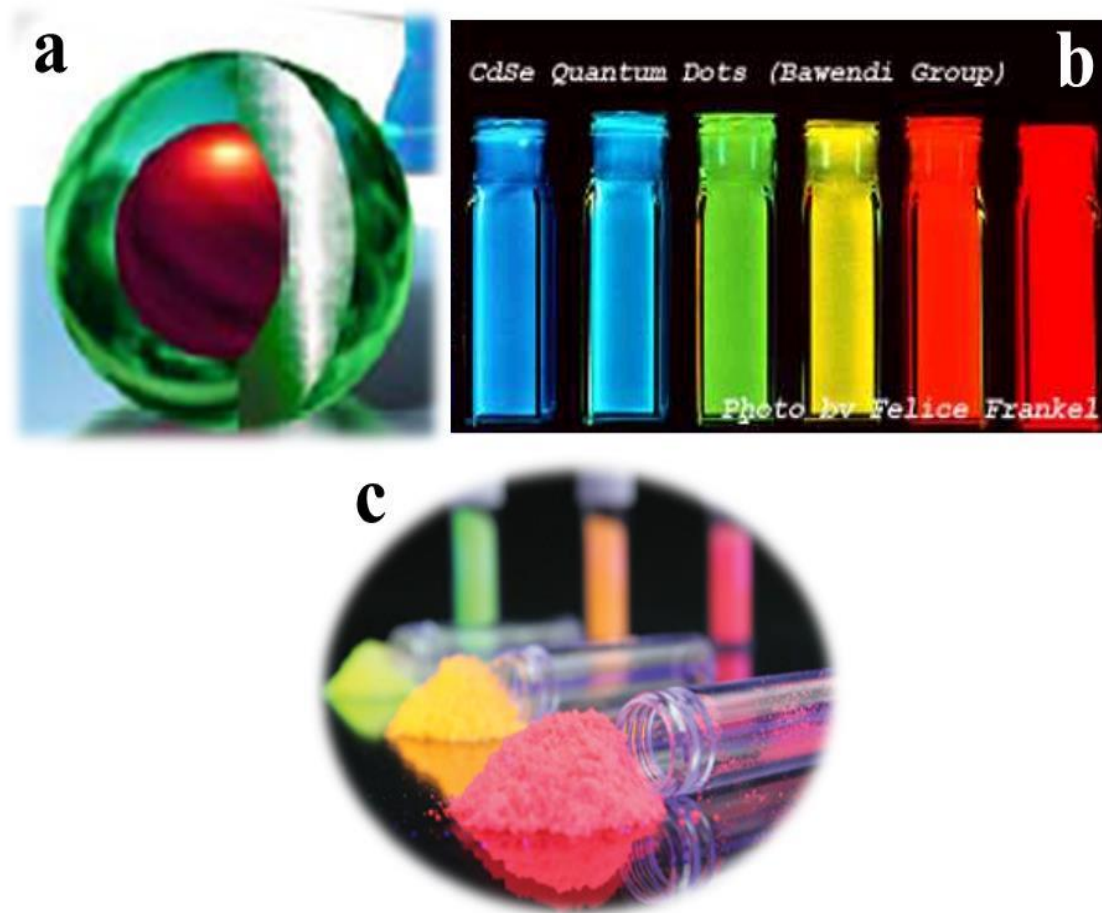


Figura 10 - (a) Estrutura representativa para um quantum dot; (b) distintas soluções de quantum dots; (c) quantum dots em estado sólido[67, 68].

Os QDs podem apresentar tamanhos que variam entre 2 nm a 20 nm[66] e quando excitados com luz ultravioleta emitem luz em distintos comprimentos de onda, ou seja, emitem luz em diferentes cores; essa propriedade óptica se deve ao efeito quântico dependente do tamanho da partícula (*Quantum size effect “Band Shift”*) e está relacionada com a diferença de energia entre as bandas de condução e valência de cada elemento que compõe a nanopartícula semicondutora [67, 68, 69] e ainda essa energia é inversamente proporcional ao tamanho da nanopartículas, ou seja, quanto menor o tamanho da partícula maior será a diferença de energia entre as bandas de valência e condução, resultando em uma emissão em menores comprimentos de onda, assim podemos utilizar o espectro de emissão das soluções de QDs para identificar o tamanho de partícula obtida no processo de síntese; um esquema sobre as relações citadas acima pode ser visto na Figura 11.

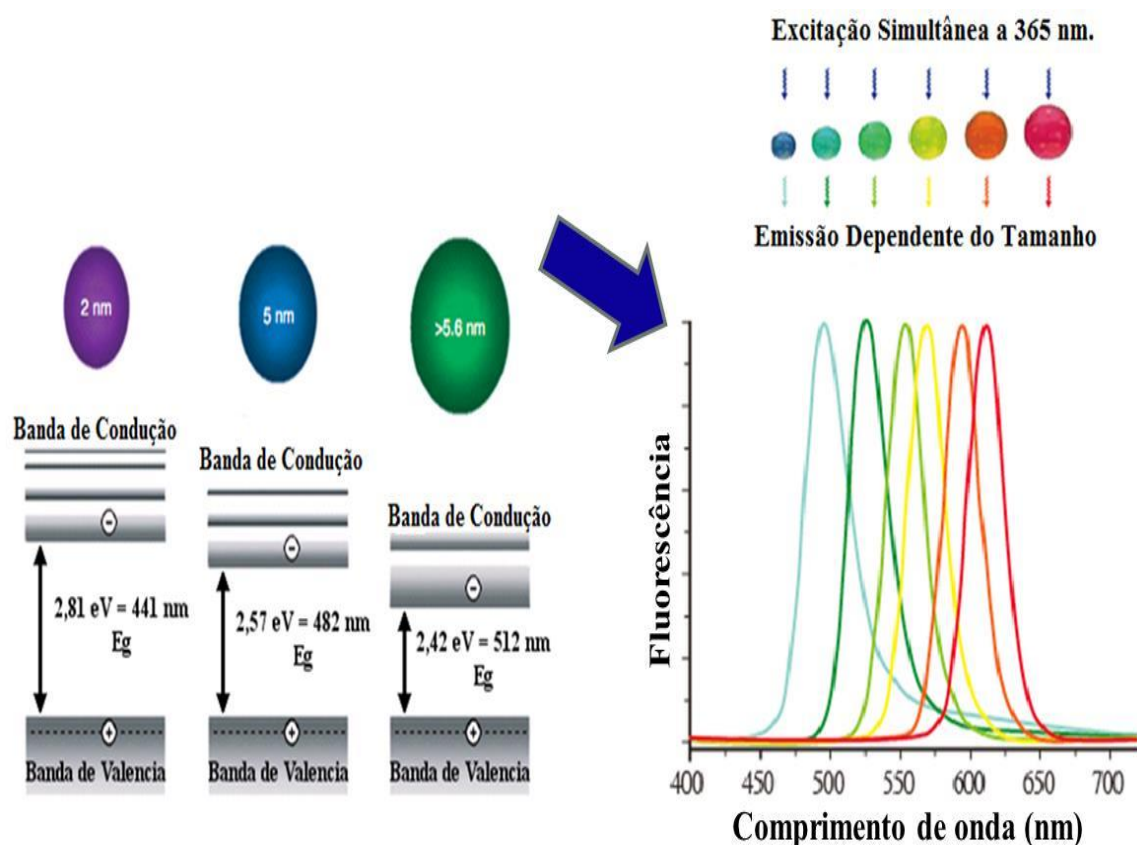


Figura 11 –Esquema ilustrativo para relação entre o tamanho de nanopartícula e comprimento de onda de emissão. [67, 68 e 69]

Muitas pesquisas estão voltadas para a incorporação desses pontos quânticos (QDs) em matrizes poliméricas gerando compostos orgânicos-inorgânicos que são materiais promissores para novas gerações de dispositivos eletrônicos ópticos e sensores biológicos principalmente, pois tem capacidade reconhecida como foto-sensores, para ensaio imunológico, bio-imagem e medidores de pH/temperatura.

No entanto, a preparação de compósitos de polímero-QD tem sido um desafio até agora por várias razões [61, 70], incluindo problemas de miscibilidade de QDs na matriz polimérica e até transferência de energia (*quenching*) entre as partículas e o polímero.

Neste trabalho será apresentada uma metodologia simples para a obtenção de um material que engloba flexibilidade e fluorescência como característica principal.

Capítulo 3 – Objetivos

Os objetivos deste trabalho são divididos em dois âmbitos que tem em comum a utilização da borracha natural como substrato para distintas nanopartículas.

Como primeiro âmbito, se tem o estudo da interação do filme de BN com as AgNPs, e dentro deste, o primeiro objetivo é utilizar a borracha natural como substrato ativo para o processo de síntese de AgNPs, pois como mostrado no Capítulo 2 a borracha natural, é um material biocompatível, pode estimular a formação de novos vasos, entre outras propriedades biológicas, além de ser uma matriz polimérica flexível que apresenta substâncias, como as proteínas, que são capazes de atuar como agente redutor para nanopartículas metálicas; o segundo objetivo, é a identificação do grupo ativo responsável pelo processo de síntese das AgNPs na matriz polimérica, além de realizar os estudos preliminares de citotoxicidade e genotoxicidade dos filmes de BN/Ag obtidos, a fim de direcioná-lo para aplicações biológicas;

No segundo âmbito do trabalho, o objetivo é desenvolver uma metodologia simples para a obtenção de filmes flexíveis fluorescentes, visto que esse é um dos desafios da área destes materiais; para tal se utilizará a borracha natural como matriz flexível e os pontos quânticos, obtidos em rota de síntese aquosa, como materiais fluorescentes; outro objetivo é a caracterização de tais filmes.

Capítulo 4 - Técnicas de Caracterização

Neste capítulo será apresentado um resumo sobre o funcionamento das técnicas de caracterização que foram empregadas neste trabalho a fim de conhecer o material estudado. As técnicas de caracterização físico-química são: Espectroscopia de Ultravioleta Visível (UV-Vis), Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia de Força Atômica (AFM); Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), e as técnicas para os estudos biológicos são: Ensaio de MTT, Ensaio do Cometa, Contato Direto e Adesão Celular .

4.1 Espectroscopia de Ultravioleta Visível (UV-Vis)

A técnica de medida de espectroscopia de UV-Vis se baseia no fenômeno de ressonância da banda plasmônica, para estudo de nanopartículas metálicas. O fenômeno consiste na incidência de uma onda eletromagnética, na região do visível, sobre uma nanopartícula metálica (tamanho variando entre 1-100nm) ocasionando oscilação em ressonância da nuvem eletrônica da nanopartícula [71]. A Figura 12 mostra a representação do fenômeno.

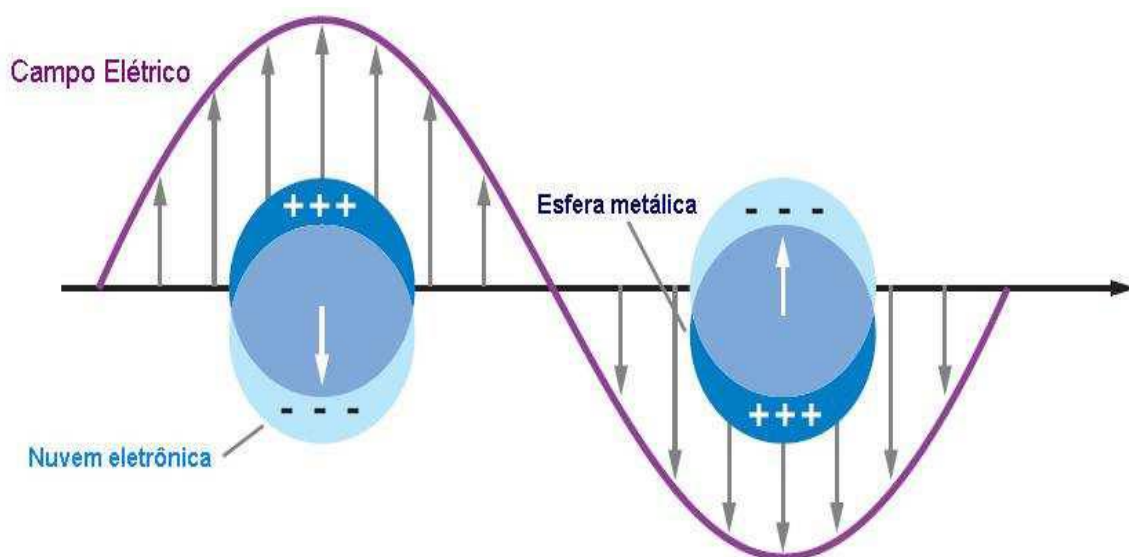


Figura 12 - Representação da oscilação da nuvem eletrônica da nanopartícula interagindo com um campo elétrico externo.

A espectroscopia UV-Vis utiliza fótons na faixa do ultravioleta próximo ($200 < \lambda < 380\text{--}400\text{ nm}$), do visível ($380 - 400\text{nm} < \lambda < 700 - 800\text{ nm}$), e do infravermelho próximo ($800\text{ nm} < \lambda < 3300\text{nm}$). Os fótons (nesta faixa de energia) interagem com as moléculas provocando transições eletrônicas moleculares [72], sendo essa técnica uma das mais importantes técnicas utilizadas para caracterizar a estrutura das nanopartículas metálicas. Uma vez que estruturas heterogêneas propiciam diferentes modos de vibraçõais, resultando assim em diferentes espectros de absorção (emissão de diferentes cores pelas nanopartículas).

O instrumento utilizado para análise de espectroscopia UV-Vis é o espectrofotômetro, que é composto por: uma fonte de radiação eletromagnética (luz), um conjunto de componentes ópticos que direcionam a radiação até a amostra, um compartimento onde é posicionada a amostra, que pode ser uma cela (amostras sólidas) ou uma cubeta (amostras líquidas), e um ou mais detectores capazes de medir a intensidade de radiação [72]. A onda eletromagnética que é emitida pelas lâmpadas, formada pelos elementos deutério e tungstênio-halogênio, é focalizada por meio de uma lente; este feixe passa então por um obturador para enfim chegar à amostra, fazendo com que esta interaja com todos os comprimentos de onda emitidos pelas lâmpadas.

Para realização da medida a amostra é colocada em uma cela, que não absorve no comprimento de onda utilizado, e com largura determinada, de geralmente 10 mm, sendo este distância pela qual o feixe atravessa a amostra e chamada de caminho óptico [72]. Na Figura 13 é possível observar um esquema geral do equipamento utilizado para realização da técnica de espectroscopia UV-Vis.

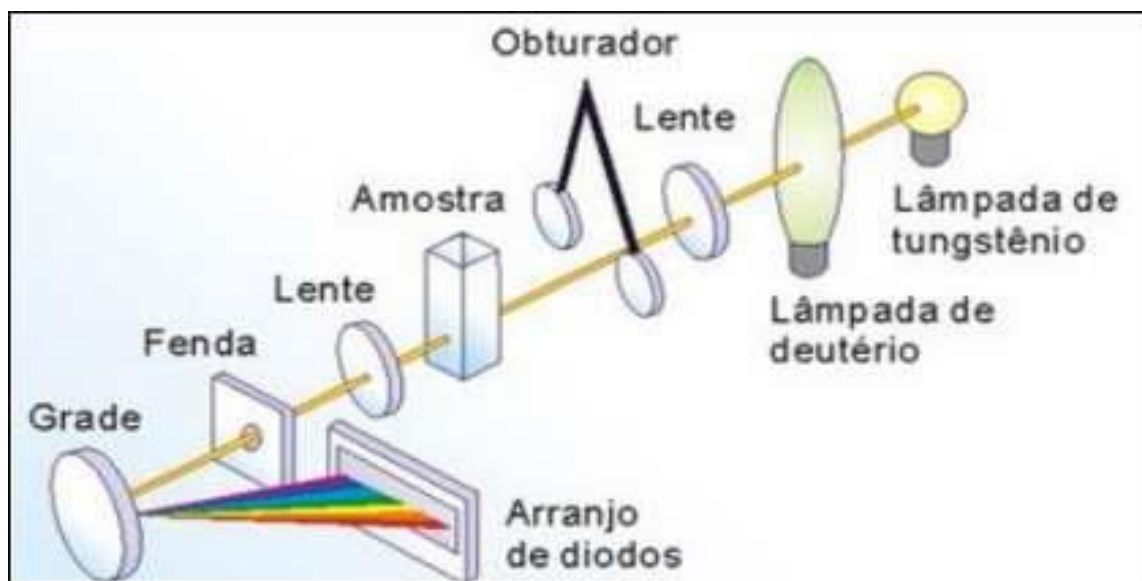


Figura 13 - Esquema geral de um espectrofotômetro.

Após atingir a amostra, parte da radiação incidente é absorvida por esta e o restante atinge uma lente que novamente focaliza a radiação que é transmitida para uma fenda onde atinge uma grade de difração. A grade de difração tem por objetivo difratar a radiação, espalhando-a em seus diferentes comprimentos de onda. A radiação atinge o sistema detector que é responsável pela conversão da intensidade de cada comprimento de onda em sinal elétrico que, enfim é interpretado como absorbância [7272].

A absorbância A é definida pela equação:

$$A = \log \frac{P_o}{P}$$

Figura 14 - Equação para a intensidade da absorbância.

Onde P_o é a intensidade da radiação do feixe incidente e P é a intensidade do feixe após interagir com a amostra. Assim a intensidade da absorbância se intensifica com a atenuação do feixe incidente, que é representado na Figura 15.

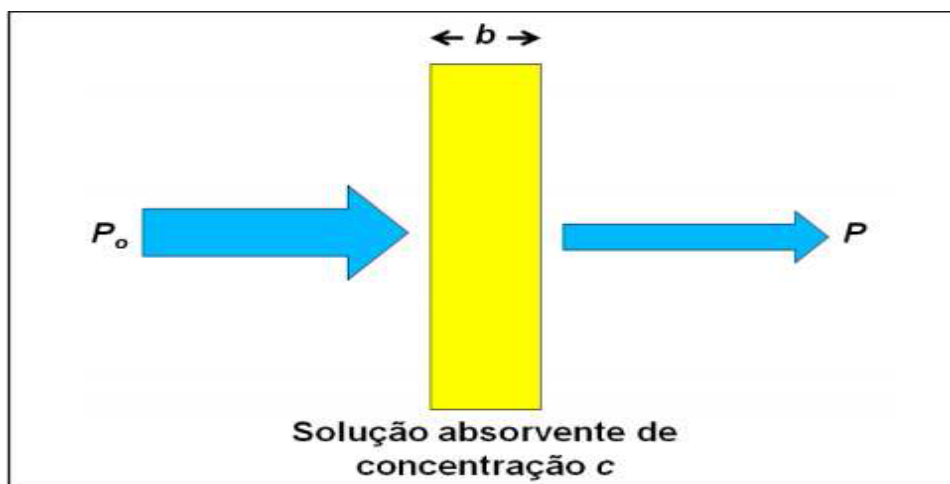


Figura 15 - Representação da atenuação do feixe incidente após interação com a amostra.

A intensidade da radiação também é dependente do caminho óptico seguido pelo feixe, ou seja, também é dependente da espessura da amostra. Segundo a Lei de Beer, a absorbância A é proporcional ao caminho óptico b através do meio, à concentração das espécies absorventes e ε , que é uma constante de proporcionalidade conhecida como absortividade molar ou coeficiente de extinção e que varia de acordo com a substância [72]. A Lei de Beer está representada na Figura 16.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c = \log \frac{P_0}{P}$$

Figura 16 - Equação da Lei de Beer.

Durante a interação do material, a ser analisado, com a radiação algumas frequências são removidas ou atenuadas pela absorção. A energia absorvida pela amostra é transferida para seus átomos, íons ou moléculas. Se forem comparados, os comprimentos de onda da radiação absorvida e as correspondentes cores do espectro é possível verificar que a cor da solução é corresponde às cores complementares do espectro absorvido [71,72].

Então com o auxílio dos espectros de absorção no UV-Vis pode-se encontrar parâmetros importantes sobre o material, como a banda de absorção óptica que é característica dos *plasmons* superficiais das nanopartículas metálicas, o valor máximo de

absorção óptica ($A_{\max}$), o comprimento de onda no máximo de absorção ($\lambda_{\max}$), e partir dos valores desses parâmetros se pode obter informações sobre coloides estudados como tamanho, geometria etc.

4.2 Espectroscopia de Infra Vermelho (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica largamente utilizada na análise de materiais e estuda a interação destes com a radiação eletromagnética. Essa região do espectro eletromagnético possui elevada importância para os diversos campos da ciência, pois abrange estudos de moléculas orgânicas e compostos inorgânicos. A absorção de radiações eletromagnéticas por átomos e moléculas é quantizada e exige que haja um mecanismo de interação que permita a transferência de energia [73].

Os fótons associados a esta região do espectro apresentam energias que variam entre 1 a 15 kcal/mol e essa energia é suficiente para excitação eletrônica, porém induz excitação na forma de vibração nos átomos e grupos ligados covalentemente.

A faixa do espectro mais utilizada está compreendida entre o número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} e esse espectro, na região do infravermelho, é classicamente dividido em três regiões: o infravermelho próximo (próximo do visível) que compreende as frequências entre 4000 a 12820 cm^{-1} ; o infravermelho médio que varia de 400 a 4000 cm^{-1} , e o infravermelho distante que compreende a faixa entre 10 a 400 cm^{-1} [74].

A grande maioria dos estudos em infravermelho refere-se à região média, onde se localizam as frequências vibracionais fundamentais. As frequências vibracionais de uma molécula dependem da natureza do movimento, massa dos átomos, geometria da molécula, natureza das ligações químicas e ambiente químico/físico, sendo assim, a resposta obtida pelos espectros de infravermelho podem ser ditos como impressão digital de cada material. A Figura 17, adaptada de [75] mostra um quadro com as frequências na região do espectro de Infravermelho.

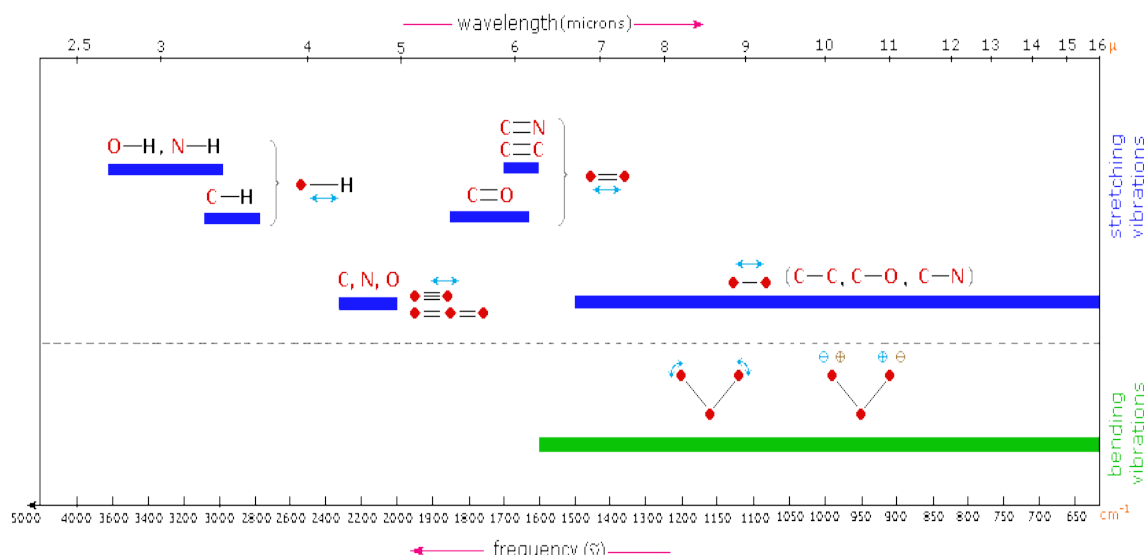


Figura 17 - Quadro de frequências na região do espectro de infravermelho. Fonte: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm> [75].

4.2.1 Espectroscopia de Infravermelho modo ATR

A espectroscopia de infravermelho no modo ATR é o estudo que se faz por reflexão atenuada e permite analisar as amostras como recebidas, ou seja, sem tratamento prévio, ou na forma de dispersões em matrizes que não as absorvem energia nessa região, tais como o KBr para análises qualitativas [73,74,75]. A Espectroscopia de Refletância Difusa por Transformada de Fourier apresenta vantagens, como:

- Análise de amostras sem preparação ou com mínima preparação prévia.
- Elevada sensibilidade.
- Habilidade de analisar a maioria dos materiais que não refletem, incluindo materiais de elevada opacidade ou materiais fracamente absorventes.
- Habilidade de analisar superfícies irregulares ou recobrimentos.
- Respeitável aplicabilidade para amostras muito grandes.

Ao atingir a amostra a radiação, na região do infravermelho, pode ocorrer dois processos, um deles é que a radiação sofre refletância especular, ou seja, a radiação reflete diretamente da superfície da amostra; e o outro é a refletância difusa, onde a radiação penetra

dentro da amostra e depois emerge dela [76] A amostra é normalmente granulada ou misturada a um material (KBr), que atua à maneira de uma matriz não absorvente. Por intermédio da diluição da mostra em uma matriz não absorvente, incrementa-se a proporção do feixe de infravermelho refletido de forma difusa pela amostra [77]

A Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier é uma instrumentação útil para o cálculo de variações de cristalinidade em amostras não homogêneas, onde uma elevada resolução espacial é requerida e é aplicada para análises qualitativas e quantitativas de compostos orgânicos e inorgânicos.

Aspectos qualitativos da espectroscopia por infravermelho são atributos significativos dessa técnica analítica que, possibilita o entendimento em termos de absorção fundamental de frequência, conhecido também como grupos de frequências, que são necessários à identificação da relação estrutura-espectro das vibrações moleculares associadas [75].

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que permite a obtenção de imagem ampliada e tridimensional da amostra a partir da interação de um feixe de elétrons com o material, desde que este não seja “transparente” aos elétrons. Esta técnica proporciona imagens com alta resolução e profundidade de campo, possibilitando aumentos de dezenas de milhares de vezes que são utilizadas em pesquisas das áreas biomédicas e de materiais [78].

Para a realização da técnica de MEV é necessário que se tenha um ambiente de vácuo para que os elétrons se desloquem na câmara, as amostras precisam sofrer um processo de desidratação quando necessário e fixadas de modo a suportar um ambiente de vácuo; amostras que não apresentam condutividade devem ser recobertas com ouro ou carbono para torná-las condutoras [78].

Para a formação da imagem, na microscopia eletrônica de varredura, é utilizada a maior quantidade dos sinais gerados pela interação entre o feixe de elétrons e o espécime,

promovendo uma grande riqueza de informações adicionais sobre os materiais. No MEV, um feixe de elétrons varre a superfície do espécime e são produzidos raios-x, elétrons retroespalhados e elétrons secundários que são detectados e analisados. A Figura 18 mostra um esquema ilustrativo da emissão de raios-x. Podem ser obtidos aumentos de até 200.000 vezes, com resoluções da ordem de alguns nanômetros e em geral possui efeitos destrutivos para a amostra [78].

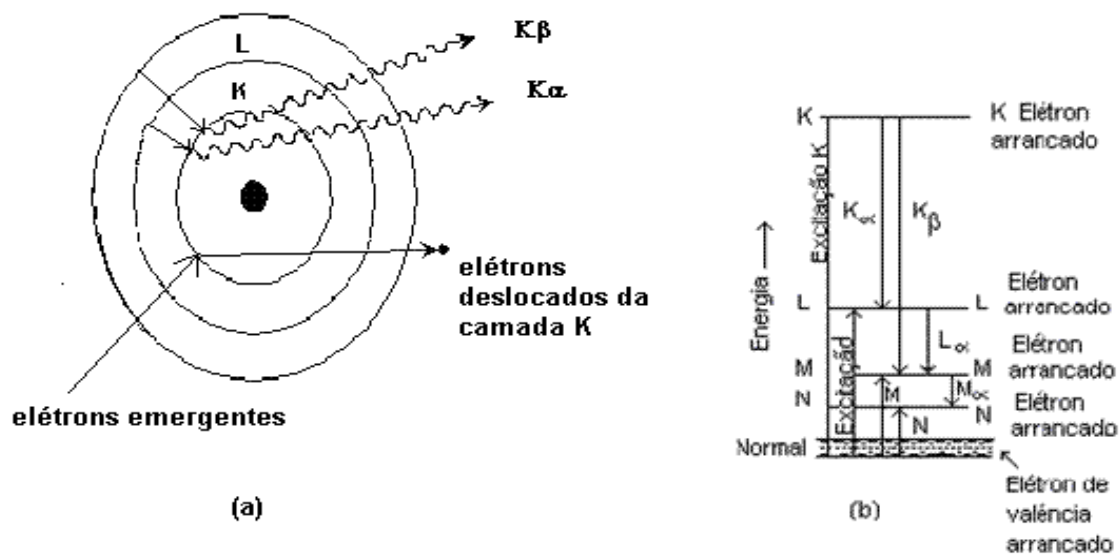


Figura 18 - Esquema ilustrativo da emissão de raios-X [78].

O princípio de funcionamento do equipamento de MEV é mostrado na Figura 15 e consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio mediante a aplicação de uma diferença de potencial.

Dentro da coluna de alto vácuo, os elétrons gerados a partir de um filamento de tungstênio, são acelerados por uma diferença de potencial. Este feixe gerado passa então por lentes condensadoras que reduzem o seu diâmetro e então passam por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. Acima da lente objetiva existem dois estágios de bobinas eletromagnéticas responsáveis pela varredura do feixe sobre a amostra, como mostrado na Figura 19.

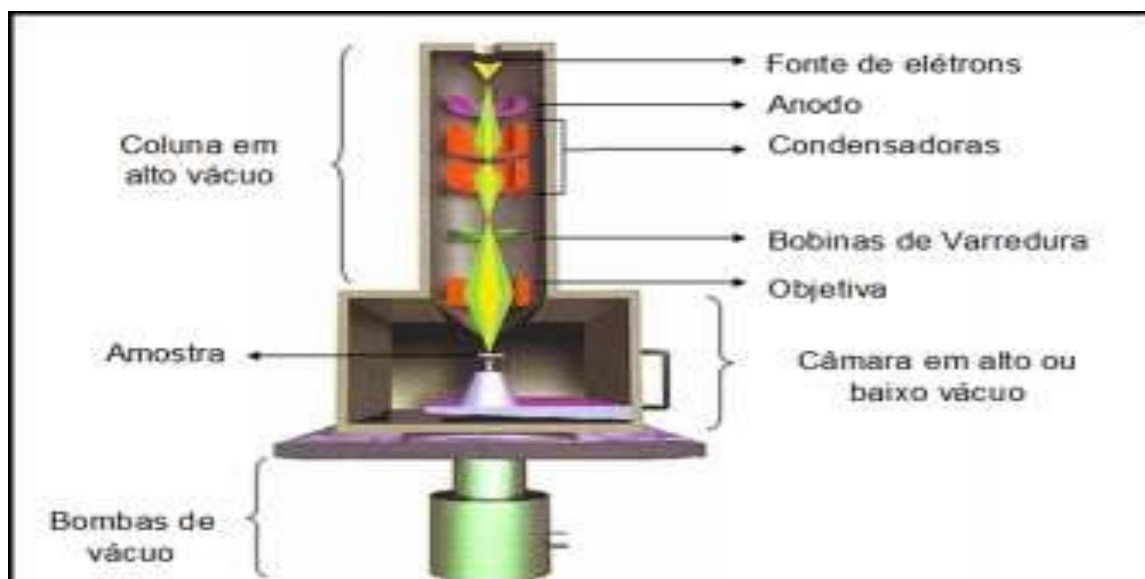


Figura 19 - Princípio de funcionamento do equipamento de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é utilizada para detectar mudanças físicas e/ou químicas, geradas pela transferência de energia térmica (calor) de cada material quando se faz uma comparação a um material utilizado como referência. Na Figura 20 é mostrado um esquema ilustrativo da parte referente ao forno de um equipamento utilizado para realizar análises de calorimetria exploratória diferencial, onde se observa as estruturas básicas que compõe o equipamento, como o forno, as marcações para a amostra e a referência, a entrada e saída de gases e a estrutura de aquecimento.

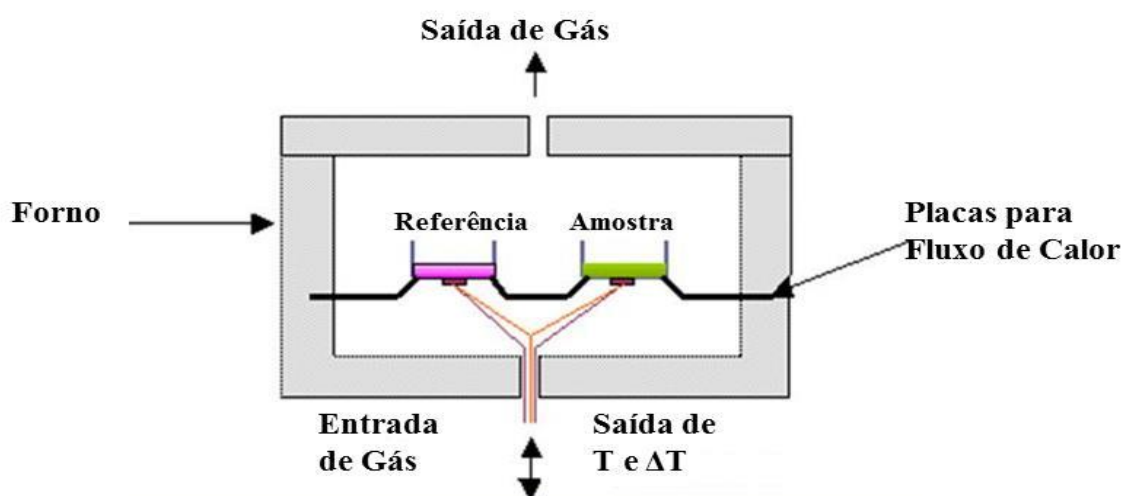


Figura 20 - Esquema Ilustrativo de um Equipamento de DSC.

As mudanças observadas, relacionadas ao tempo, podem determinar os processos sofridos pela amostra se houver mudança na capacidade calorífica, ou seja, com a absorção de energia pela amostra, tem-se um processo endotérmico, mas se ocorrer liberação de energia, então essa mudança na entalpia é denominada exotérmica.

Portanto, os dados obtidos através de técnica de DSC provem informações relacionadas com os efeitos térmicos característicos da mudança na entalpia de cada amostra em relação à faixa de temperatura analisada, como por exemplo, ponto de fusão, cristalização e reações químicas. Pode-se ainda verificar a capacidade calorífica da amostra em questão bem como o grau de cristalinidade, ou ainda as transições de fase, como por exemplo, a transição vítrea (T_g), a condutividade térmica, entre outros.

4.5 Testes de Citotoxicidade

A citotoxicidade do material obtido neste trabalho, as membranas de BN e BN/Ag, foi avaliada por duas vias, sendo essas por eluição onde se avaliou a atividade metabólica das células *in vitro*; e para avaliação dessa atividade foi empregado o Método de MTT que será apresentado a seguir.

4.5.1 *Método de MTT*

O método de redução do MTT [79] é um dos testes mais utilizados para determinar a citotoxicidade, de materiais das mais distintas naturezas às células cultivadas *in vitro* [55, 56, 57], este é um método colorimétrico quantitativo que avalia a atividade mitocondrial celular que se faz através da medição de cristais de formazan, cristais estes que são produto formado pela redução do sal de tetrazólio (3- (4,5 – dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide) ou MTT [80], e este ensaio é um indicativo se as células estão metabolicamente ativas ou não [81].

O sal de tetrazólio possui estrutura molecular em forma de anel, e sofre clivagem por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, originando os cristais de formazan que

são insolúveis em água e de coloração violeta. Para que seja possível a leitura do resultado, o formazan é dissolvido em um solvente específico, o dimetilsulfoxido (DMSO), e a leitura da intensidade de cor da solução pode ser feita em um leitor de microplacas com um filtro específico[80, 82].

A redução do MTT é realizada por todas as células vivas, metabolicamente ativas, porém as células que já estão mortas não tem a capacidade de reduzir o sal, então a quantidade de formazan gerado está diretamente ligada ao número de células viáveis sendo que as células ativas produzem maior quantidade formazan do que as células que estão vivas porém adormecidas [78, 7979, 82].

Para estudar a citotoxicidade de amostras sólidas para distintas culturas celulares podem ser utilizadas, entre outras, duas formas de avaliação: uma é a avaliação da citotoxicidade por eluição, onde o material estudado é colocado em contato com um líquido denominado veículo extrator que pode ser a água [56], por exemplo, e após o tempo pré - determinado de incubação a cultura celular é então exposta a este líquido; outra forma de avaliação da citotoxicidade é o contato direto do material com a cultura celular [56], onde uma amostra, com tamanho definido, é colocada diretamente em contato com a cultura celular estudada. Para ambos os testes se utiliza o método de MTT para avaliar o número de células viáveis após o período de interação seja com o líquido seja com o material na forma sólida.

4.5.2 Contato Direto

O teste de contato direto tem por objetivo avaliar, também, a citotoxicidade que certo material pode gerar para a linhagem celular estudada. Este teste permite a avaliação quantitativa e qualitativa da citotoxicidade através da análise morfológica das células que estiveram em contato direto com o material por tempos determinados [54].

4.5.3 Adesão Celular

O teste de adesão celular é um teste complementar no estudo da citotoxicidade de materiais que destinados à aplicações biológicas. Este teste permite a avaliação qualitativa da citotoxicidade através da confirmação do crescimento celular na superfície do material de interesse de aplicação [54].

4.6 Teste de Genotoxicidade

Possíveis danos ao material genético das células que podem ser causados por alguma substância liberada do material sólido ao veículo extrator durante o processamento de extrato líquido pode ser avaliado pelo Ensaio do Cometa versão alcalina [83]. Este ensaio é um método rápido de avaliação de danos ao DNA e consiste em expor as células ao extrato líquido, extrato este obtido utilizando o material de estudo e o veículo extrator determinado, e em seguida as células passam por um processo de lise, onde a membrana celular é rompida e se tem apenas o núcleo da célula onde está o conteúdo genético ao qual se quer estudar.

Para a realização de tal técnica não se faz necessário um número grande de células, o que simplifica o processo além de ser uma técnica que apresenta boa reprodutibilidade [84]. A versão alcalina, que foi a utilizada neste trabalho é possível observar as quebras de fita dupla de DNA assim como quebras de fita simples e sítios álcali-lábeis [84].

De acordo com Kobayashi et al. [85], os danos no DNA serão classificadas visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes[85, 86]: classe 0: nucleóide sem cauda com poucos fragmentos ao redor; classe 1: uma pequena cauda menor que o diâmetro do núcleo; classe 2: um comprimento de cauda de 1 a 2 vezes maior que o diâmetro do núcleo; classe 3: um comprimento da cauda duas vezes maior que o diâmetro do núcleo; a classificação das classes de danos ao DNA e as condições de avaliação são mostradas na Tabela I.

Tabela I - Classificação dos Danos ao DNA. [85]

<i>Classes</i>	<i>Tamanho da Cauda Observada</i>
Zero	sem cauda
Um	cauda menor que o diâmetro do núcleo
Dois	cauda 1 a 2 vezes maior que o diâmetro do núcleo
Três	cauda 2 vezes maior que o diâmetro do núcleo

Capítulo 5 - Materiais e Métodos

Neste item são apresentados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Destacam-se o látex, membrana de borracha natural, solução de nitrato de prata, redução das nanopartículas de prata na presença da membrana de borracha natural, os testes de caracterização física e química do material e os testes biológicos.

5.1 Obtenção do Látex

O látex utilizado neste trabalho foi coletado de diferentes árvores da espécie *Hevea brasiliensis* clone RRIM 600 na Fazenda Indiana na região de Presidente Prudente. O método de extração do látex é conhecido como sangria e é exercido sobre o caule da árvore a uma altura de 1,2 m a partir do solo, para isso é utilizado uma ferramenta cortante que possui a forma de U, e o corte se dá em um ângulo de 30° com a horizontal e atinge cerca de metade da circunferência do tronco; deste corte é removido por volta de 1,5 mm de córtex da árvore para cada incisão, permitindo então a vazão da seiva. A Figura 21 mostra uma imagem do processo de sangria durante a coleta do látex realizado no seringal da Fazenda Indiana.

Após a coleta o látex é estabilizado em amônia, sendo a proporção do estabilizante dada por 2% sobre o volume do látex líquido [19], e armazenado em recipientes de vidro âmbar, evitando assim que o material interaja com a luz solar, prevenindo então a degradação prematura do material, a fim de mantê-lo líquido por mais tempo. O látex coletado é mantido sob refrigeração, o que auxilia no atraso do processo de coagulação do mesmo[17].



Figura 21 - Imagem mostrando o processo de sangria para a coleta de látex. Local: Fazenda Indiana.

5.2 Membrana de Borracha Natural

As amostras sólidas utilizadas foram obtidas utilizando a técnica de *casting*, depositando-se 10 mL de látex em placas de Petri, de 9,5 cm de diâmetro interno e fundo reto. Em seguida, as placas contendo o látex foram levadas a estufa com circulação de ar forçado, para o processo de secagem e obtenção do material sólido que é intitulado filme de borracha natural. A espessura desses filmes pode ser controlada controlando o volume da fase líquida, o látex, que é depositado nas placas de Petri, sendo que as membranas obtidas neste trabalho apresentam espessura de aproximadamente 0,5 mm; após o processo de secagem também é possível determinar as dimensões do material;

Na Figura 22(a) é possível observar a imagem do látex na placa de Petri antes de ser levada a estufa para o processo de secagem e na Figura 22(b) se observa a imagem do material seco e retirado do substrato.

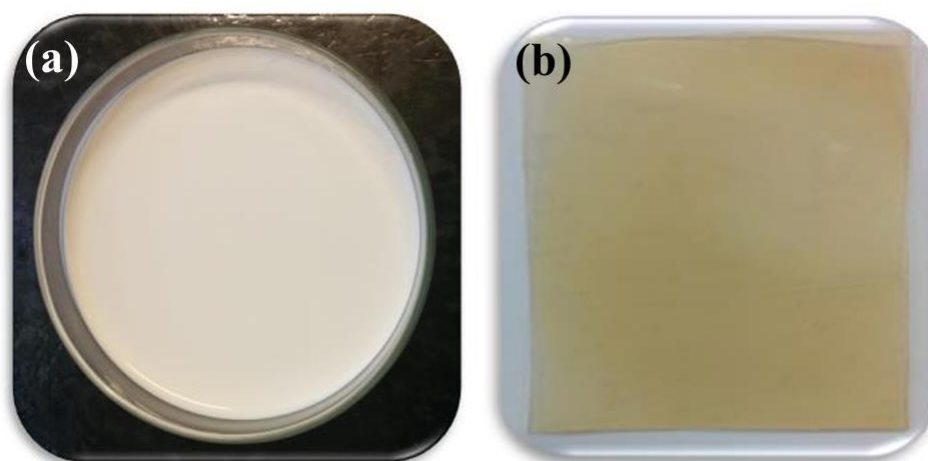


Figura 22 - Látex em placa de Petri antes e depois do processo de secagem.

O processo de secagem foi realizado utilizando uma estufa, modelo 520, da marca FANEM® com circulação de ar forçado a temperatura de 65°C, o tempo de secagem foi de 10 horas. Após este processo se obtém um filme com coloração levemente amarelada, como se pode observar na Figura 22(b), após a secagem o filme foi retirada da placa de Petri com a ajuda de uma pinça e armazenada em um filme plástico para futura utilização.

Para o processo de síntese essas membranas foram modeladas com o auxílio de uma tesoura, para que tivessem uma área de 30cm² (6 cm x 5cm), essa medida foi estipulada com base na norma ASTM F619/14 [56] utilizada para realização dos testes biológicos.

5.3 Solução de Nitrato de Prata

O sal de nitrato de prata (ACS reagent, ≥99.0%) empregado no estudo foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich e utilizado como recebido.

A solução de AgNO₃ utilizada neste trabalho foi obtida diluindo o sal de AgNO₃ em água nanopura para a obtenção da solução estoque com concentração de 2,6x10⁻⁴M. A solução de trabalho foi obtida por diluições sucessivas a partir da solução estoque, chegando à concentração de 3x10⁻⁵M.

5.4 Processo de Síntese e Obtenção das Membranas de BN/Ag

Para o processo de síntese foi utilizado um volume de 100 mL de solução de AgNO_3 na concentração de $3 \times 10^{-5} \text{M}$ para se obter cada membrana, ou seja, os filmes de BN/Ag foram obtidos individualmente, assim o único parâmetro variável é o tempo de imersão do mesmo na solução.

A solução para a imersão de cada filme foi aquecida até a temperatura de 80°C e mantida assim até o término dos tempos de síntese; após atingir essa temperatura os filmes de BN pura foram submersos nessa solução e mantidos por diferentes tempos, sendo estes, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 120 minutos. Esses filmes foram denominados BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120', respectivamente. Os béqueres utilizados para a síntese foram envolvidos com folhas de papel alumínio para evitar a exposição à luz ambiente, pois a prata é um metal fotossensível.

Findado o tempo de imersão os filmes foram retiradas da solução e levadas a um dessecador de vidro a vácuo para a completa secagem dos mesmos, na Figura 23 é mostrado uma imagem das membranas de BN pura, BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag 120'. É possível notar que uma mudança na coloração da membrana sendo que as membranas de BN/Ag apresentam coloração amarela mais intensa em comparação com a membrana de BN pura, sendo este o primeiro indicativo da presença da AgNPs na membrana [28, 87].

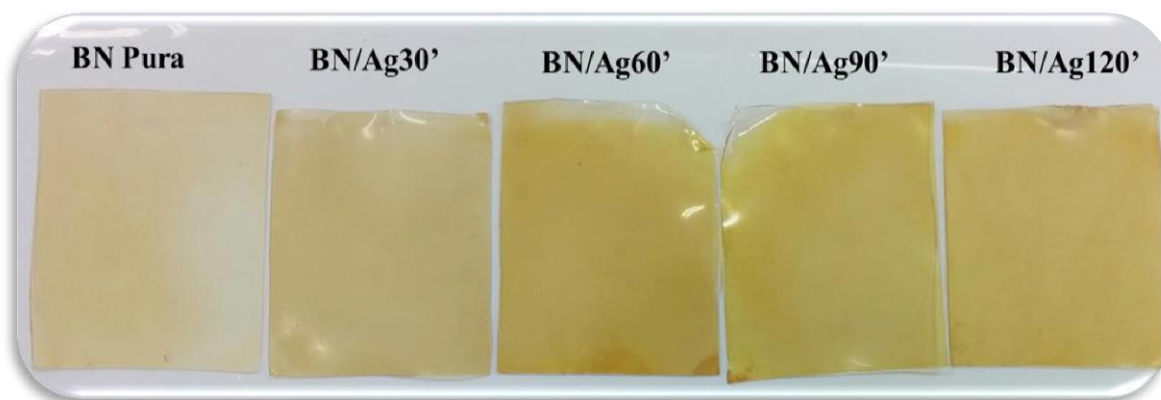


Figura 23 - Membranas de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

5.5 Espectroscopia de Ultra Violeta Visível

A incorporação das AgNPs na estrutura da BN foi acompanhada por espectroscopia UV-Vis utilizando o equipamento SHIMADZU UV-Visible Spectrophotometer; modelo UV-1800 com intervalo de análise de 300 nm a 800 nm.

5.6 Espectroscopia de Infravermelho modo ATR

A espectroscopia de infravermelho modo espectral (ATR) foi realizada utilizando um espectrômetro da marca Bruker modelo alpha – ATR FT-IR com faixa de análise entre 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} .

5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a análise superficial e elementar das amostras foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de alta resolução FEI Quanta 200 FEG/EDAX acoplado com espectrômetro de energia dispersiva (EDS) e detector de Raios γ . As medidas foram realizadas no Instituto de Pesquisa dos Grandes Lagos “Great Lakes Institute Environmental Research (GLIER)” na Universidade de Windsor, Canadá.

5.8 Microscopia de Força Atômica

As imagens obtidas por microscopia de força atômica foram realizadas utilizando um microscópio da Digital Instruments NanoScope IV, operando no modo *tapping* com ponta de silício (Al-coated silicon tip model TESPA, Bruker), com alta resolução (512 linhas por varredura) com frequência de varredura de 0.5 Hz. As imagens obtidas foram processadas com o auxílio do *software* de análise de dados Gwyddion 2.30 Free Edition.

5.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada utilizando o equipamento da marca NETZCH modelo Phoenix 204, tendo as seguintes condições experimentais: razão de aquecimento de 10°C/min na faixa de -100°C a 600°C, em atmosfera

de nitrogênio com fluxo de 25 mL/min e quantidade de massa utilizada de aproximadamente 5 mg.

5.10 Linhagem Celular

Todas as linhagens celulares utilizadas neste estudo foram adquiridas através de uma parceria com a Dr. Dalita Gomes Silva Morais Cavalcante que desenvolve um projeto de Pós-Doutorado vinculado ao grupo orientado pelo Prof. Dr. Aldo E. Job.

As células utilizadas para os testes realizados neste trabalho foi a CCD 1059 sk (fibroblasto humano normal) e a CHO K1 (fibroblasto de ovário de ramister). As linhagens celulares foram escolhidas para ser usada nos testes por simular *in vitro* o contato das membranas testadas com um tipo celular da pele humana, no caso da CCD 1059 sk e as CHO K1 por apresentarem rápida divisão celular, a cada 12 horas. As referidas linhagens foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro) e seus códigos no catálogo são BCRJ 0061 e BCRJ 0069 respectivamente.

5.11 Teste de Citotoxicidade

Os testes neste item apresentado foram realizados em trabalho conjunto com a pesquisadora Dr. Dalita G. S. M. Cavalcante, que é a responsável por essa parte em nosso grupo.

A atividade metabólica das células pode ser avaliada utilizando-se três distintos testes: o teste por eluição, o teste por contato direto e o teste por difusão em ágar. Para essa fase do trabalho foram utilizados os testes por eluição. Os itens subsequentes trazem a metodologia empregada para a realização de tais testes.

5.11.1 Obtenção do extrato líquido (EL)

Os testes de citotoxicidade *in vitro* por eluição foram realizados baseados nas normas ASTM F619/14 [56] norma essa padrão para testes para avaliação da citotoxicidade de

materiais plásticos para aplicação médica, que traz métodos padronizados para a obtenção de extratos líquidos que são utilizados na avaliação de citotoxicidade pelo método de eluição.

Esta norma indica que para amostras em que se pode ter controle da geometria, que é o caso do nosso material, com espessura igual ou menor que 0.50 mm, estas devem ter área total de 60 cm² para a obtenção extrato líquido fazendo uso de 20 mL de meio extrator [56]. Como as amostras obtidas neste trabalho não nos permitiu obter uma área total igual ao estipulado na norma, realizou-se uma adaptação da mesma em relação às proporções dos materiais.

Então para a obtenção do EL foi adicionado 10 mL de água destilada em cada placa de Petri de vidro, placas estas com fundo reto de 9,5 cm de diâmetro, em seguida uma membrana de BN ou BN/Ag, com dimensões descritas no Item 4.2, foi colocada sobre o volume de água presente na placa, a placa foi vedada com filme de PVC e levada à estufa a temperatura de 37°C e assim mantida por 24 horas; transcorrido este tempo o líquido foi retirado da placa e transferido para um recipiente limpo e o pH. fixado em 7.4, que é o pH aproximado do meio celular; para cada amostra foi obtido, em média, 8 mL de EL.

5.11.2 Ensaio MTT

A avaliação da citotoxicidade dos extratos líquidos (EL) e contato direto para as amostras de BN pura e BN/Ag foi avaliado pelo método de redução do MTT (brometo de 3-4,5- dimetiltiazol-2-il-2,5- difeniltetrazólio) [69, 70, 71]. Para tanto, as células CCD 1059 e CHO K1 foram semeadas em uma densidade de $1,2 \times 10^5$ células por poço, em placa de 24 poços transparente. Após 48 h de estabilização em estufa com CO₂ a 37° C, as células foram colocadas em contato com os distintos extratos e incubadas por 24 h. O volume total de líquido em cada poço da placa foi de 400µl, sendo 200µl de meio de cultura e 200µl de EL. Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e adicionado o MTT diluído em água; as células foram novamente incubadas por mais 4 h e após esse tempo o processo de

retirada do sobrenadante se repete e se adicionada DMSO para a precipitação do cristal de formazan. A absorbância correspondente a cada amostra foi determinada em leitora de microplaca a 492 nm. A absorbância obtida para as células do CTR será considerada como 100% de viabilidade celular (VC). Para confiabilidade dos resultados, foram feitas 2 réplicas (em períodos diferentes) de cada uma das condições experimentais, sendo que em cada condição experimental serão feitas 4 repetições. Na Figura 24 se tem um esquema ilustrativo da realização do ensaio de MTT.

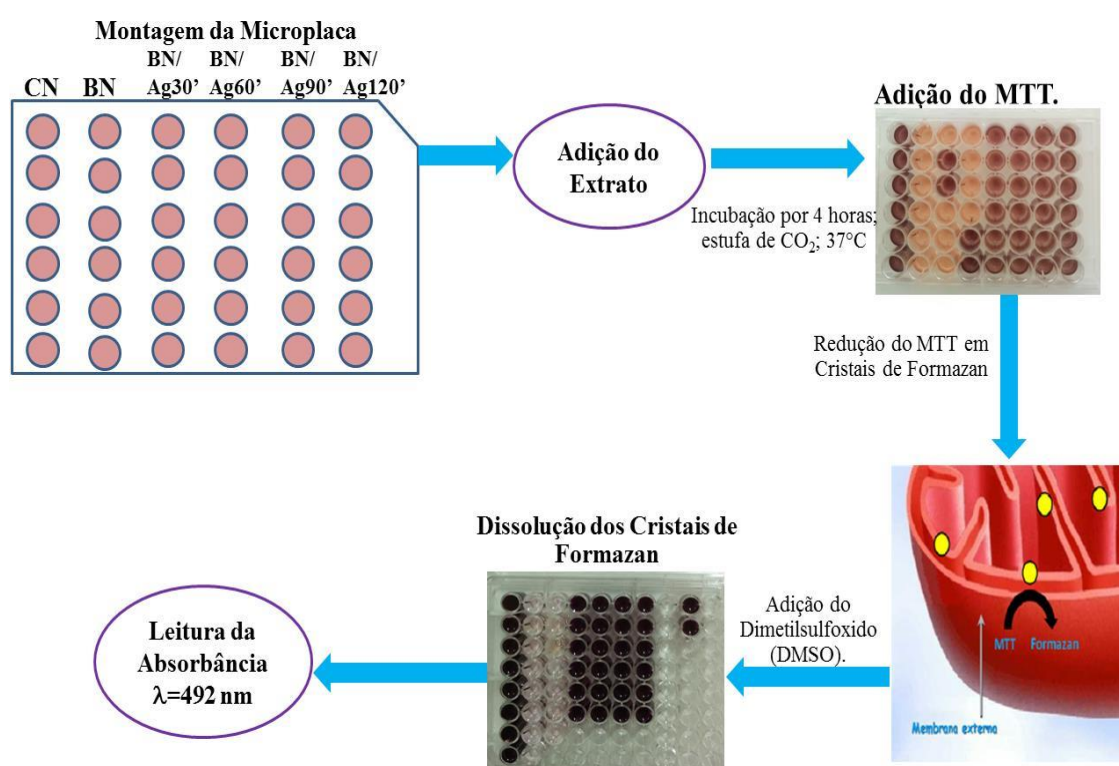


Figura 24 - Esquema do teste de MTT.

A VC das outras amostras será determinada pela seguinte equação:

$$VC_{EL} = [(Abs_{EL} - Abs_{Br}) / (Abs_{CTR} - Abs_{Br})] \times 100.$$

Equação 1 - Viabilidade Celular.

Onde:

VC_{EL} = Viabilidade Celular das células expostas ao extrato líquido

Abs_{AF} = Absorbância encontrada para as células expostas a EL

Abs_{CTR} = Absorbância encontrada para as células do controle negativo

Abs_{Br} = Absorbância encontrada para o branco (poço apenas com meio de cultura)

A partir dos resultados obtidos para a viabilidade celular de cada extrato se pode avaliar se os filmes são ou não citotóxicas para a linhagem celular. Serão considerados citotóxicos, os extratos que reduzirem a viabilidade celular em 30% ou mais em relação ao CTR (ISO 10993-5/2009 - Avaliação biológica dos dispositivos médicos - Parte 5: Ensaios de citotoxicidade in vitro).

5.11.3 Contato Direto

Amostras de BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120' foram cortadas em formato quadrangular de 1cm x 1cm e colocadas no centro dos poços da placa de cultura de 24 poços. Fragmentos de papel filtro foram utilizados como controle negativo. Em seguida $2,5 \times 10^5$ células misturados em meio de cultura e PBS (1:1) foram distribuídos nos poços de cultura, e incubadas a 37°C por 24 horas para a formação da monocamada celular. Após o tempo de exposição, as placas foram coradas com violeta de genciana 1%.

As análises de citotoxicidade foram feitas baseadas em observações macroscópicas, onde foi levado em consideração o tamanho do halo formado ao redor dos filmes, que foi medido com o auxílio de um paquímetro. Entende-se por halo a região clara, que não foi corada pelo violeta de genciana, no limite entre as células e o material testado e que indica lise celular.

O grau de citotoxicidade dos filmes de BN/Ag foi baseado no tamanho do halo seguindo a tabela II. Observações microscópicas dos frascos também serão levadas em consideração, seguindo a tabela III como padrão para a classificação do grau de citotoxicidade; as Tabelas II e III trazem os dados de avaliação presentes na norma ISO 10993/2009. Essa norma também considera que um material apresenta efeito citotóxico, somente se estes forem classificados como grau superior a 2, com base nas tabelas II e III apresentadas.

Tabela II - Grau de citotoxicidade baseado no tamanho do halo observado macroscopicamente.

<i>Grau</i>	<i>Citotoxicidade</i>	<i>Tamanho do halo</i>
0	Nenhuma	Nenhum halo detectado
1	leve	Limitado à amostra
2	branda	Menor que 0,5 cm
3	Moderada	de 0,5 a 1 cm
4	Severa	Maior que 1 cm

Fonte: ISO 10993/2009

Tabela III - Grau de citotoxicidade baseado no nas condições observadas microscopicamente das células.

<i>Grau</i>	<i>Citotoxicidade</i>	<i>Condições da cultura</i>
0	Nenhuma	• Grânulos intracitoplasmáticos discretos • sem lise celular • sem redução de crescimento celular
1	Leve	• Não mais do que 20% das células estão redondas, frouxamente ligadas e sem grânulos intracitoplasmáticos • apresentam alterações na morfologia; • ocasionalmente células lisadas estão presentes • apenas ligeira inibição do crescimento observável.
2	Branda	• Não mais do que 50% das células estão redondas, desprovidas de grânulos intracitoplasmática • sem grande lise celular • não mais do que 50% de inibição de crescimento observável.
3	Moderada	• Não mais do que 70% das camadas de células estão arredondadas ou lisadas; • camadas de células não completamente destruídas • não mais de 50% de inibição do crescimento observável.
4	Severa	• Quase completa ou destruição completa das camadas de células

Fonte: ISO 10993/2009

5.11.4 Adesão Celular

Para os testes de adesão celular os filmes de BN e BN/Ag foram cortados da mesma maneira que para os testes de Contato direto apresentados no Item 5.11.3. Esses filmes foram colocados no fundo dos poços da placa de cultura de 24 poços. Fragmentos de papel filtro foram utilizados como controle negativo. Em seguida $2,5 \times 10^5$ células misturados em meio

de cultura e PBS (1:1) foram distribuídos nos poços de cultura, e incubadas a 37°C por 24 horas para a formação da monocamada celular sobre o material que está no fundo do poço.

Após o tempo de incubação as amostras foram submetidas a um processo de fixação das células sobre os filmes, esse processo é necessário para que se possa obter imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a confirmação da adesão das células sobre os filmes; o processo faz a desidratação controlada das células sobre o filme e o passo de imersão em tetraóxido de ósmio gera contraste que permite a obtenção das imagens de MEV. O processo de fixação será apresentado na forma de fluxograma na Figura 25.

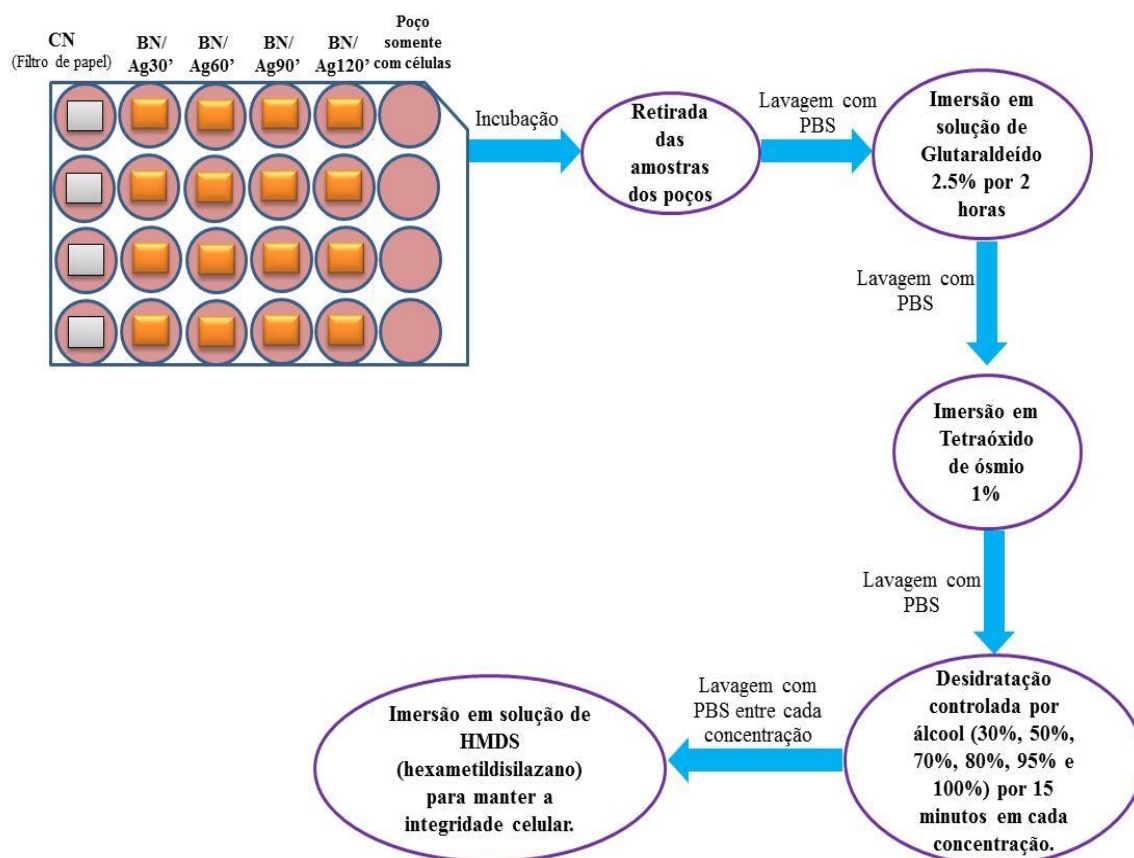


Figura 25 - Equema do processo de fixação das células sobre os filmes.

5.12 Teste de Genotoxicidade

Para realização do ensaio de genotoxicidade as células serão semeadas em frascos de 25 cm² na densidade de $1,0 \times 10^6$ células, e mantidas em estufa com CO₂ a 37°C por 48 h para estabilização das mesmas. Após o período de estabilização as placas com as células

serão incubadas por 24 h em estufa com CO₂ a 37°C apenas com meio de cultura, para o controle negativo (CTR) ou com meio de cultura mais extrato líquido feito com as diferentes membranas estudadas; para cada condição experimental serão utilizados seis frascos de células. Terminado o tempo de incubação foi descartado o meio contido nos frascos de cultura e a seguir os frascos serão lavados por duas vezes com 5 mL de PBS, para posteriormente ser adicionado 0,5 mL de tripsina (0,125%) que agirá por 4 minutos, e então foi adicionado 5 mL de meio novo com soro bovino fetal para anular o efeito da tripsina. O conteúdo foi homogeneizado com o auxílio do pipetador e colocado em tubos de centrifuga para centrifugação por 5 minutos a 106,4g, em seguida o sobrenadante é descartado, deixando-se apenas 0,5 mL de meio, que foi homogeneizado e usado para a confecção das lâminas do ensaio do cometa, seguindo o protocolo descrito por Singh et al. (1988) [83], com algumas modificações. Para isso, alíquotas de 20 µL de cada uma das amostras foram misturadas a 150 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) e a suspensão celular obtida desta mistura dividida sobre duas lâminas de vidro previamente cobertas com uma película de agarose normal 1,5%. Após serem cobertas com lamínula, a lâmina foi colocada no refrigerador por 30 min para permitir a completa solidificação da agarose com as células. Após a solidificação da agarose, a lamínula é removida e a lâmina foi colocada em uma solução de lise recém preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 h.

Após o período destinado ao processo de lise, a lâmina é alocada em uma cuba de eletroforese horizontal seguida de uma solução tampão recém preparada (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). A cuba é mantida resfriada, em banho de gelo, a uma temperatura média de 4°C por 30 minutos para estabilização da temperatura do sistema, sistema esse que deve ficar isolado da luz; em seguida a lâmina será exposta às condições de eletroforese que são: voltagem aplicada de 25 V, corrente elétrica de 300 mA por 20 minutos, a 4°C.

Finalizado o procedimento de eletroforese, a lâmina é coberta com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos. Este passo foi repetido por mais 2 vezes e após a terceira neutralização, a lâmina é disposta em posição inclinada em relação ao suporte para a secagem e fixada com etanol durante 10 minutos; essas lâminas podem ser estocadas sob refrigeração por, no máximo, 30 dias.

No momento da análise, as lâminas foram coradas corante DAPI (4-6-diamino-2-fenilindol) e a análise das lâminas realizada em microscópio de fluorescência com objetiva de 40X e filtro de excitação de 510-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm sendo que serão analisados 100 nucleóides por lâmina.

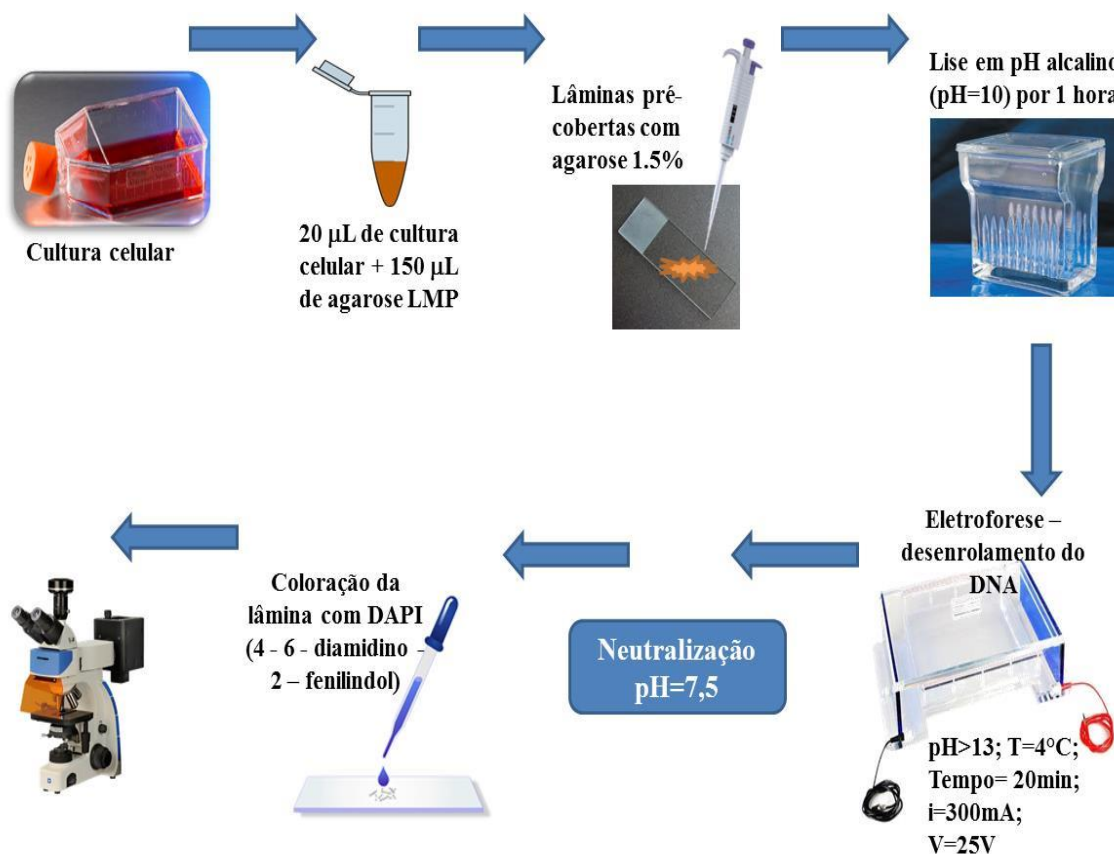


Figura 26 - Esquema ilustrativo do ensaio de cometa.

Para o cálculo do escore de dano, o número de núcleos contadas em cada classificação (0, 1, 2 ou 3) será multiplicado pelo valor numérico de cada classe e então o escore calculado pela equação:

$$\text{Score de Dano} = (0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D)$$

Equação 2 - Score de Dano ao DNA.

onde: A, B, C e D correspondem ao número de nucleóides em cada uma das classes respectivamente; a classificação para os núcleos é apresentada na Tabela 1 no Item 3.5. Sendo assim, o valor de escore pode variar de um mínimo de 0 e um valor máximo de 300.

5.13 Espectroscopia de Emissão Óptica acoplado a Plasma Induzido (ICP-OES)

A técnica de espectroscopia de emissão óptica acoplada a plasma induzido (ICP-OES) foi utilizada com a finalidade de análise do extrato líquido produzido utilizando as membranas de BN e BN/Ag como foi descrito no Item 5.11.1.

As análises dos E.L foram realizadas pela empresa Venturo Análises Ambientais situada na cidade de Araraquara – SP , para onde enviamos as amostras líquidas para serem analisadas; para a realização do procedimento foi seguido um protocolo de preparação das amostras onde essas foram submetidas à um processo de digestão ácida com ácido nítrico concentrado, para eliminação dos materiais orgânicos, e então foram analisadas em um espectrômetro da marca Perkin Elmer, Massachusetts/USA modelo Optima 8000 ICP-OES para identificação dos materiais inorgânicos presentes na amostra; o equipamento utilizado tem limite de detecção (LoD) de 0.029µg/mL com erro de 0.003 µg/mL.

5.14 Síntese dos QDs-CdTe

O processo de síntese para obtenção dos QDs utilizados neste tese foi realizada de acordo com o protocolo utilizado pelo Dr. Igor O. Osorio Roman [88, 89] com o qual trabalhei em parceria para a realização desta parte do trabalho, a metodologia está descrita a seguir.

5.14.1 Preparação da Solução Tampão de Citrato/Borax

Massar 572 mg de tetraborato de sódio (boráx) e 441 mg de citrato disódico.

Posteriormente, misturam-se ambos os reagentes em 80 mL de água nanopura e coloca-se em um sonificador por 2 minutos para dissolução de todos os sólidos.

O seguinte passo é ajustar o pH da solução tampão em função do estabilizante que se vai utilizar. Para isso, pode-se usar utilizar um pHmetro previamente calibrado ou fitas medidoras de pH. O ajuste do pH é realizado utilizando soluções de NaOH 1M e HCl 1M segundo o valor de pH desejado, para este trabalho o pH utilizado foi de 7.37. Uma vez ajustado o pH desejado, completa-se o volume da solução até 100 mL.

5.14.2 Síntese dos Pontos Quânticos de Telureto de Cádmio

Em um balão volumétrico previamente limpo, utilizando-se água régia para eliminar possíveis restos orgânicos, e seco, acrescentar 9.166 mg de Cádmio (1mM), 2.77 mg de Telurito de Sódio (0.25mM) e 22,52 mg de Ácido Mecaptosuccínico (3mM) em 50 mL de solução tampão de citrato/borax.

A solução é mantida em agitação a temperatura ambiente por 5 minutos ou até que todos os reativos agregados estejam completamente dissolvidos na solução tampão.

Mantendo a solução em agitação constante, adiciona-se 23 mg de borohidreto de sódio, mantendo assim por 5 minutos ou até que o agente redutor tenha se dissolvido por completo e não se observe mais a formação de bolhas na solução.

Transcorrido este tempo, a solução é colocada em um aparato de refluxo e sua temperatura elevada até 100°C, a reação segue transcorrendo por 8 horas. Durante esse período a solução apresentará lenta mudança na coloração que vai desde o verde, formação de sementes de *quantum dots* de CdTe, até vermelho, cor que se obtém após transcorrido as oito horas de síntese. A cada duas horas transcorridas de síntese foram coletadas 10 mL da solução, obtendo-se assim, soluções de diferentes colorações e QDs de diferentes tamanhos, sendo essas soluções enumeradas como 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Na Figura 27 é possível observar a imagem das soluções com e sem incidência de luz ultravioleta.

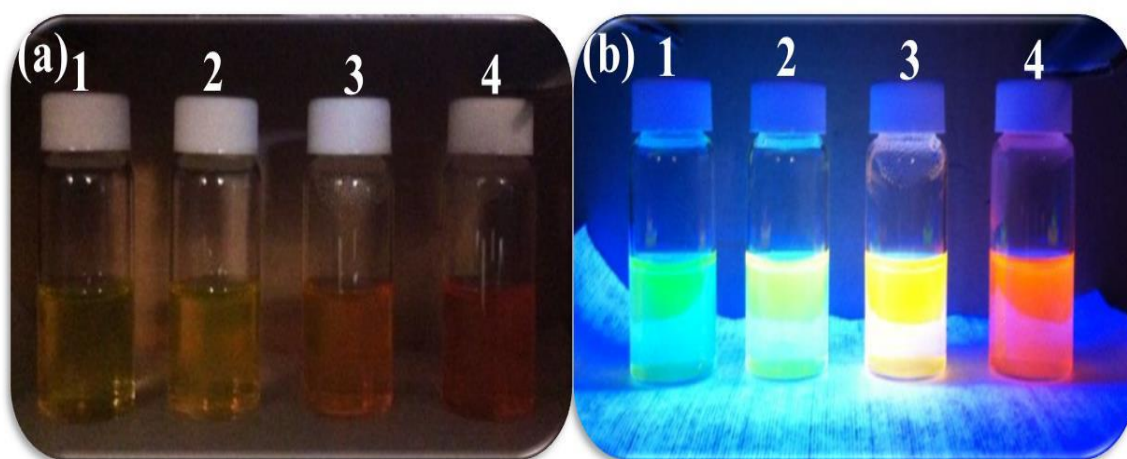


Figura 27 - Soluções de QDs-CaTe (a) sem incidência de luz UV; (b) com incidência de luz UV. As soluções estão dispostas em ordem crescente de tempo de síntese.

5.14.3 Concentração dos QDs-CdTe

Para obter uma solução concentrada de QDs-CdTe, misturou-se 3 mL da solução de QDs à 3 mL de etanol e em seguida essa mistura é centrifugada por 5 minutos para a precipitação das partículas sólidas. Em seguida é descartada a parte líquida e o precipitado é redissolvido em 1 mL de água ultrapura.

5.15 Preparação dos Filmes de Borracha Natural e QDs-CdTe

Os filmes fluorescentes de borracha natural com QDs (BN/QDs) foram preparados misturando-se 2 mL de látex com 1 mL de solução concentrada de QDs-CdTe, obtendo assim um volume total de solução de 3 mL. Esse volume foi transferido para uma placa de Petri plástica com dimensões de 60 x 15 mm e mantido ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 48 horas para a completa evaporação dos solventes. Foram produzidas diferentes filmes de acordo com as diferentes soluções de QDs, sendo estas nomeadas de acordo com a nomenclatura utilizada para as soluções de QDs, na Figura 26. Na imagem mostrada na Figura 28 mostra uma ilustração do processo de preparação dos filmes de BN/QDs.

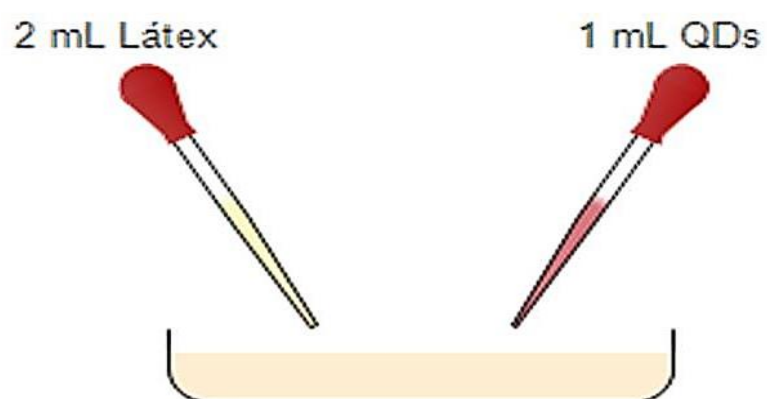


Figura 28 - Ilustração do processo de preparação do filme de BN/QDs.

Capítulo 6 - Resultados e Discussões

No capítulo 6 serão apresentados os resultados e discussões da caracterização dos materiais obtidos no decorrer do período de doutorado. O capítulo será dividido em Caracterização física e química e Estudo de Citotoxicidade e Genotoxicidade das membranas de BN e BN/Ag e em seguida serão apresentados os resultados da caracterização dos filmes de BN/QDs.

6.1 Caracterização das membranas de BN/Ag

Neste item serão apresentados os resultados da caracterização física e química das fabricadas no trabalho utilizando as técnicas de Espectroscopia de Ultravioleta-Visível, Espectroscopia de Infravermelho modo ATR, Microscopia Eletrônica de Varredura e Análise Elementar por Raios-X e Microscopia de Força Atômica e análise do extrato líquido por ICP-OES.

6.1.1 Espectroscopia de Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Neste item são apresentados os resultados obtidos utilizando a técnica de caracterização de espectroscopia de Ultravioleta Visível para as membranas de BN/Ag nos diferentes tempos de imersão.

Nos espectros apresentado na Figura 29 é possível observar a presença de uma banda por volta do comprimento de onda 430 nm, essa banda é denominada banda *plasmon*, característica para nanopartículas metálicas. O comprimento de onda, no qual essa banda está centrada, é característica das AgNPs [90, 91] e a forma simétrica apresentada por esta banda plasmon é um indicativo de baixa dispersão de tamanho de nanopartículas formadas durante o processo de redução [90]. Ainda na Figura 29 é possível observar um *in set*, demonstrando a relação entre o tempo de imersão da membrana na solução de nitrato de prata e os valores máximos de absorção.

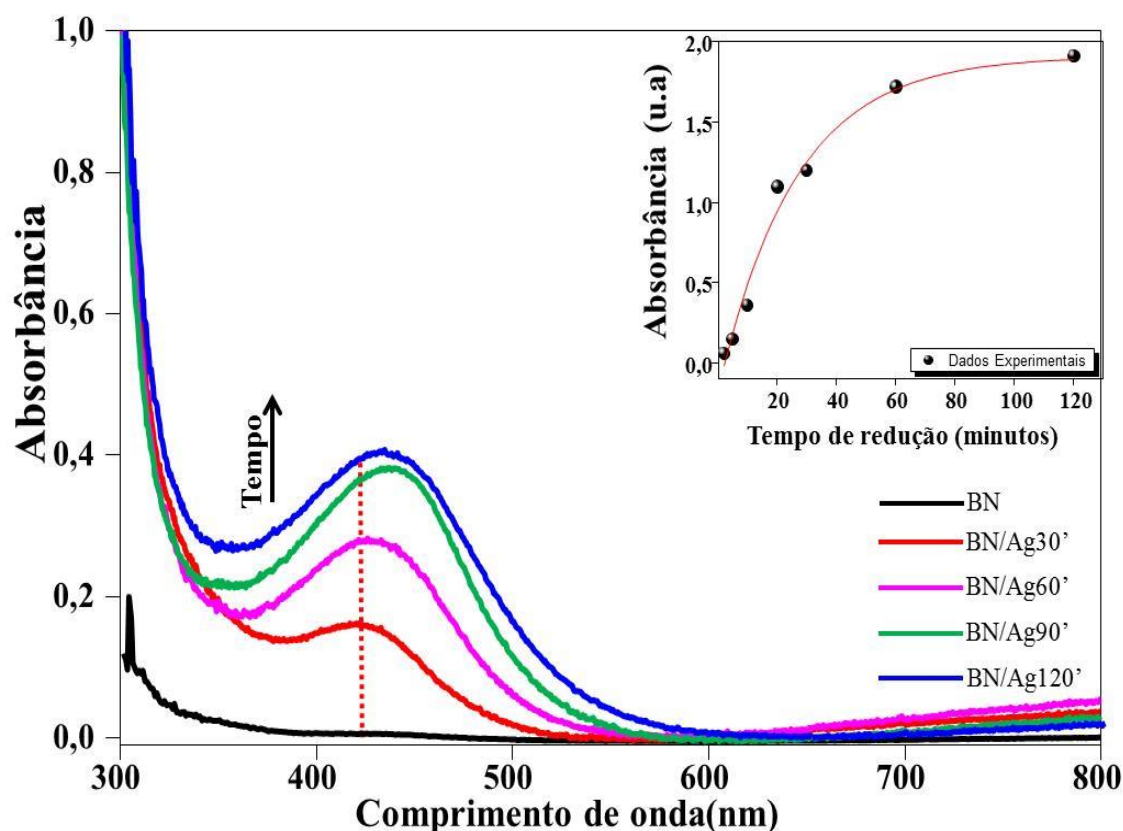


Figura 29 - Espectros de UV-Vis para os filmes de borracha natural e prata.

É possível observar que os valores máximos de absorção das bandas variam para maiores comprimentos de onda, para a membrana BN/Ag30', que é a membrana que ficou submersa na solução de AgNO_3 durante o tempo de 30 minutos, o máximo de absorção está em 424 nm, para a BN/Ag60' o máximo de absorção é de 426 nm, para a BN/Ag90' o máximo está em 436 nm e para a BN/Ag120' o máximo aparecem em 432 nm. Isso é um indicativo do crescimento do tamanho da partícula na estrutura da membrana de BN [91].

6.1.2 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) modo ATR

Como apresentado no Item 4.2, a espectroscopia de Infravermelho permite a caracterização de grupos funcionais presentes nos materiais. Assim, para o estudo apresentado, essa técnica permitiu observar a diminuição e o aumento de certas bandas.

Na Figura 30 está representado o estudo feito utilizando espectroscopia FT-IR/ATR para as membranas de BN pura e BN/Ag nos tempo de redução 30, 60 e 120 minutos

respectivamente.

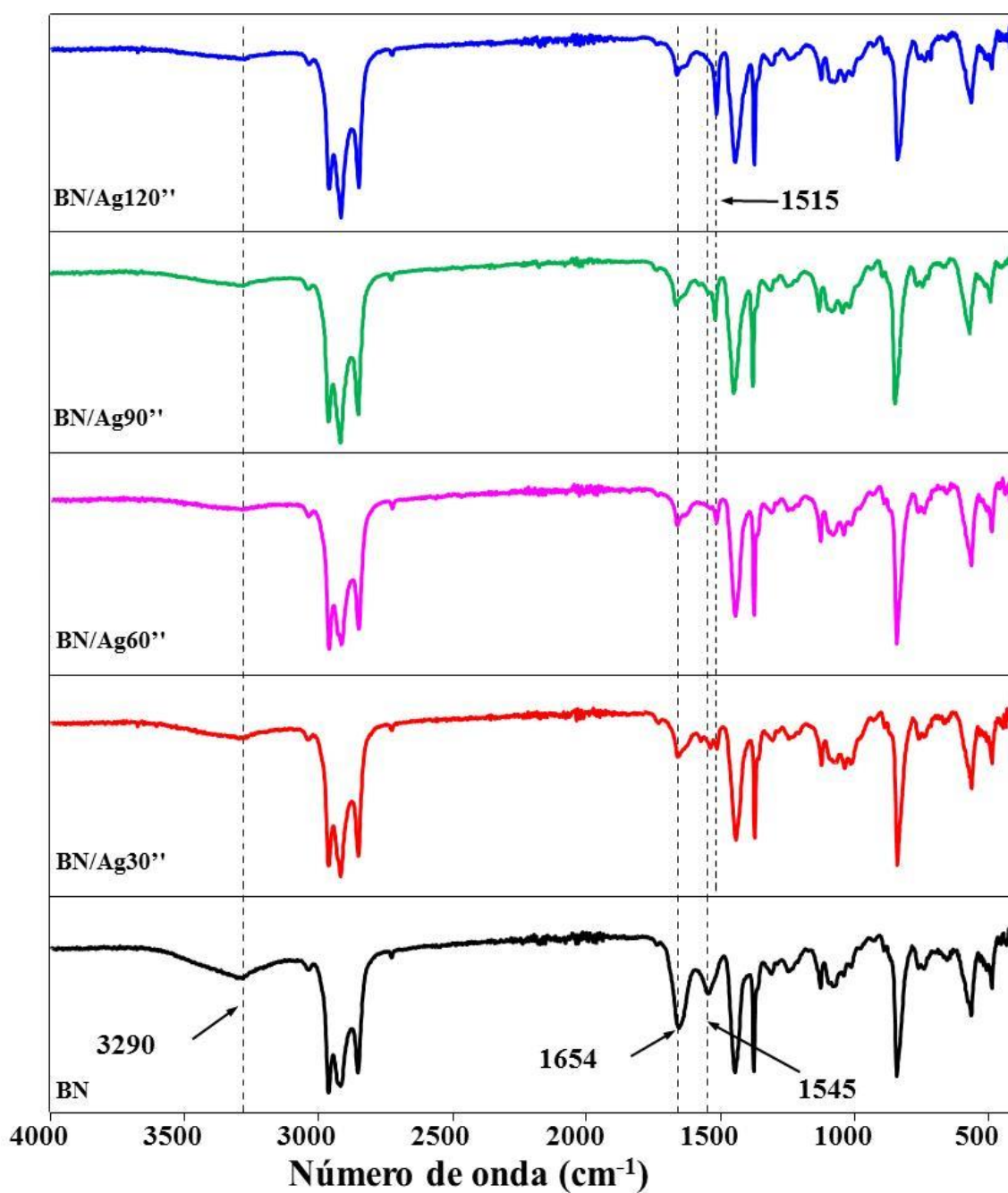


Figura 30 - Espectros de FT-IR para os filmes de borracha natural pura e com nanopartículas de prata nos diferentes tempos de redução.

No gráfico mostrado na Figura 30 observa-se a presença de bandas associadas tanto ao isopreno [14] como a outros componentes presentes no látex, como proteínas e lipídios [92, 93]. De acordo com o resultado obtido as bandas de maior interesse para o trabalho são: 3300 cm^{-1} a 3030 cm^{-1} , associada ao estiramento C-H, N-H e O-H respectivamente; 2960 cm^{-1}

¹ a 2850 cm⁻¹, associadas á lipídios e ligação C-H da cadeia do isopreno; 1660 cm⁻¹ a 1650 cm⁻¹, associadas ao estiramento C=O presente na Amida I, fração proteica da membrana; 1515 cm⁻¹, associado á amina secundária (-R₂N-H); 1445 cm⁻¹ a 1038 cm⁻¹, associada a Amida III (proteína), e flexão no plano e fora do plano do isopreno; 1040 cm⁻¹ a 1038 cm⁻¹, associada ao estiramento C-N e C-O; 890 cm⁻¹ a 840 cm⁻¹, associada ao C=C-H da cadeia isoprenica; e de 760 cm⁻¹ a 739 cm⁻¹, associado a Amida III (proteínas) e esqueleto do isopreno; finalmente as bandas que aparecem entre 740 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹ correspondem à uma mescla de frequências associadas á isopreno, proteínas e lipídios. O resumo desta assignação é apresentado na Tabela IV.

Tabela IV - Assignação para os filmes de BN e BN/Ag.

<i>BN Pura</i>	<i>BN/Ag 30'</i>	<i>BN/Ag 60'</i>	<i>BN/Ag 120'</i>	<i>Assignação</i>
3290	3287	3286	3283	ν N-H Amida; O-H estiramento
3036	3036	3038	3033	=C-H estiramento
2960	2960	2961	2960	ν _{as} CH do CH ₃ ; ν _s CH do CH ₃ ; ν _s CH ₂
2915	2916	2914	2916	
2852	2850	2851	2849	
2724	2725	2726	2725	
1654	1662	1663	1662	ν C=O (Amida I)
1545	1543	-	-	(Amida II)
-	1517	1516	1515	-R ₂ N-H (Amina secundária)
1445	1444	1446	1446	Amida III, δ CH ₂ , δ- CH ₃
1375	1374	1375	1375	
1309	1308	1308	1308	
1245	1247	1247	1246	
1125	1125	1126	1126	
1038	1040	1038	1039	
	890	889	891	ν C-N/C-O
				δ C=C-H
841	842	843	841	δ C=C-H
760	762	763	762	Amide III (N-H , C=O γ _w), esqueleto do isopreno
740	742	740	739	

ν, vibração estiramento ; ν_s, estiramento simétrico; ν_{as}, estiramento assimétrico ; δ, flexão no plano; δ_{as}, flexão fora do plano; γ_w, wagging vibration .

Ao realizar uma análise cuidadosa do espectro de infravermelho mostrado na Figura 30 foi possível notar mudanças na intensidade de algumas bandas, essas mudanças aparecem

de forma evidente nas regiões de 4000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} e entre 1600 cm^{-1} a 800 cm^{-1} . Nas Figuras 31 e 32 mostramos um aumento do espectro dessas regiões.

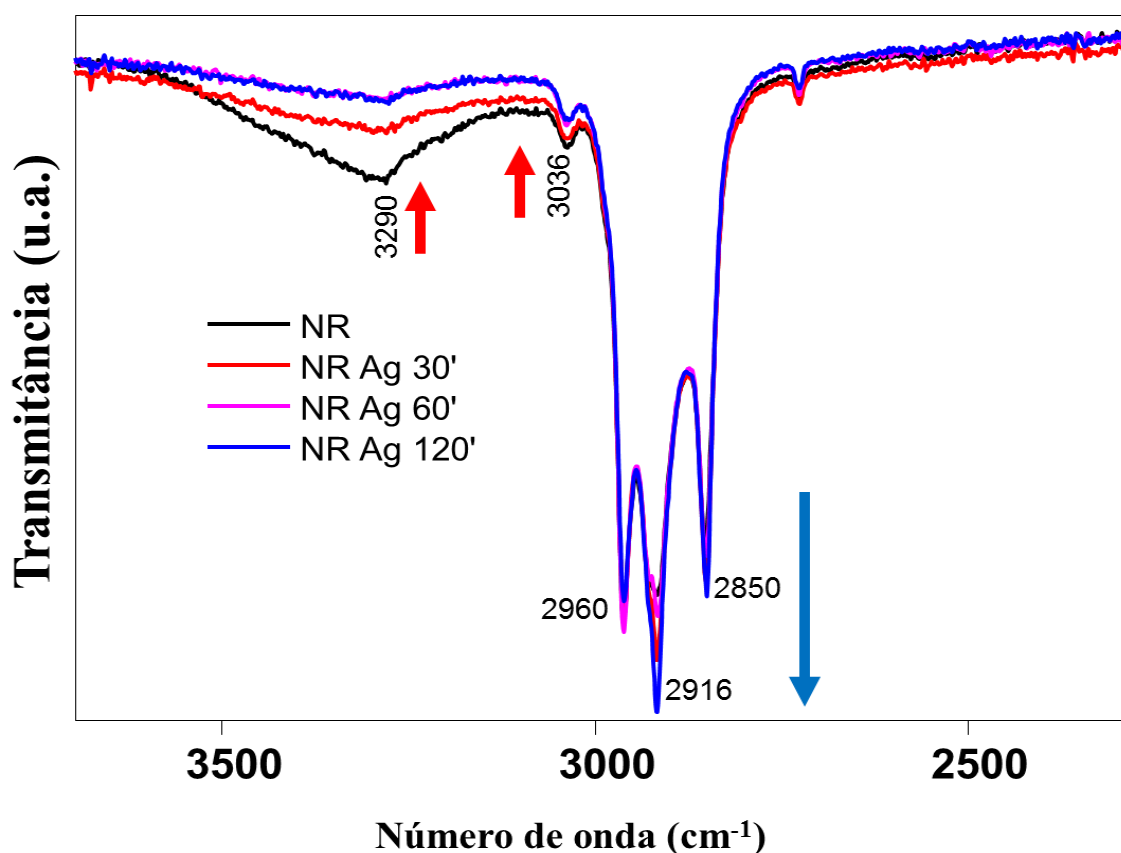


Figura 31 - Espectros FT-IR/ATR para os filmes de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução. Estudo da região entre 4000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} .

Como se pode observar na Figura 31 as bandas em torno de 3290 cm^{-1} e 3036 cm^{-1} apresentam diminuição de intensidade por outro lado as bandas entre 2960 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} sofrem aumento de intensidade.

Já os os resultados entre 1600 cm^{-1} a 800 cm^{-1} , que é apresentado na Figura 32 a seguir, podemos observar que as bandas em 1654 cm^{-1} , 1445 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} , 1307 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} sofrem diminuição na intensidade de transmitância e por outro lado a banda em 1515 cm^{-1} aparece e aumenta de intensidade a medida que o tempo de síntese aumenta. Por último, as bandas em 1124 cm^{-1} e 841 cm^{-1} , variam de intensidade com o tempo de redução, no entanto essa variação é aleatória.

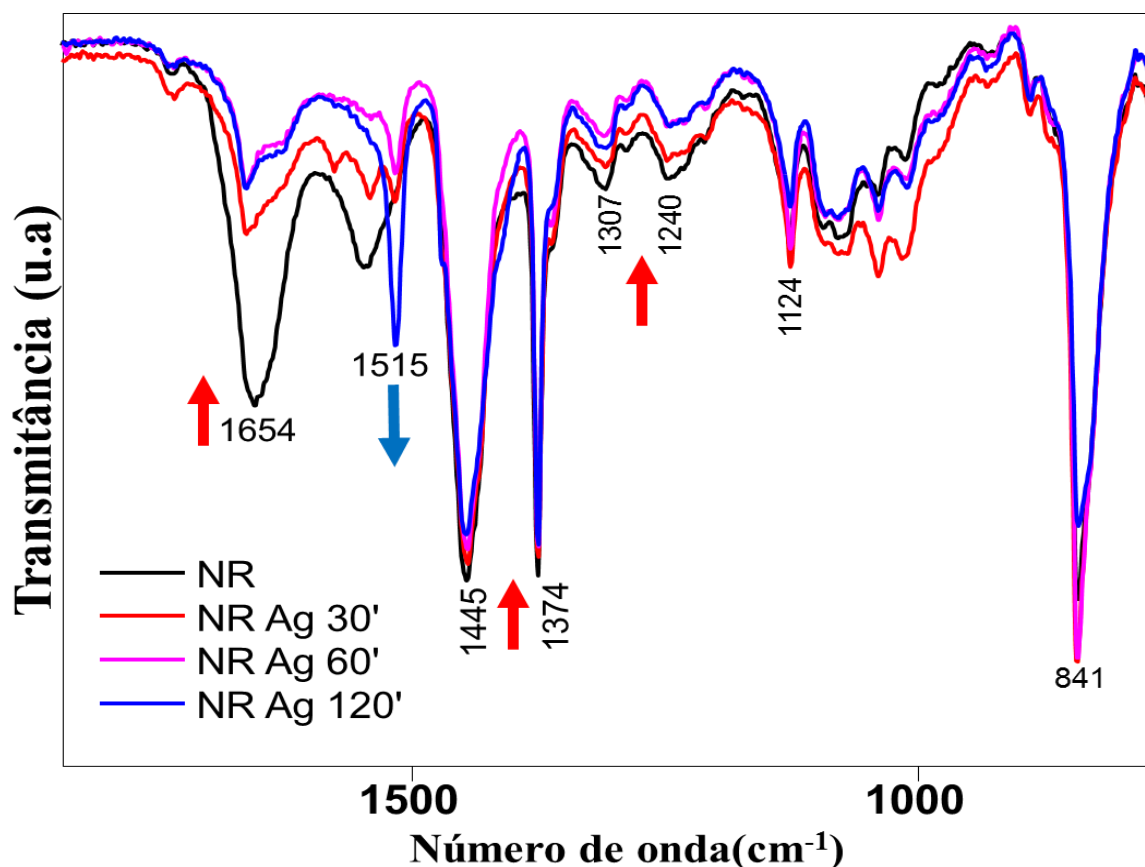


Figura 32 - Espectros FT-IR/ATR para os filmes de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução. Estudo da região entre 1600 cm^{-1} a 800 cm^{-1} .

As bandas que apresentam diminuição de intensidade estão associadas a grupos funcionais amidas (R-CO-NR_2) ligados às proteínas presente no borracha natural. Isto é um indicativo que estes grupos funcionais estão desaparecendo a medida que aumenta o tempo de síntese e de formação de nanopartículas.

Na literatura é possível encontrar trabalhos que demonstram que proteínas são capazes de reduzir íons metálicos para a formação de nanopartículas. Portanto sobre o ponto de vista químico, podemos associar estes grupos como responsáveis pelo processo de redução do íon prata (Ag^+) em prata metálica (Ag^0) na a membrana de borracha natural.

Neste sentido, outra evidência que corrobora com o citado anteriormente, é a formação da banda em 1515 cm^{-1} , a medida que aumenta o tempo de síntese. O formação deste grupo amina ($\text{R}_2\text{-NH}$), poderia estar mostrando o possível produto de reação entre amida e Ag^+ . A Figura 33 mostra um modelo para a formação de AgNPs utilizando a

membrana de borracha natural.

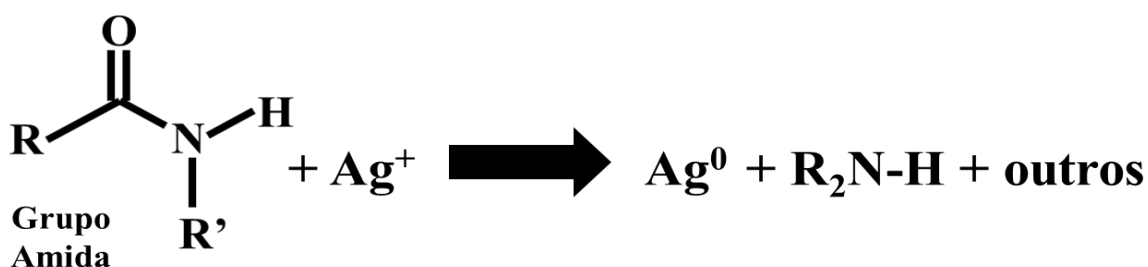


Figura 33 - Esquema de um possível modelo de reação para a formação de AgNPs no filme de BN.

O modelo anterior é um avance sobre o que se conhece para este tipo de reação utilizando tal material, pois se sabe, baseado na literatura, que o grupo amida é um grupo funcional estável, porém a evidência de nossos resultados mostram que sua degradação poderia estar atuando como o agente redutor da prata metálica.

Outro dado interessante obtido é que os grupos aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos não são observados no espectro infravermelho da membrana após a síntese, o que é um resultado importante visto que estes grupos funcionais apresentam bandas no FTIR muito bem definidas e caso estivessem presentes seriam observadas, então por este motivo o modelo proposto não inclui a formação destes produtos.

Um dos possíveis produtos que poderiam estar sendo formados durante a síntese são os gases como CO_2 e NO_2 , que também são produtos da decomposição do grupo amida, já que são os seus estados mais oxidados, visto que a espécie que se reduz é o Ag^+ , assim a outra espécie participante da reação obrigatoriamente deve oxidar-se. No entanto não foi possível fazer a medição da possível formação destes gases, pois a síntese ocorre em ambiente aberto (1 atm). Portanto, por mais que o modelo proposto é descrito parcialmente, ele pode ser tido como primeiro passo para o entendimento das propriedades redutoras de metais das membranas de borracha natural.

6.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise Elementar por EDS

Esta é uma análise importante, pois com ela podemos estudar a morfologia superficial do material além de sua composição. Na Figura 34(a) e (b) é mostrada a imagem obtida por MEV para a membrana de BN pura; a imagem (a) refere-se a imagem formada pela interação dos elétrons secundários (*secondary electron*) com a membrana de BN pura, esses elétrons secundários são aqueles gerados próximos à superfície da membrana, então devido sua baixa energia, o contraste dessa imagem é dado principalmente devido ao relevo da amostra [78].

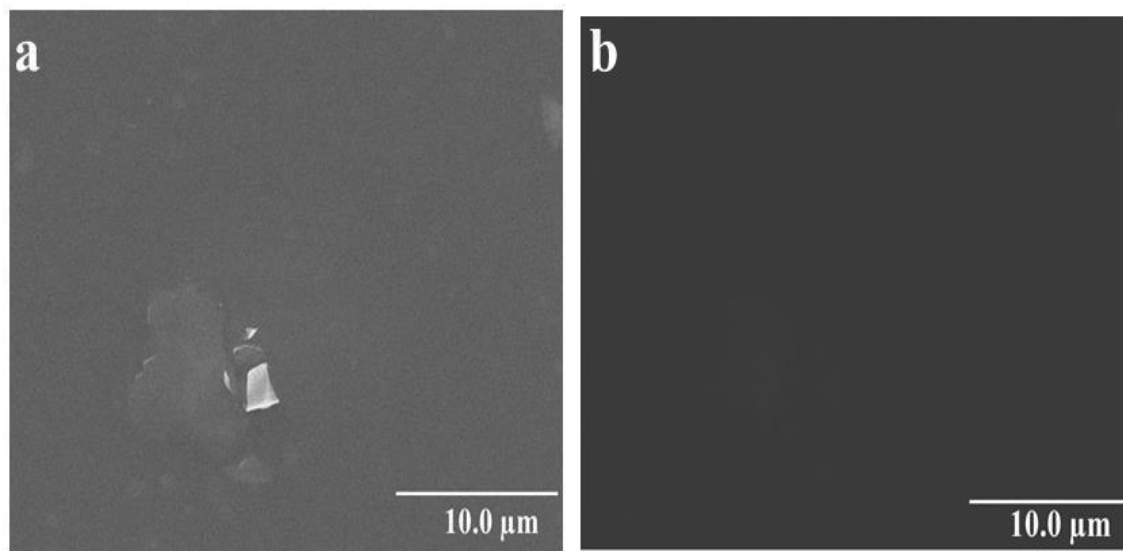


Figura 34 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o filme de borracha natural pura (a) formada pelos elétrons secundários (SE) e (b) formada pelos elétrons retroespalhados (*backscattering electron*) BSE..

A imagem mostrada na Figura 34(b) é formada pelos elétrons de alta energia, variando entre 50eV até o valor da energia do elétron primário, proveniente da amostra. Essa imagem é resultado da interação ocorrida profundamente na amostra e fornece informações topográficas, que é a relação de contraste dado em função ao relevo da amostra, assim como informações sobre a composição da mesma, que se dá devido ao contraste entre os números atômicos dos elementos presentes na amostra [78]. Nas duas imagens não foi possível identificar elementos metálicos presentes na amostra de borracha natural pura uma vez que

temos apenas a matriz polimérica sendo analisada. Esse fato se confirma ao observar os gráficos obtidos pela coleta dos raios-X por dispersão de energia, EDS, emitidos de um ponto específico da amostra. Esses resultados demonstram alta porcentagem de carbono, que está também associada ao recobrimento prévio da mesma, mas o mais importante é que não se observam estruturas metálicas na amostra. Na Figura 35(a) é apresentado o gráfico desta análise seguido da Figura 35(b) que mostra uma tabela com os valores das concentrações obtidas e à quais materiais foram atribuídos estes picos confirmando a conclusão anterior sobre a não presença de metais na amostra.

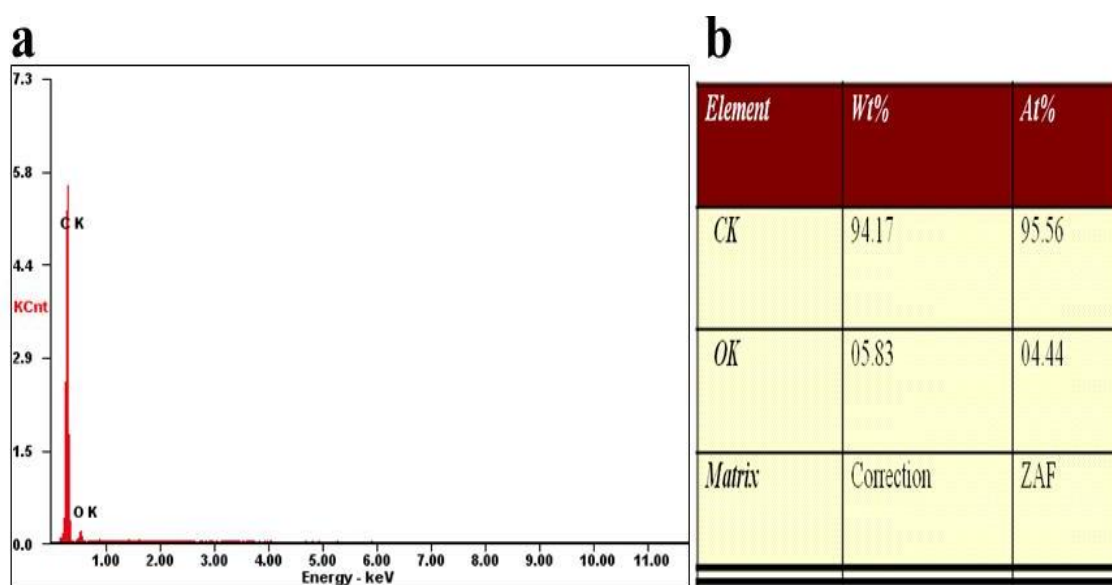


Figura 35 - (a) gráfico da análise elemental e (b) tabela de porcentagens e atribuições dos picos obtidos para o filme de BN pura.

Assim, para a análise das amostras de BN/Ag serão apresentadas apenas as imagens obtidas pela coleta do feixe de elétrons retroespalhados, BSE, por apresentar interação mais profunda com amostras e evidenciar as estruturas metálicas nela presente [78] e essas imagens são apresentadas na Figura 36, onde se observa duas imagens em pontos distintos para a membrana de maior concentração, ou seja, a BN/Ag120', além de ser possível observar a análise elemental do pontual da mesma.

Na imagem da Figura 36 (b) e (c) é possível observar a presença de estruturas de formato esférico que se destacam da matriz, que é a membrana de BN, sendo que estes

pontos mais claros representam estruturas metálicas presentes na amostra. Para confirmar a natureza das partículas metálicas observadas na membrana foi realizada uma análise elementar, apresentado na Figura 36(a).

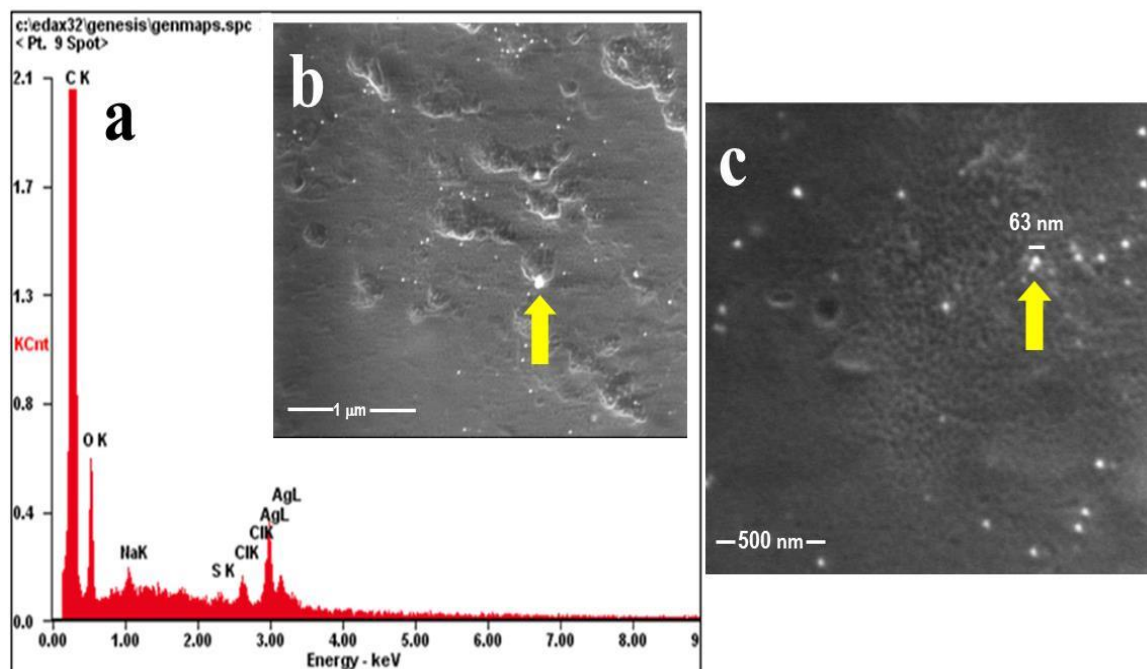


Figura 36 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o filme BN/Ag 120'.

Na análise elementar mostrada na Figura 36(a) o ponto analisado está indicado por uma flecha amarelo em destaque na Figura 36(b). No espectro apresentado nota-se o pico referente à emissão de raios-X da prata (AgL) e a partir dessa análise obtemos os resultados que são apresentados na Tabela V que sumariaza os valores obtidos para composição elementar da amostra de BN/Ag120', e é possível observar que a prata representa 3.24% em massa na zona analisada.

Tabela V - Valores para a análise elementar da membrana de BN/Ag120'.

<i>Elemento</i>	<i>Wt%</i>
<i>CK</i>	91.01
<i>OK</i>	05.09
<i>NaK</i>	00.23
<i>SK</i>	00.08
<i>ClK</i>	00.35
<i>AgL</i>	03.24
<i>Wt% = porcentagem em massa.</i>	

Ainda na Figura 36(c) se nota a análise de tamanho para uma das partículas, que está indicado com uma flecha em amarelo, sendo que o tamanho que essa estrutura apresenta é de 63 nm, no entanto as outras estruturas apresentam tamanhos que variam desde 25 nm até 65nm. Esse fato corrobora com o resultado apresentado na Figura 29 (UV-Vis) onde é possível observar banda plasmom com máximo em torno de 430 nm, que de acordo com a literatura [91, 92] corresponde à nanopartículas de prata que possuem esse tamanho.

6.1.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Neste item são apresentadas as imagens superficiais obtidas por microscopia de força atômica das membranas de BN pura e membranas de BN/Ag para os distintos tempos de redução.

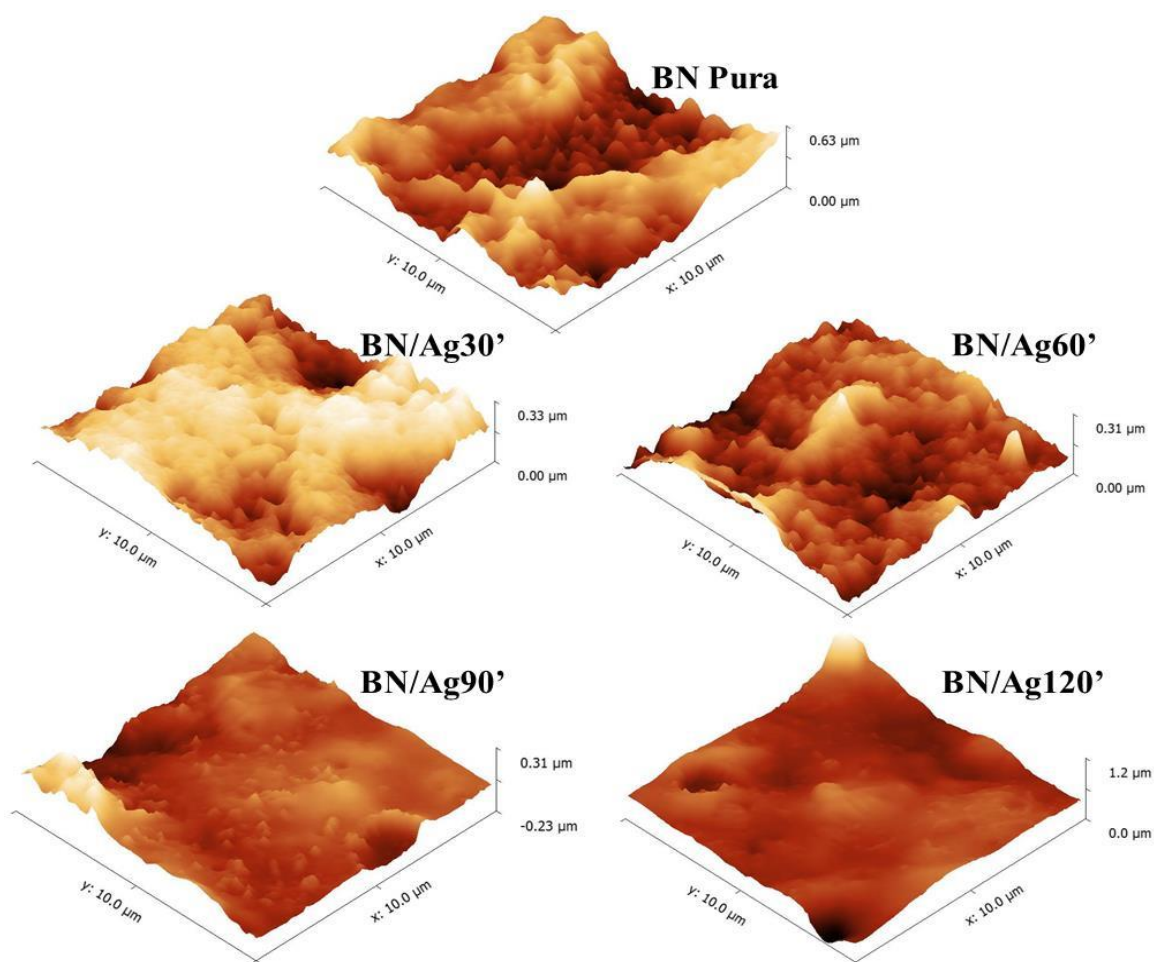


Figura 37 - Imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) para os filmes de BN pura, BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120'.

Na Figura 37 se tem as imagens de AFM para os filmes de BN pura, e para os filmes

nos diferentes tempos de redução BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120'.

É possível observar que com o aumento do tempo de redução a morfologia superficial da membrana sofre modificações. A rugosidade superficial desta diminui com o aumento do tempo de síntese. O filme de BN pura apresenta um valor de rugosidade média quadrática igual a 101.6 nm e a membrana com o maior tempo de síntese apresenta um valor de 58.2 nm. Este fato está associado ao crescimento das AgNPs na superfície da membrana, pois quanto maior o tempo de síntese, maior a quantidade de nanopartículas, então estas ocupam os espaços presentes na superfície da membrana pura, fazendo com que sua superfície se torne mais plana.

Este resultado está em acordo com os outros resultados apresentados que indicam que o acréscimo de nanopartículas na estrutura polimérica está diretamente ligado com o tempo de imersão da membrana na solução de AgNO_3 .

6.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas com o intuito de se estudar a esbabilidade térmica da matriz polimérica após a interação com a solução de nitrato de prata. Os resultados dessa análise são mostrados na Figura 37.

Nas curvas mostradas na Figura 38, apresentada anteriormente, se pode observar o comportamento térmico para os filmes de BN pura e nos diferentes tempos de interação com a solução de AgNO_3 . Três importantes temperaturas estão destacadas no gráfico, a primeira temperatura -65°C está relacionada a temperatura de transição vítrea (T_g) da bocharra natural [94], e é possível notar que esse valor se mantém inalterado para os filmes que contém AgNPs incorporadas em sua estrutura, ou seja, o processo de síntese não influencia na mobilidade da cadeia polimérica

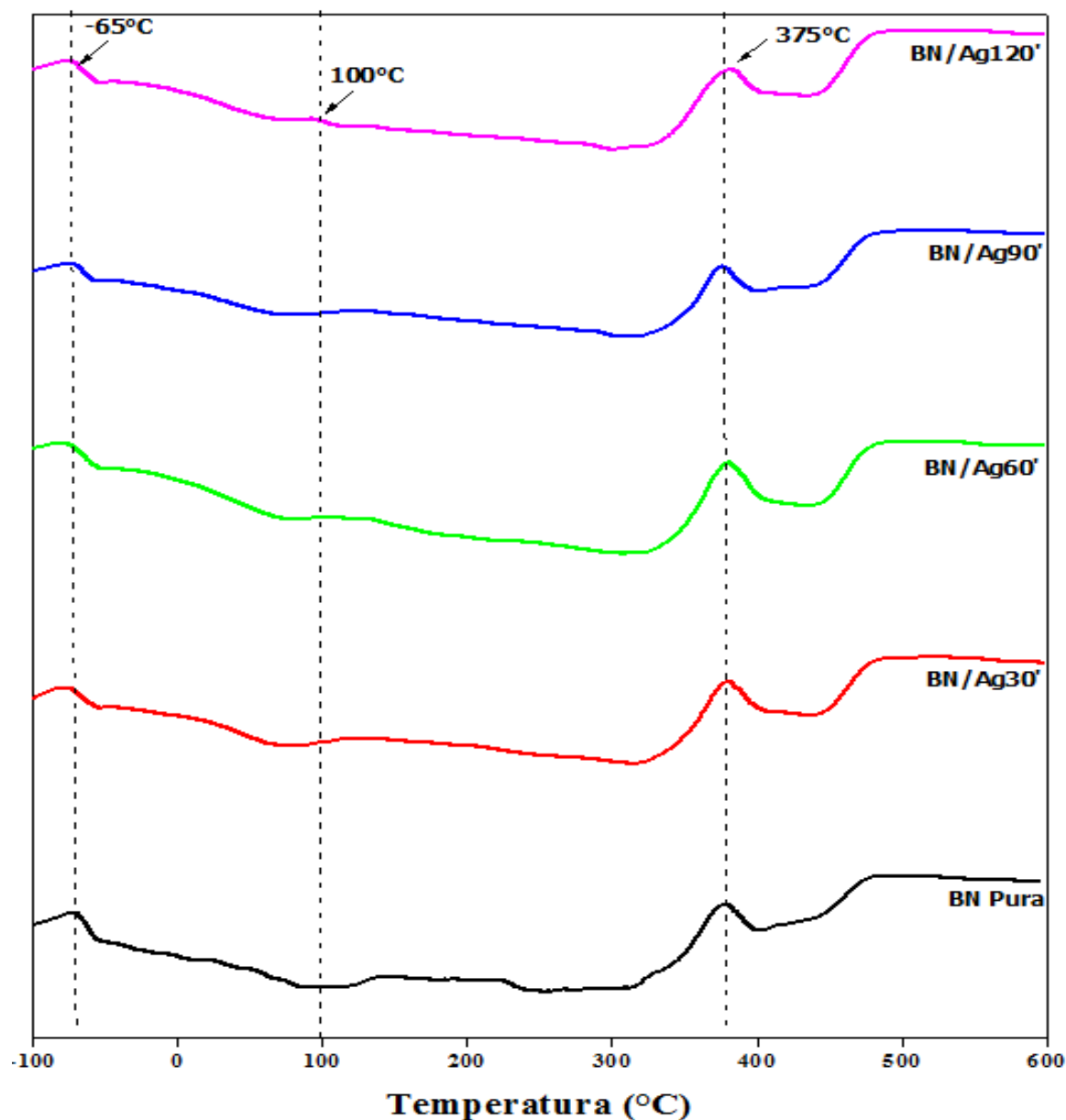


Figura 38 - Comparativo entre as curvas de DSC para os filmes de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

As outras duas temperaturas em destaques são a temperatura de 100°C, onde se observa uma reação endotérmica que é relacionada com a evaporação da água presente no filme, e a 375°C têm-se um pico exotérmico que se correlaciona com degradação da estrutural da borracha natural, ou seja, degradação do poli-cis-isopreno; é possível notar que o valor dessa temperatura também não sofre influencia quando se agrega nanopartículas de prata à BN, assim pode-se concluir que a presença das AgNPs, mesmo em maiores concentrações, não altera a estruturalmente a matriz.

6.1.6 Análise dos Extratos Líquido

Os extratos líquidos foram analisados por Espectroscopia de Emissão Óptica acoplado a Plasma Induzido (ICP-OES) com o intuito de saber se os filmes de BN/Ag liberam prata para o veículo extrator. Os resultados das análises dos EL são mostrados no gráfico apresentado na Figura 39, onde é possível observar que para o extrato de BN pura não foi identificada, e/ou ficou abaixo do limite de detecção (<LoD), a presença de prata no extrato, o que condiz com as condições de fabricação da amostra, uma vez que a amostra identificada como BN pura não passa pelo processo de imersão em solução de nitrato de prata.

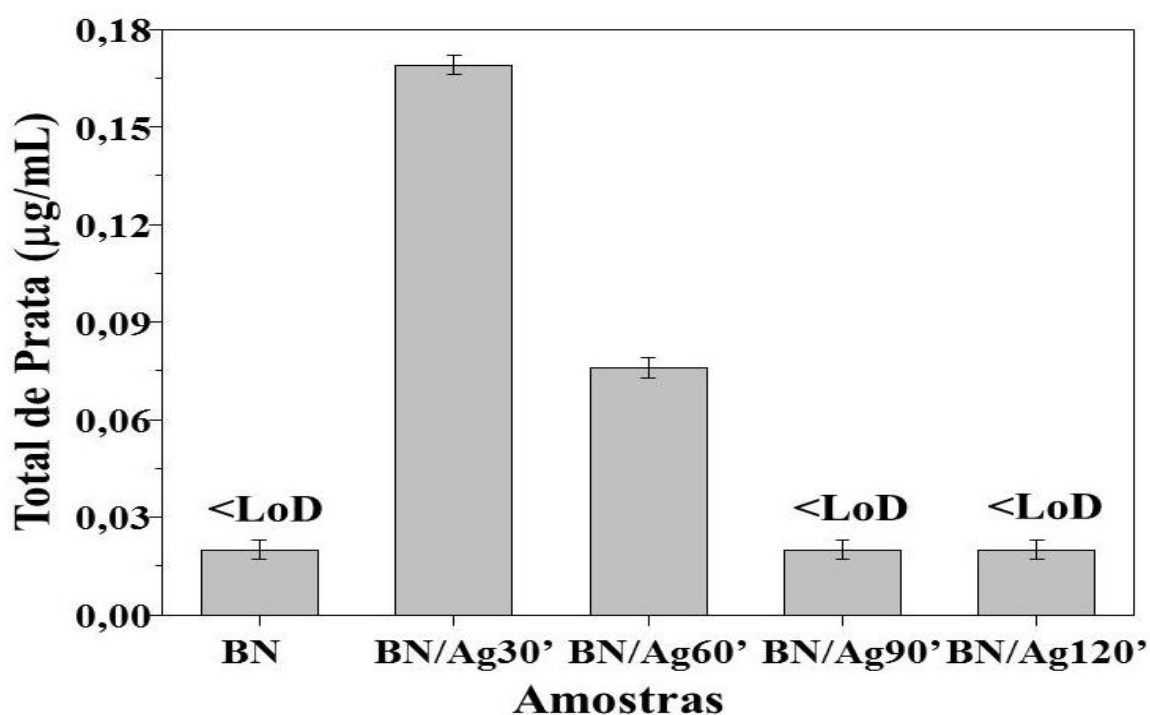


Figura 39 – Resultados das análises dos extratos líquidos por Espectroscopia de Emissão Óptica acoplado a Plasma Induzido (ICP).

Para as amostras que passaram pelo processo de síntese, ou seja, foram submersas em solução de nitrato de prata, os EL desses filmes indicaram valores de total de prata que o equipamento pode quantizar. Para a membrana de BN/Ag 30' a quantidade de prata no EL que foi detectada é de aproximadamente 0.17 µg/mL e para a membrana de BN/Ag60' de aproximadamente 0.08 µg/mL, já para as membranas de BN/Ag90' e BN/Ag120' os valores

de detecção ficaram abaixo do limite de detecção, ou seja, abaixo de 0.029 µg/mL.

Os valores encontrados nessa análise dos EL indicam que as membranas que estiveram em contato por menor tempo com a solução de nitrato de prata liberaram maiores quantidades de prata total para o veículo extrator, no entanto não se pode identificar a espécie de prata liberada, ou seja, não identificamos se o filme libera prata metálica ou íons prata ou ainda, se alguns cristais de nitrato de prata puderam se alojar na membrana e posteriormente, ao entrar em contato com o meio líquido novamente, serem liberados para este.

6.2 Avaliação da Citotoxicidade

Neste item serão apresentados os resultados obtidos para os testes de citotoxicidade e genotoxicidade das membranas de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

6.2.1 Testes de Citotoxicidade para o Filme de BN Pura

Em primeira instância foram realizados testes preliminares de citotoxicidade para determinação do veículo extrator empregado nos testes subsequentes.

O primeiro veículo extrator estudado foi o meio de cultura, e os resultados dos estudos de viabilidade celular para a linhagem celular CCD 1059 sK são apresentados no gráfico da Figura 40 onde se observa resultados comparativos entre o controle negativo (CTR), apenas meio de cultura, e os extratos líquido para a membrana de BN; os resultados indicados como 50% são referentes à diluição do extrato líquido em água destilada e 100% ao extrato líquido não diluído.

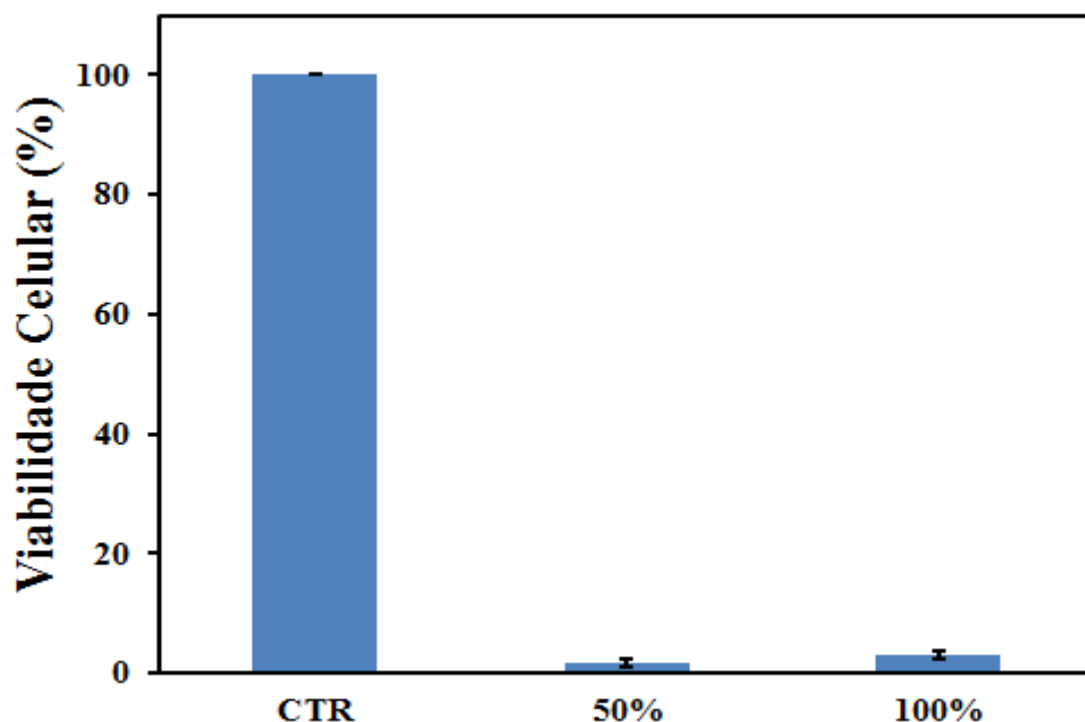


Figura 40- Viabilidade celular da linhagem CCD 1059sK para o extrato líquido com BN pura em meio de cultura.

Como é possível observar no gráfico da Figura 40 a viabilidade celular para os extratos feitos com meio de cultura é drasticamente reduzida, atingindo valores em média de 3.12% de viabilidade, demonstrando a alta citotoxicidade desses extratos para a linhagem celular utilizada neste trabalho. Nas imagens apresentadas na Figura 41 mostra um comparativo visual entre as células expostas ao EL com meio de cultura sendo as imagens 41 (a), (c) e (e) obtidas no momento da exposição, ou seja, tempo zero de exposição, e as imagens 41(b), (d) e (f) obtidas 24 horas após a exposição das células ao EL. Nas imagens obtidas após o tempo de exposição é possível notar espaços não preenchidos no fundo do poço, referente a não presença de células no mesmo, isso é um indicativo de que essas células não foram capazes de se desenvolver normalmente, ou seja, tiveram seu metabolismo afetado de alguma forma pelo EL, o que está de acordo com os resultados obtidos para a viabilidade celular [95].

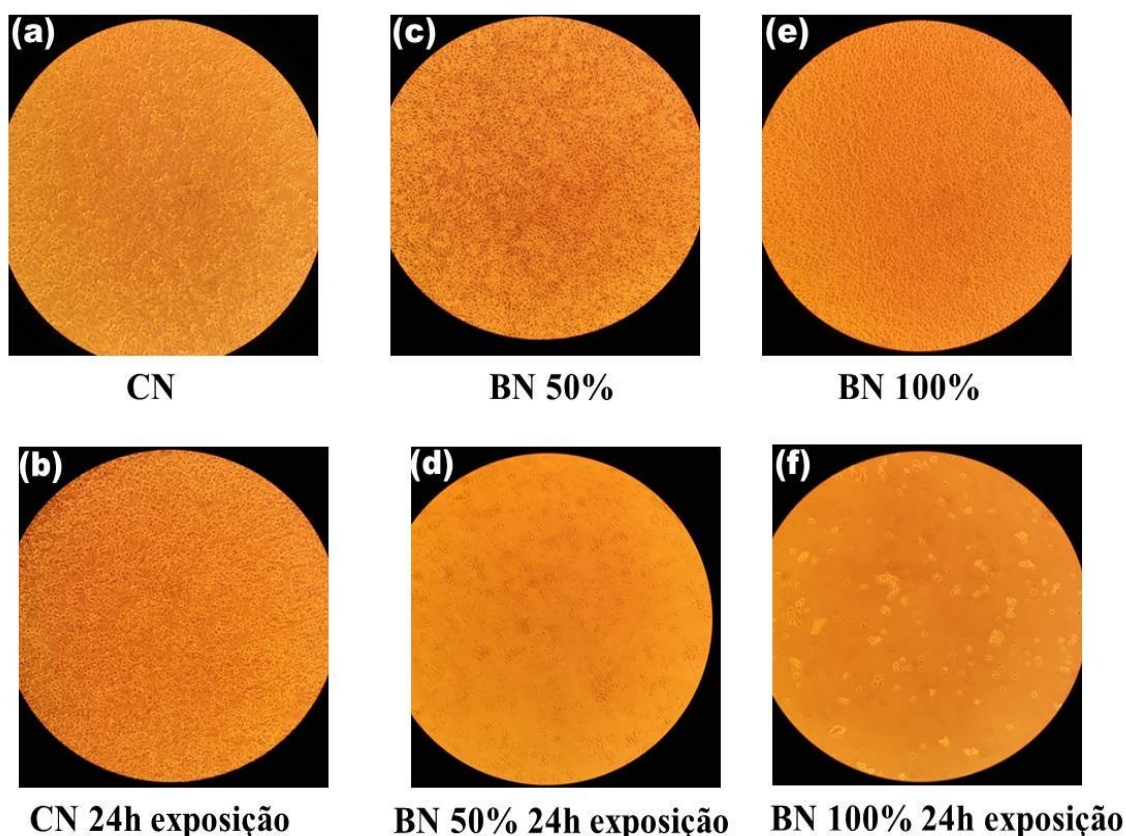


Figura 41 - Comparativo visual para as células CCD 1059 sK expostas ao extrato com meio de cultura, no início do experimento (a), (c) e (e); e depois de transcorrido o período de 24 horas (b), (d) e (f).

A redução de viabilidade celular encontrada para os EL com meio de cultura, obtidos neste trabalho, está de acordo com a literatura [95] onde foram avaliados a citotoxicidade de diferentes veículos extratores com materiais a base de borracha natural e também se constatou que o emprego do meio de cultura como veículo extrator pode fazer com que o material polimérico libere neste espécies, que não foram identificadas, que podem gerar danos ao metabolismo de meios celulares. Sendo assim, decidimos continuar os testes de citotoxicidade utilizando água como meio extrator, a fim de avaliar apenas a citotoxicidade relacionada aos filmes de BN/Ag nos diferentes tempos de redução.

A Figura 42 mostra o gráfico onde se compara os valores da viabilidade celular, da linhagem CCD 1059 sK, para o controle negativo (CTR), utilizando água e meio de cultura na razão de 1:1 por poço, e extrato da BN pura utilizando água como veículo extrator na mesma razão de proporção utilizada para o CTR.

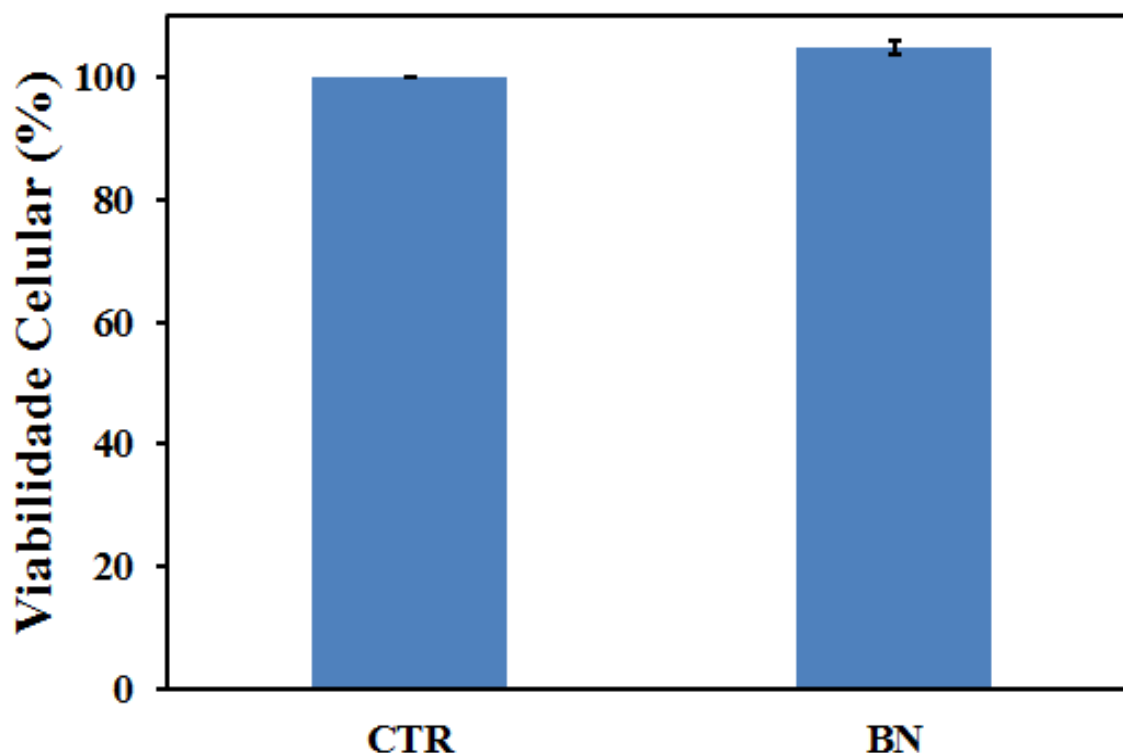


Figura 42 - Viabilidade celular da linhagem CCD 1059 sK para o extrato de BN pura em água.

A porcentagem de células viáveis para o CTR é de 100%, pois estas células ficaram expostas apenas ao meio de cultura e água, na proporção citada anteriormente, ou seja, não foram expostas a nada que pudessem acarretar modificações em seu metabolismo.

É possível observar ainda, na Figura 42, que a porcentagem de viabilidade celular das células expostas ao extrato de BN pura praticamente não sofreu variação, atingindo o valor de 104.71%. Assim pode-se dizer que as mesmas não apresentam danos em seu metabolismo e puderam manter seu desenvolvimento sem alterações.

Na Figura 43 (a) e (c) é apresentado imagens das células no início da exposição ao extrato líquido e nas imagens 43 (b) e (d) depois de transcorrido o período de 24 horas de exposição aos EL.

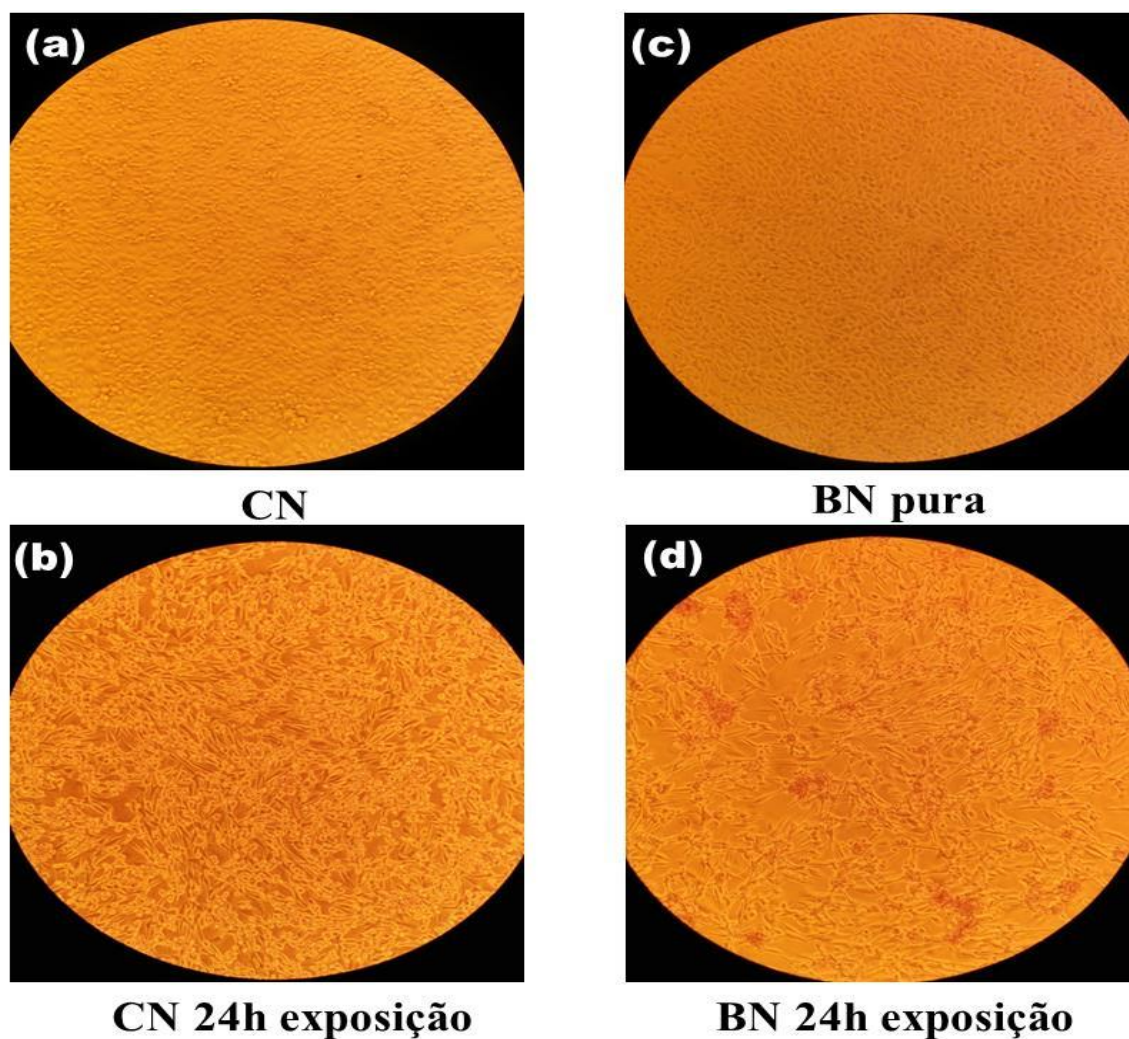


Figura 43 - Comparativo visual para as células expostas ao extrato com água, no início do experimento (a) e (c) e depois de transcorrido o período de 24 horas (b) e (d).

Após o período de 24 horas, imagens (b) e (d) da Figura 42, nota-se menos espaços não preenchidos por células quando comparamos essas imagens às imagens apresentadas na Figura 43 (b), (d) e (f), esse pode ser um indicativo visual do desenvolvimento regular das células, uma vez que essas não apresentaram diminuição da viabilidade celular, como foi apresentado nos dados contidos na Figura 42.

6.2.2 Testes de Citotoxicidade para os Filmes de BN pura e BN/Ag

Neste item são apresentados os resultados para a viabilidade celular obtidos utilizando os EL com água para os filmes de BN pura, BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120', sendo que na Figura 43 é possível observar estes resultados.

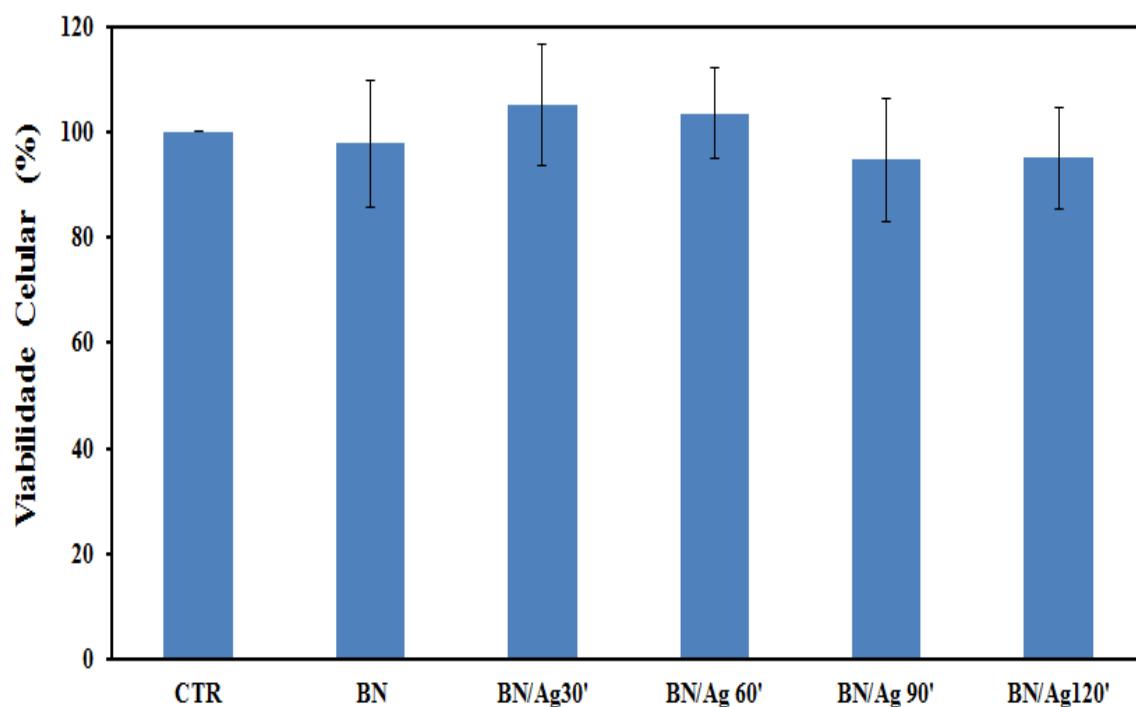


Figura 44 - Gráfico da porcentagem de viabilidade celular para os extratos obtidos para os filmes de BN pura, BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120'.

As células que foram expostas aos extratos, obtidos para as diferentes membranas de BN/Ag e água como veículo extrator, apresentam uma pequena variação nos valores de viabilidade celular, mas no entanto, não se enquadram nos valores considerados citotóxicos, abaixo de 30% de acordo com as normas que foram utilizadas como referência [53, 55].

Os altos valores de viabilidade celular observados no gráfico demonstram que os filmes contendo ou não prata não liberam materiais citotóxicos para o veículo extrator quando este é a água. Em relação a prata que as membranas de BN/Ag liberam para o veículo extrator, que foram identificadas por ICP-OES, não influenciam o metabolismo celular das linhagens escolhidas para este trabalho, podendo então serem ditas como material não citotóxico [53, 54, 55, 96].

6.2.3 Contato Direto

A análise macroscópica das células em contato direto com o papel filtro e com os filmes BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120' são mostrados na Figura 45 e na Tabela VI.

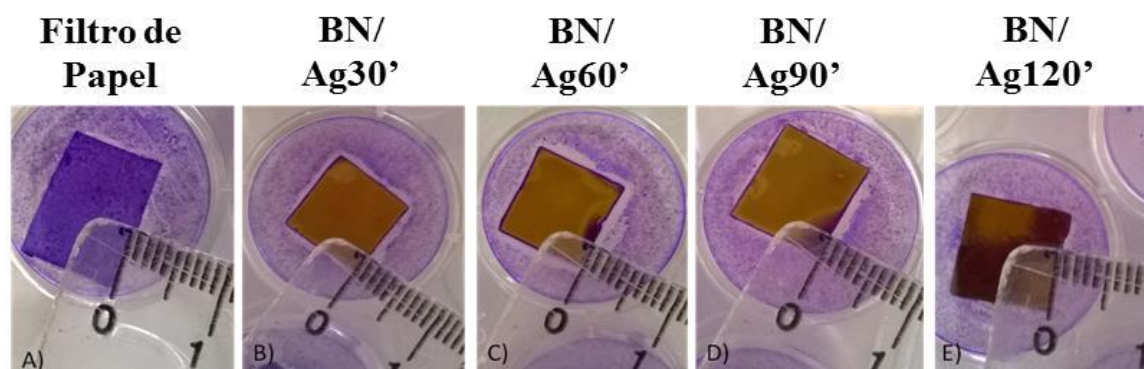


Figura 45 - Foto da medida dos halos, com o auxílio de uma régua milimétrica em todas as condições- testes.

Tabela VI - Valores em cm do tamanho dos halos encontrados entre as células e as membranas testadas e a classificação de citotoxicidade correspondente baseada na ISO 10993/2009.

<i>Amostra</i>	<i>Valor encontrado (cm)</i>	<i>Tamanho do Halo</i>	<i>Citotoxicidade</i>	<i>Grau</i>
CN	$0,0 \pm 0,1$	Nenhum halo detectado	Nenhuma	0
BN/Ag 30	$0,2 \pm 0,2$	Menor que 0,5 cm	Branda	2
BN/Ag 60	$0,3 \pm 0,1$	Menor que 0,5 cm	Branda	2
BN/Ag 90	$0,1 \pm 0,1$	Menor que 0,5 cm	Branda	2
BN/Ag 120	$0,1 \pm 0,2$	Menor que 0,5 cm	Branda	2

É possível observar que na condição CN, quase não houve formação de halo. Já para os filmes BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120' foram encontrados halos de tamanho $0,2 \pm 0,2$; $0,3 \pm 0,1$; $0,1 \pm 0,1$ e $0,1 \pm 0,2$, respectivamente.

A análise microscópica das células em todas as condições experimentais são mostradas na Figura 46 e na Tabela VII .

É possível observar que na condição CN, existe a presença de algumas células redondas e que a monocamada celular ao redor do papel filtro não está totalmente completa, sendo então classificada com grau leve de citotoxicidade.

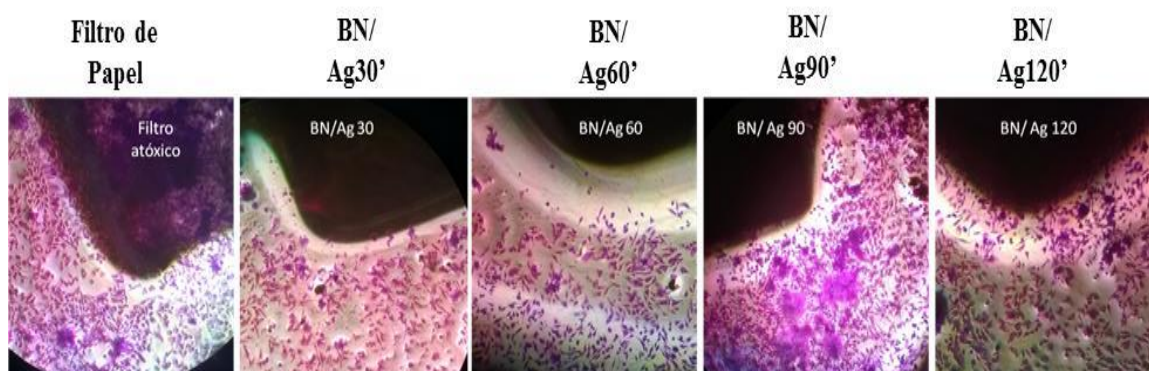


Figura 46 - Imagens das células visualizadas através de microscópio óptico no aumento de 100X, para todas as condições testadas.

Tabela VII - Resultado das observações microscópicas das células em todas as condições experimentais, baseado na classificação de grau de citotoxicidade da ISO 10993/2009.

Amostra	Condições da cultura encontradas microscopicamente	Citotoxicidade	Grau
CN	• Não mais do que 20% das células estão redondas, frouxamente ligadas e sem grânulos intracitoplasmáticos • apresentam alterações na morfologia	Leve	1
BN/Ag30'	• Não mais do que 50% das células estão redondas, desprovidas de grânulos intracitoplasmática • sem grande lise celular • não mais do que 50% de inibição de crescimento observável.	Branda	2
BN/Ag60'	• Não mais do que 50% das células estão redondas, desprovidas de grânulos intracitoplasmática • sem grande lise celular • não mais do que 50% de inibição de crescimento observável	Branda	2
BN/Ag90'	• Não mais do que 20% das células estão redondas, frouxamente ligadas e sem grânulos intracitoplasmáticos • apresentam alterações na morfologia; • apenas ligeira inibição do crescimento observável.	Leve	1
BN/Ag120'	• Não mais do que 20% das células estão redondas, frouxamente ligadas e sem grânulos intracitoplasmáticos • apresentam alterações na morfologia; • apenas ligeira inibição do crescimento observável.	Leve	1

Para as condições BN/Ag30' e BN/Ag60' é possível observar uma zona sem células entre as membranas e a monocamada celular e também que, mais de 50% das células estão aderidas em formato de fibroblasto no fundo da placa, sendo então classificados como grau branda de citotoxicidade. Já para as condições BN/Ag90' e BN/Ag120' é possível observar uma zona sem células entre os filmes e a monocamada celular menor que nas condições anteriores e que no mínimo 80% das células aderidas no fundo da placa estão com morfologia normal de fibroblasto, sendo então classificadas com grau leve de citotoxicidade.

6.2.4 Adesão Celular

Os testes de adesão celular mostraram que as células são capazes de aderir na superfície dos filmes de BN pura e nos distintos filmes de BN/Ag.

As imagens de MEV apresentadas na Figura 47 mostram a superfície do filme de BN pura Fig 47 (A) sem células aderidas e Fig 47 (B) com as células aderidas com o mesmo aumento.

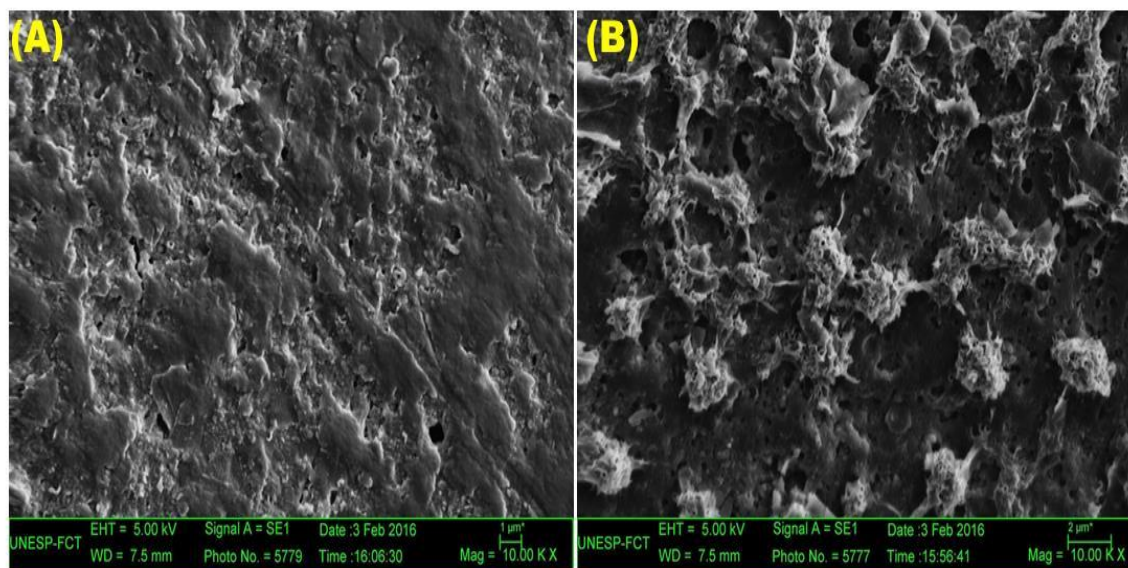


Figura 47 - Imagens de MEV para o filme de BN (A) sem células aderidas e (B) com as células aderidas na superfície.

Na imagem da Figura 47 (A) observa-se a superfície do filme de BN após passar pelo processo de fixação, nota-se que a morfologia superficial do filme não apresenta estruturas que se destacam em relação ao relevo. É possível observar na Figura 47 (B) a superfície do

filme de BN ao “fundo” da imagem e as estruturas arredondadas em destaques são as células aderidas na superfície deste filme.

Na Figura 48 é mostrado as imagens de MEV em diferentes aumentos, para as distintas amostras com células aderidas em suas superfícies.

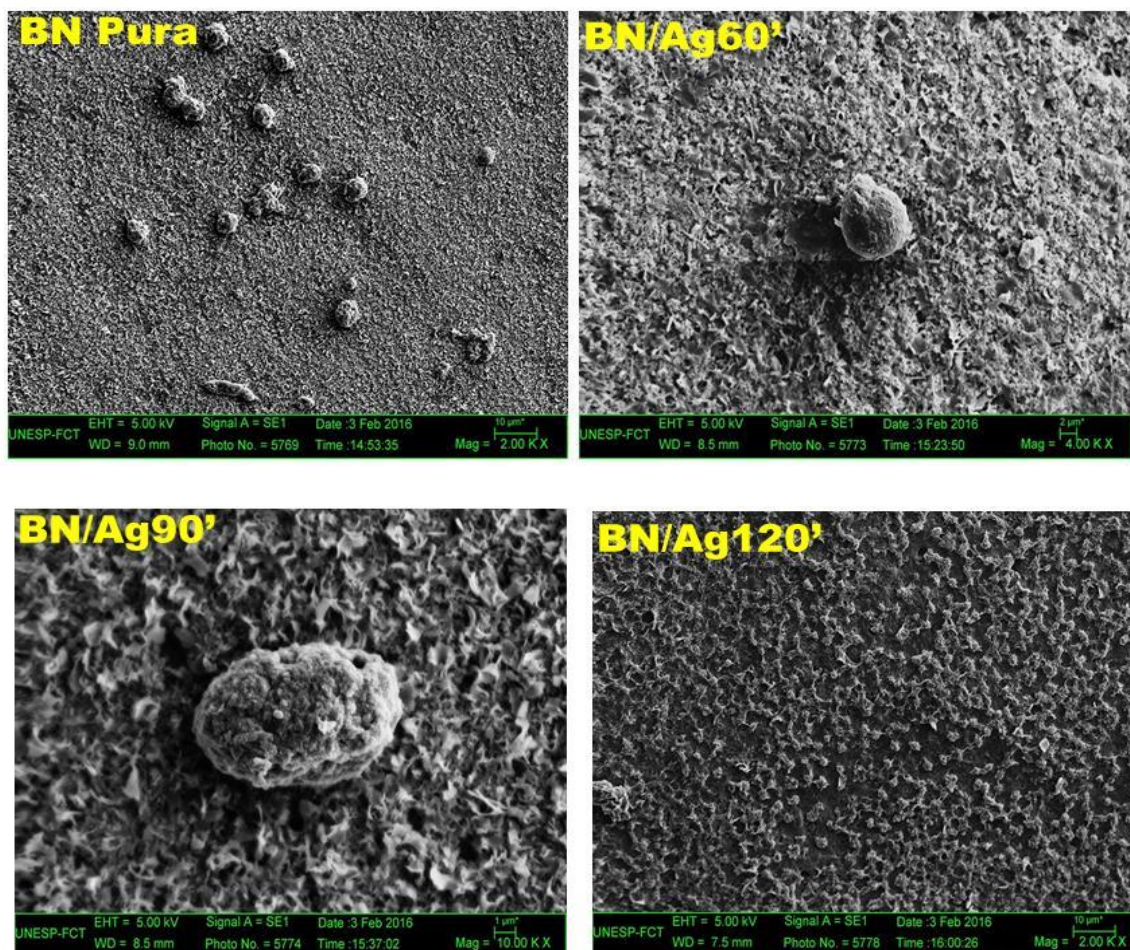


Figura 48 - Imagens de MEV em diferentes magnitudes para as distintas amostras com células aderidas na superfície.

É possível observar que para as distintas amostras as células ficaram aderidas em suas superfícies, o que corrobora com os outros resultados para a citotoxicidade confirmando que os filmes de BN e BN/Ag não causam danos ao metabolismo celular das linhagens utilizadas neste trabalho.

6.3 Avaliação da Genotoxicidade

Neste item são apresentados os resultados relacionados aos teste de genotoxicidade que foram utilizados com o intuito de conhecer os possíveis danos gerados ao DNA da linhagem celular CHO K1 pelos filmes de BN e BN/Ag e esses resultados podem ser observados na Figura 44 a seguir onde se apresenta um gráfico com os valores comparativos, para o score de danos causados ao DNA, entre o controle positivo (CP), negativo (CN) e os filmes de BN e BN/Ag nos diferentes tempos de síntese, e ainda na mesma imagem em destaque na parte superior é possível observar as imagens de microscopia das lâminas utilizada para a obtenção dos valores contidos no gráfico; nas Figuras 49(a) temos a imagem para o controle positivo onde o onde é possível visualizar grande fragmentação na molécula de DNA, causado pelo MMS [85, 86]; 49(b) temos a imagem do controle negativo onde o dano causado ao DNA é mínimo ou não há danos [84, 85, 86]; e nas imagens 49(c) e (d) temos as imagens para os filmes de BN pura e BN/Ag120' respectivamente.

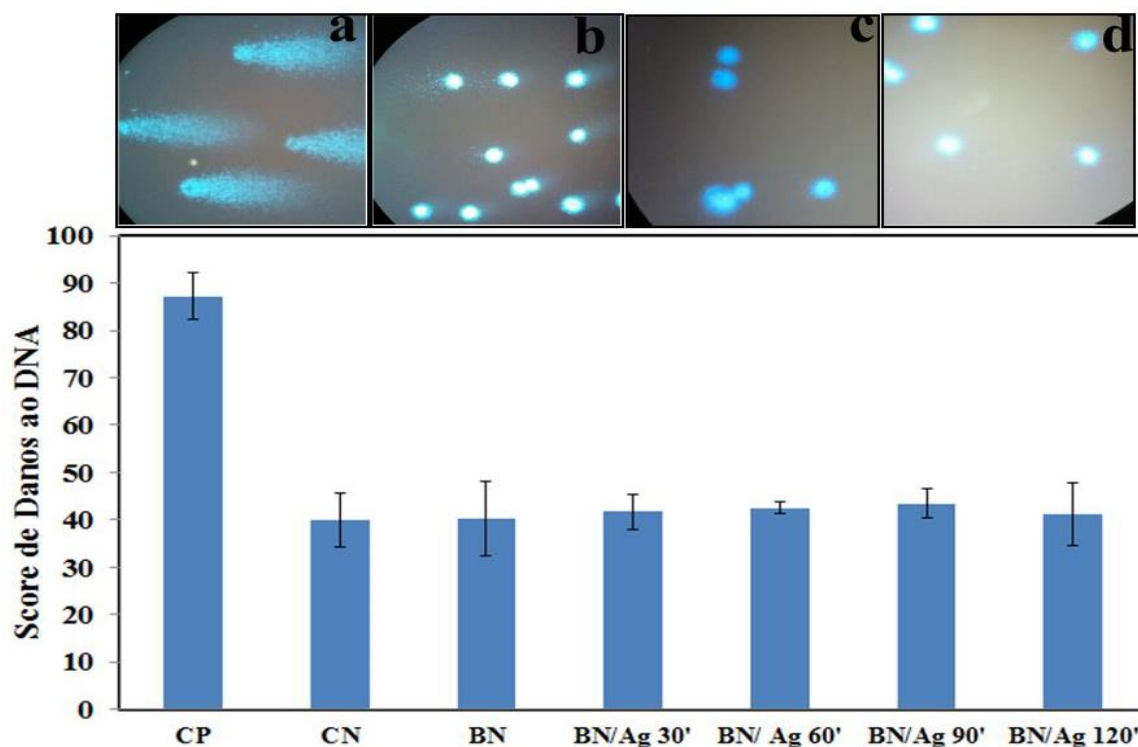


Figura 49 – Teste do Cometa para os filmes de BN e BN/Ag nos diferentes tempos de redução. Na parte superior do gráfico se pode observar as imagens do cometa para o controle positivo (a); controle negativo (b); para o filme de BN pura (c) e a BN/Ag120' (d).

Os valores obtidos para os score de danos ao DNA apresentados nos permite aferir que, para os EL do filme de BN pura em comparação com os controles negativo, essa não foi causadora de danos ao DNA das células, o que já era um valor esperado visto que essa não libera materiais citotóxicos em água como foi visto para os testes de citotoxicidade. Para os filmes de BN/Ag90' e BN/Ag120' a não indução de danos ao material genético celular também era esperado, uma vez que esses filmes, além de não liberarem material tóxicos proveniente da matriz polimérica, também não liberam prata para o veículo extrator, como foi possível quantizar utilizando a técnica de ICP-OES.

Para os filmes de BN/Ag30' e BN/Ag60', a não genotoxicidade pode ser relacionada a concentração de prata total que esta libera ao meio extrator. Souza et al [97] publicaram recentemente um estudo onde expõem duas linhagens celulares (CHO-K1 e CHO RS5), sendo a CHO-K1 utilizada também neste trabalho, à diferentes concentrações de AgNPs (0.025 to 5.0 $\mu\text{g/mL}$), por 24 hora e concluem que a genotoxicidade dessas nanopartículas são dose-dependentes, ou seja, aumentam com o aumento da concentração, e ainda, que esse efeito só é observado para concentrações igual ou maiores que 1.25 $\mu\text{g/mL}$, assim esse resultado corrobora os resultados mostrados neste trabalho, pois a concentração liberada pelas membranas contendo prata para o EL é de no máximo 0.17 $\mu\text{g/mL}$ para o filme BN/Ag30' como mostrado nos resultados de análise dos extratos líquido, ou seja, a quantidade de prata liberada pelas membranas de BN/Ag estão abaixo do limite considerado tóxico às células [98, 99]. Assim o material é também considerado não genotóxico [80, 81, 8185, 86].

6.4 Filmes Flexíveis Fluorescentes

O processo de homogeneização entre látex e a solução de QDs resulta em uma solução fluorescente à luz ultravioleta, essas soluções são mostradas na Figura 50 antes

da secagem sendo as placas iluminadas por uma lâmpada com emissão de luz ultravioleta.

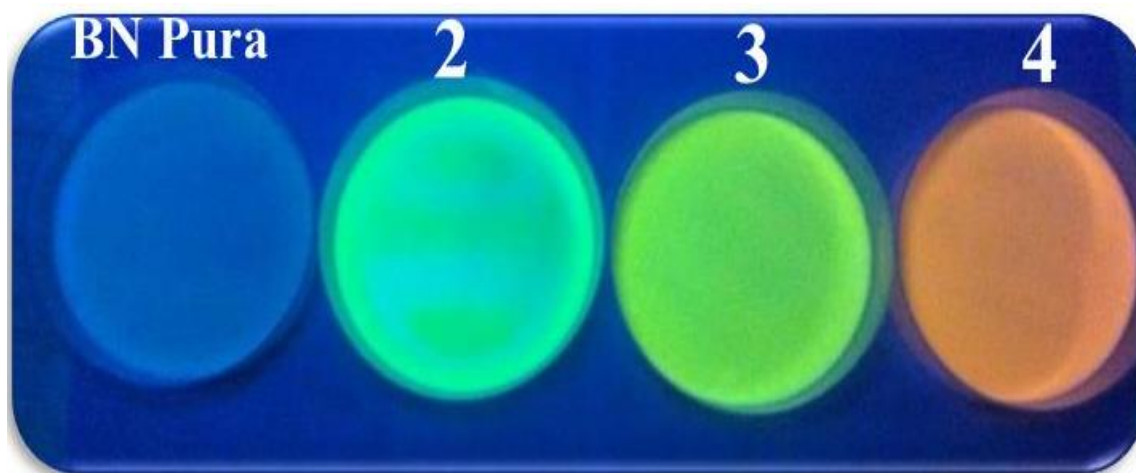


Figura 50 - Mistura do látex com solução de QDs. As placas estão dispostas de forma crescente de acordo com o tempo de síntese dos QDs.

Observa-se que a solução contida na placa é opaca e bastante fluorescente quando exposta à luz UV. Na Figura 51 é possível observar os filmes de BN/QDs após transcorrido o tempo de secagem. As imagens foram obtidas na luz ambiente Figura 51(a) e iluminada com uma lâmpada de ultravioleta Figura 51(b).

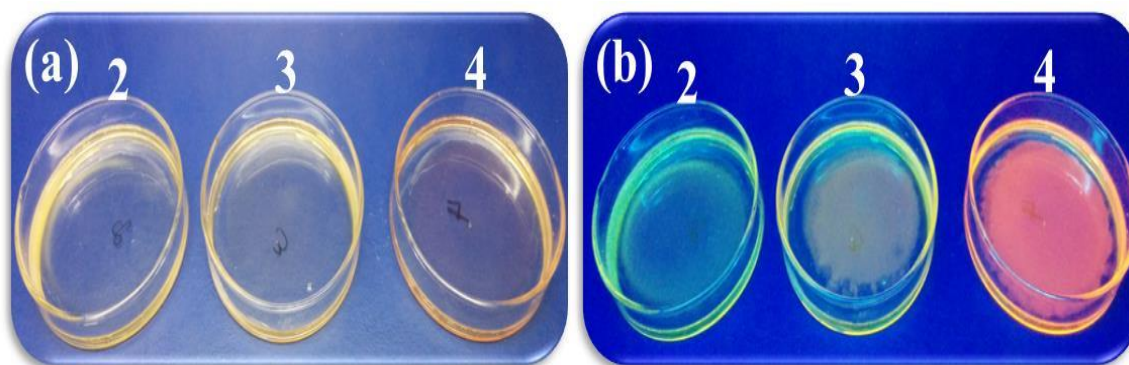


Figura 51 - Filmes de BN/QDs-CdTe após o tempo de secagem (a) luz ambiente, e (b) iluminadas com lâmpada UV.

Após o tempo de secagem dos filmes de BN/QDs é possível notar que eles se tornam transparentes e quando iluminadas com luz UV também apresentam fluorescência, no entanto com menor intensidade quando comparadas à sua fase líquida, como pode ser observado na Figura 50.

6.4.1 Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

Neste item serão apresentados os resultados obtidos utilizando a técnica de caracterização de espectroscopia de Ultravioleta Visível para os filmes de BN/QDs com os diferentes tamanhos de partículas.

A Figura 52 mostra os espectros de UV-Vis obtidos para tais filmes e no *inset* na área do gráfico é possível observar as imagens destes filmes com e sem a incidência de luz UV. Comparando os espectros obtidos para os filmes nota-se o surgimento de um máximo de absorbância para os filmes contendo as nanopartículas semicondutoras, esses máximos de absorbância se deslocam para maiores comprimentos de onda, sendo para o filme BN/QD2, o máximo de absorbância está centrado em torno de 477 nm, para BN/QD3 em 503 nm, e para a BN/QD4 em 530 nm. Esse deslocamento para maiores comprimentos de onda são indicativo de partículas maiores [67, 68, 69].

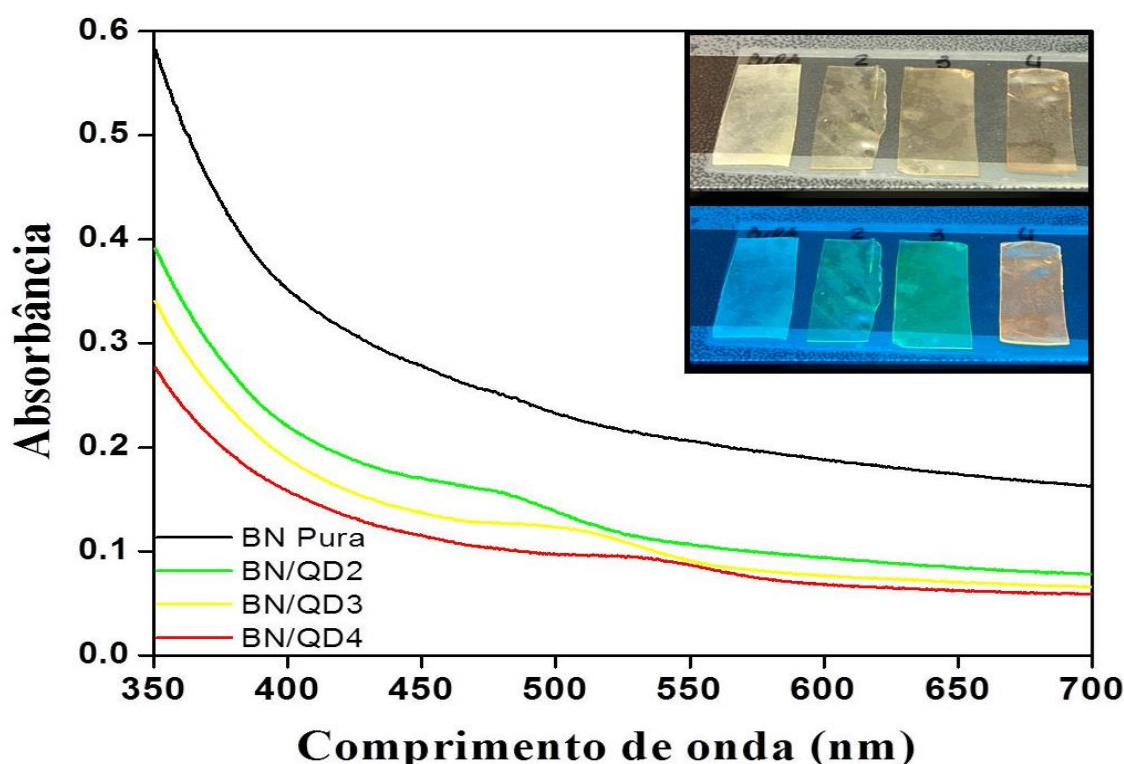


Figura 52 - Espectroscopia UV-Vis para os filmes de BN pura e para as diferentes membranas de BN/QD.
Inset: imagem das membranas com e sem a incidência de luz ultravioleta.

6.4.2 Espectroscopia de Fluorescência

Neste item são apresentados os espectros de fluorescência obtidos para as membranas de BN/QDs usando a linha de excitação 514 nm e os resultados apresentados foram normalizados. Na Figura 52 observa-se um deslocamento nos máximos de emissão das membranas contendo os diferentes QDs. Esse deslocamento corrobora com os resultados mostrados para espectroscopia UV-Vis (Figura 52) indicando que as nanopartículas estão presentes no filme e são de diferentes tamanhos o que acarreta em diferentes comprimentos de onda de emissão, ou seja, os filmes produzidos com o látex e as soluções de QDs emitem em diferentes faixas do espectro visível.

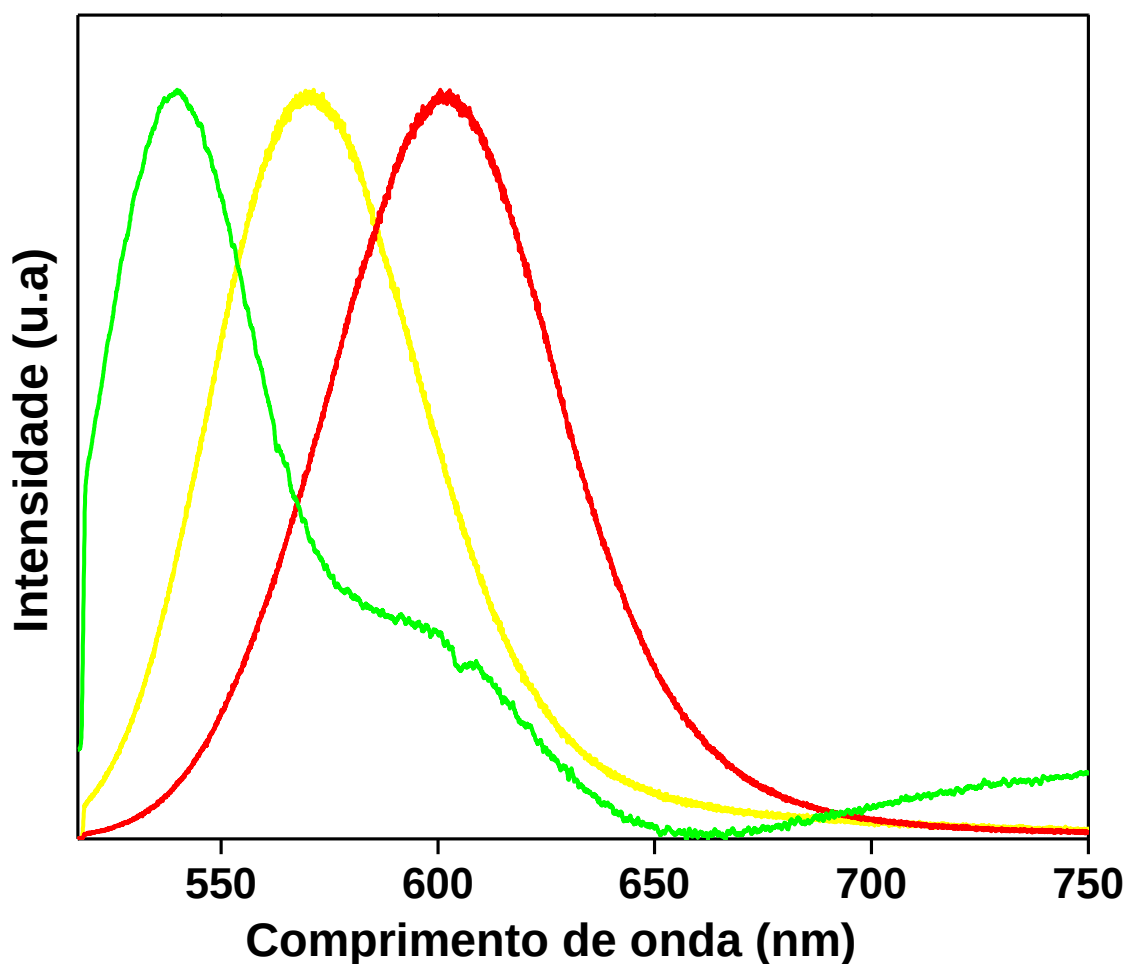


Figura 53 - Espectro de fluorescência dos filmes BN/DQ2, BN/QD3 e BN/QD4. Linha de excitação 514 nm.

Assim podemos concluir que a metodologia utilizada para fabricação dos filmes é eficiente quando o objetivo é se obter filmes de matriz polimérica com nanopartículas fluorescentes.

6.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise Elementar por Raios –X

Foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de varredura e também foi realizada a análise elementar das membranas de BN/QDs-CdTe, sendo esses resultados apresentados a seguir. Antes da realização das imagens e análise as membranas passaram por um processo de recobrimento com carbono para que se tornassem condutivas, visto que a borracha natural é um material isolante.

Na Figura 54 é apresentado uma imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para o filme BNQDs, no entanto não se pôde destacar a presença das partículas de QDs visto que essas são muito pequenas e estão em uma faixa de tamanho que varia entre 5 nm a 10 nm, e com o auxílio do MEV não temos sensibilidade suficiente para “vê-las”[78].

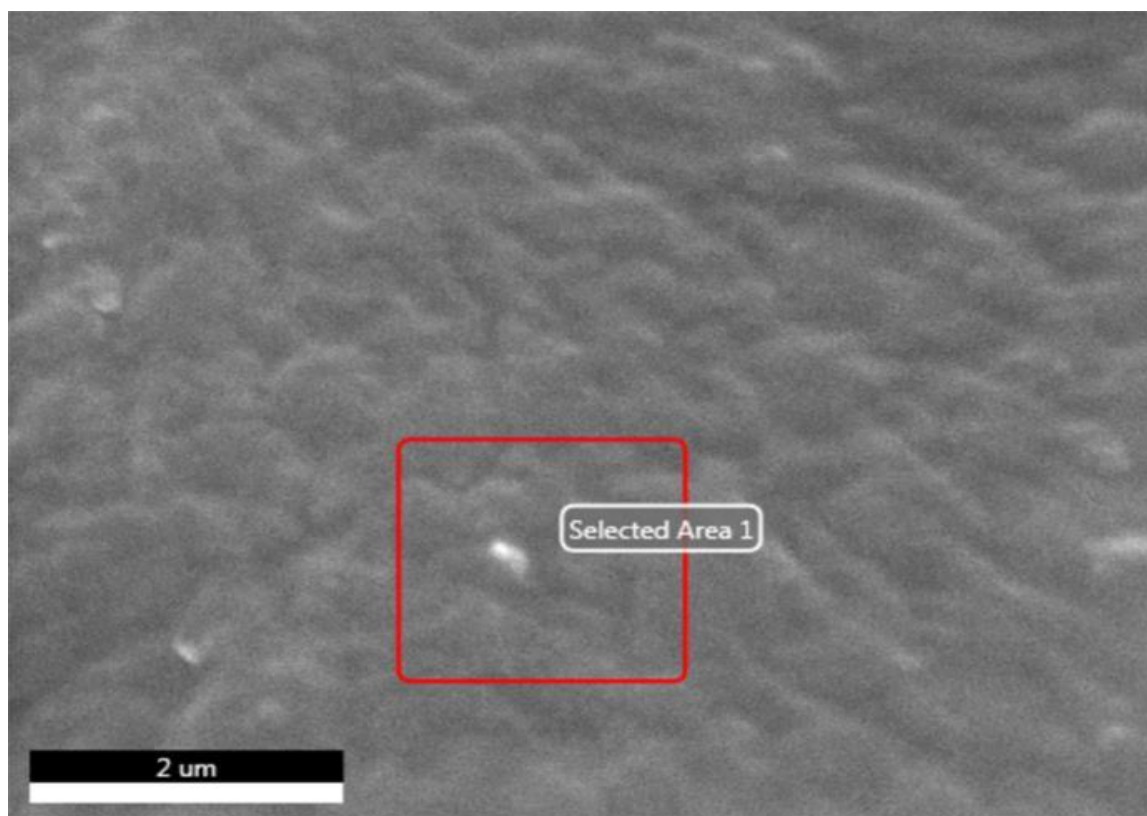


Figura 54 - Imagem de MEV para a membrana de BN/QD.

Na Figura 54 podemos observar também uma área em destaque (*Selected Area 1*) onde foi realizada a análise elementar por EDS do filme BN/QD4 e os resultados dessa análise são mostrados na Tabela VI que é apresentada da mesma forma que foi gerada no processo de análise e foi destacado a presença dos elementos Cd e Te que são os elementos formadores das nanopartículas semi condutoras utilizadas na fabricação do filme.

Tabela VIII - Resultado da análise elementar do filme BNQD4.

Element	%	%	NetInt	Error%	Kratio	Z	R	A	F
CK	92.02	94.24	8,048.40	2.47	0.83	1.01	1	0.9	1
OK	7.12	5.48	198.53	12.51	0.01	0.95	1.02	0.15	1
MgK	0.35	0.18	67.99	11.83	0.00	0.87	1.04	0.78	1
SK	0.21	0.08	35.34	25.15	0.00	0.84	1.06	1.01	1
CdL	0.17	0.02	10.11	28.86	0.00	0.61	1.25	1.14	1
TeL	0.13	0.01	4.90	58.11	0.00	0.57	1.25	1.12	1

Com a análise das informações contidas na Tabela VI pode-se confirmar a incorporação dos *quantum dots* de Cádmio e Telúrio, na estrutura polimérica, devido a presença desse elementos no filme analisado, confirmando assim que a borracha natural pode sim ser utilizada como matriz flexível para nanopartículas fluorescentes.

Sendo essa parte do trabalho realizado em parceria com o Dr. Igor O. Osorio-Román, como citado anteriormente, este cedeu uma imagem obtida por microscopia de transmissão eletrônica (TEM) dos QDs [100] que foram obtidos pelo mesmo método de síntese apresentado anteriormente; a imagem é apresentada na Figura 55.

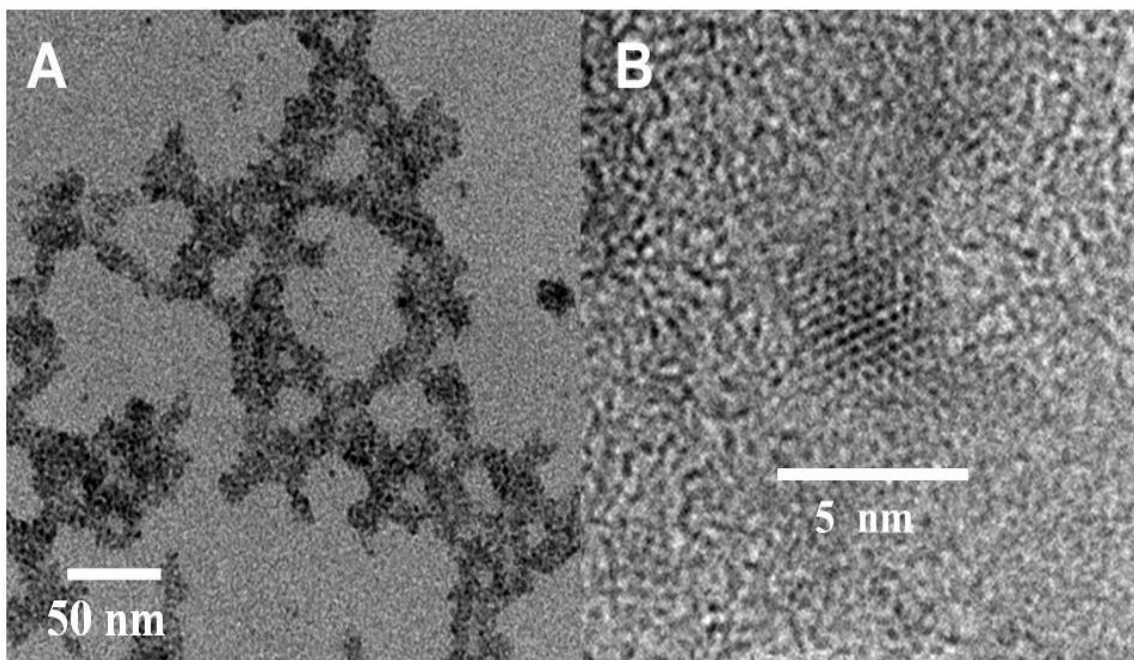


Figura 55 – Imagem de microscopia de transmissão eletrônica (TEM) da solução de DQs. [100]

Na Figura 55(a) se observa a imagem de microscopia da solução de QDs e é possível notar partículas agregadas e na Figura 55(b) têm-se uma imagem onde se observa apenas uma partícula de QD-CdTe e essa estrutura tem tamanho em torno de 5 nm; os pontos mais escuros representam cada átomo que à forma; esse resultado corrobora os resultados apresentados anteriormente.

6.4.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Neste item são apresentados os resultados obtidos por microscopia de força atômica (AFM). Na Figura 56 estão as imagens de AFM para os filmes de borracha natural pura e para os filmes contendo *quantum dots*.

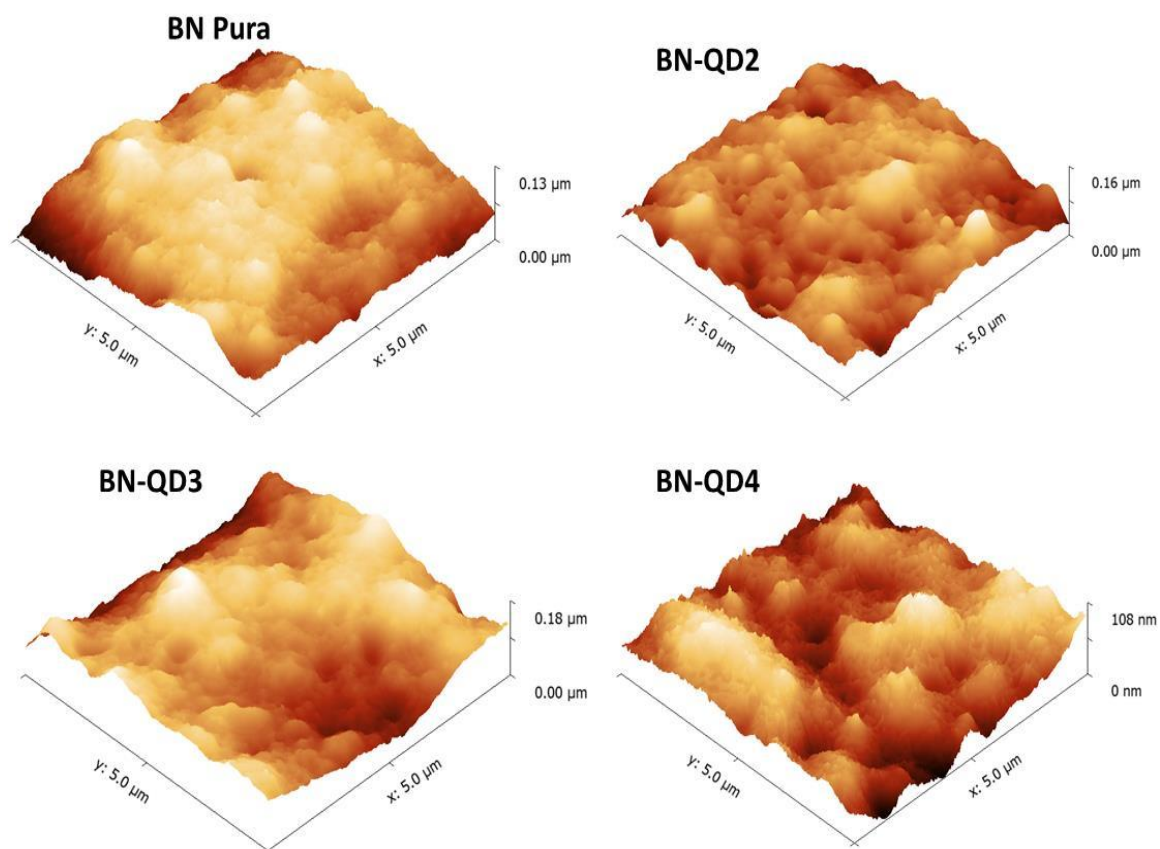


Figura 56 - Imagens de AFM pra os filmes de BN Pura e BN/QD1, BN/AD2, BN/QD3 e BN/QD4.

Fazendo uma análise comparativa entre as imagens apresentadas na Figura 56 nota-se que a estrutura superficial da matriz polimérica não sofre modificações significativas quanto ao seu relevo. Essa constância no relevo da matriz pode estar associada ao fato de as partículas semicondutoras incorporadas apresentarem dimensões muito reduzidas, como é mostrado na Figura 56 (a) e (b).

Capítulo 7 – Conclusão

Para o trabalho apresentado foi realizado um estudo bibliográfico englobando os temas nele abordado, tais como látex, borracha natural e suas aplicações diversas, avaliações e citotoxicidade e biomateriais, filmes fluorescentes flexíveis, *quantum dots* e aplicações.

O filme de borracha natural age como substrato ativo no processo de síntese de nanopartículas de prata podendo ser considerada um reator para a reação química de formação destas.

A presença das nanopartículas metálicas de prata no filme de BN é confirmada por espectroscopia de Ultravioleta Visível, devido o aparecimento de uma banda simétrica, referente ao *plasmon* de superfície dessas partículas, essa banda, centrada em 430 nm é um indicativo característico deste metal em específico. É possível observar também que o valor máximo da absorbância para as bandas de cada filme se desloca para maiores comprimentos de onda, indicando crescimento de partícula, então todo o processo de nucleação, crescimento e estabilização da nanopartícula ocorre na estrutura do filme, ficando este “impregnado” com as nanopartículas metálicas, assim podemos concluir que as AgNPs se formam no filme de BN e todo o processo de crescimento acontece nele.

Com o auxílio da Espectroscopia de Infravermelho foi possível observar algumas mudanças estruturais no filme, o que nos leva a propor um mecanismo de como as AgNPs estão se formando na matriz polimérica. Algumas bandas, (1654 cm^{-1} , 1445 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} , 1307 cm^{-1} e 1240 cm^{-1}), relacionadas ao grupamento funcional amida (R-CO-NR_2), ligada às proteínas presente na borracha natural, sofrem diminuição de intensidade, sendo este um indicativo do desaparecimento de tais grupos com o transcorrer do tempo de síntese e portanto de formação de nanopartículas.

Por outro lado, é possível notar o aparecimento de uma banda em 1515 cm^{-1} que aumenta de intensidade a medida que o tempo de redução aumenta, essa banda é

característica do grupamento amina (R_2-NH) e seu aparecimento é diretamente ligada ao aparecimento deste grupo funcional, que seria um dos possíveis produtos de reação entre o grupo amida e íons de prata (Ag^+); portanto sobre o ponto de vista químico, podemos associar estes grupos como responsáveis pelo processo de redução do íon prata (Ag^+) em prata metálica (Ag^0) no filme de borracha natural.

Analisando as imagens obtidas com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi possível demonstrar a presença das AgNPs na estrutura do filme de BN, e estimar o tamanho das mesmas, que ficam em torno de 25 nm a 60 nm e a análise elementar por EDS confirma a identidade dessas NPs como sendo de prata.

A presença dessas nanopátulas na estrutura do filme gera modificações em sua superfície, diminuindo a rugosidade da mesma, comprovada nas imagens obtidas por microscopia de força atômica (AFM), e com isso podemos propor que as AgNPs se formam na estrutura do filme ocupando suas irregularidades superficiais.

A análise térmica, realizada por DSC, mostra que o processo de síntese, que é realizado em solução de nitrato de prata à temperatura de 80°C não gera danos à estrutura da borracha natural, uma vez que o valor para a transição vítrea se mantém inalterado mesmo após o maior tempo de síntese que é de duas horas.

Para a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade foram obtidos extratos líquidos para os diferentes filmes obtidos com AgNPs, ou seja, os filmes foram colocadas em meio líquido para se conhecer se essas eram capazes de liberar prata para tal líquido; a análise desses extrato foi realizada com o auxílio da técnica de Espectroscopia de Emissão Óptica acoplado a Plasma Induzido (ICP-OES), onde se pode identificar que apenas os filmes de BN/Ag30' e BN/Ag60' são capazes de liberar prata em solução, no entanto essas quantidades são baixas, em torno de 0.17 $\mu g/mL$ e 0.08 $\mu g/mL$ respectivamente; os filmes que foram obtidas com maiores tempos de redução, BN/Ag90' e BN/Ag120' não liberaram e/ou a

liberação de prata ficou abaixo do limite de detecção do equipamento que é de 0.029 µg/mL.

Em relação aos testes de citotoxicidade foi possível verificar que os extratos líquidos, utilizando o meio de cultura como veículo extrator, e a membrana de BN pura como material sólido, são citotóxicos para as linhagem celular estudada, resultado este que condiz com o apresentado na literatura. Assim, o veículo extrator utilizado foi a água, uma vez que este não gera danos metabólicos às células utilizadas; os resultados utilizando água como veículo extrator, e as membranas de BN pura e BN/Ag nos diferentes tempos de redução, não apresentam citotoxicidade, para a linhagem celular estudada. Assim pode-se concluir que as membranas de BN pura e com diferentes concentrações de prata, BN/Ag30', BN/Ag60', BN/Ag90' e BN/Ag120', não são citotóxicas, apresentando viabilidade celular acima dos 70%.

A avaliação da citotoxicidade por MTT foi complementada com as análises de contato direto e adesão celular que ao se observar os resultados se confirma a não citotoxicidade dos filmes de BN e BN/Ag.

Os testes de danos ao DNA, mostrou que as membranas contendo AgNPs também não são passivas de causar danos ao código genético das linhagens celulares estudadas, podendo-se então concluir que esse material também não é genotóxico.

Já em relação às membranas flexíveis fluorescentes, os resultados apresentados referem-se a um estudo inicial sobre a possibilidade de aplicação de látex de borracha natural para a formação de um substrato flexível para os QDs, uma vez que ao se agregar uma solução de QDs ao látex suas propriedades fluorescentes são mantidas. Assim, levando em consideração os resultados apresentados, pôde-se concluir que a incorporação dos *quantum dots* na matriz polimérica flexível de borracha natural, foi possível e que a morfologia do filme não é afetada, gerando então um filme flexível fluorescente.

Capítulo 8 – Perspectivas Futuras

Os dados apresentados até aqui são resultados obtidos durante os anos de realização do Doutorado, no entanto ainda temos muito à desvendar sobre o processo de síntese de nanopartículas metálicas utilizando a borracha natural, assim, como perspectiva futura neste âmbito acredito que estudos como variação do tamanho da membrana polimérica, assim como variação de pH da solução de nitrato de prata sejam um bom caminho para melhor elucidar todo o processo que envolve estes materiais.

Em relação aos testes biológicos este material, membranas de BN/Ag, são promissores, pois como já vimos não causam danos ao metabolismo celular nem ao DNA das células utilizadas nesse trabalho, porém esses foram apenas os primeiros passos de uma longa caminhada para enquadrar este como um biomaterial, assim mais testes neste sentido são bem vindos para o conhecimento do mecanismo de interação das membranas de BN/Ag com alguns organismos vivos; um passo futuro que deixo aqui sugerido é a realização de estudos bactericidas para este material, uma vez que a prata já é um conhecido aliado contra bactérias de vários tipos.

Com o intuito de novas aplicações para a borracha natural como um nanocompósito de matriz flexível fluorescente iremos estudar mais a fundo a interação entre este polímero natural e as nanopartículas semicondutoras.

Estudos físicos e químicos mais aprofundados como: distribuição de partículas na matriz, estudos relacionando a intensidade de fluorescência à proporção matriz/solução de QDs, entre outros, para um melhor conhecimento deste novo material serão ainda realizados como um trabalho futuro visando projeto de Pós Doutorado.

Capítulo 9 – Referências Bibliográficas

-
- [1] BIJU, V. et al. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications. *Anal Bioanal Chem*, 391:2469–2495, 2008.
- [2] Adaptada de: *Química Viva*, vol 11, nº 3, 2012.
- [3] FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, v. 23, p. 22 – 36, 1960.
- [4] Acesso em: <http://www.bmwusa.com/bmw/BMWi>.
- [5] Acesso em: <http://ocsial.com/en/application/nanocomposites>
- [6] RASHEED, P.A.; Sandhyarani, N. Graphene-DNA electrochemical sensor for the sensitive detection of BRCA1 gene. *Sensors and Actuators B*; 204; 777–782; 2014.
- [7] LIN, J-H.; TSENG, W-L. Ultrasensitive detection of target analyte-induced aggregation of gold nanoparticles using laser-induced nanoparticle Rayleigh scattering. *Talanta*; 132; 44–51; 2015.
- [8] RATHNAYAKE, I. *et al.* Imparting Antimicrobial Properties to Natural Rubber Latex Foam via Green Synthesized Silver Nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*; 2014.
- [9] MAKWANA, B.A. *et al.* Highly stable antibacterial silver nanoparticles as selective fluorescent sensor for Fe³⁺ ions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*; 134; 73–80; 2015.
- [10] GUO, L. *et al.* Single plasmonic nanoparticles for ultrasensitive DNA sensing: From invisible to visible. *Biosensors and Bioelectronics*. 79, 266–272, 2016.
- [11] CABRERA, F. C. *et al.* Portable smart films for ultrasensitive detection and chemical analysis using SERS and SERRS. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2011.
- [12] HU, Z. *et al.* In-situ synthesis of metal nanoparticle-polymer composites and their application as efficient interfacial materials for both polymer and planar heterojunction perovskite solar cells. *Organic Electronics*, 27, 46-52, 2015.
- [13] GUIDELLI, E. J. *et al.* Silver nanoparticles delivery system based on natural rubber latex membranes. *Journal of Nanopart Research.*, 15, 1536, 2013.
- [14] GUIDELLI, E. J. *et al.* Green synthesis of colloidal silver nanoparticles using natural rubber latex extracted from *Hevea brasiliensis*. *Spectrochimica Acta Part A* 82; 140– 145; 2011.
- [15] WONG, Y; YUEN, H; LEUNG,C; KU, C; LAM, H. Selected applications of nanotechnology in textiles autex. *China : Research Journal*, 6, 1, 2006.
- [16] XIN, J. H. *Nanotechnology for Textiles and Apparel*. China: The Technology Symposium for Textiles and Apparel 2009.
- [17] REIS, E. A. P.; RUIZ, M. R.; JOB, A. E. ; AGOSTINI, D. L. S. ; BUDEMBERG, E. R. ; SANTOS, R. J. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201500153, "Compósito com propriedade antiestática à base de resíduos de couro". Data de depósito: 23/01/2015.
- [18] SETHURAJ, M.R. *Natural Rubber, Biology, Cultivation and Technology*. Elsevier Sci., Netherlands, 1992.
- [19] SOUTHORN, W.A.; YIP, E. J. *Rubb. Res. Inst. Malaya*, 20, 1968.
- [20] RIPPEL, M.M.; GALEMBECK, F. *Nanostructures and Adhesion Rubber: New Era for Classic Journal of Brazilian Chemical Society*, 20; 6;1024-1030, 2009.

-
- [21] SETHURAJ, M.R.; MATHEW, N.M. Natural Rubber. Biology, Cultivation and Thechnology. Elsevier Science, Netherlands, 1992.
- [22] NAWAMAWAT, K. et al. Surface nanostructure of Hevea brasiliensis natural rubber latex particles. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects; 390; 157-166; 2011.
- [23] TARACHIWIN, L. *et al.* Structural Characterization of r-Terminal Group of Natural Rubber. 2. Decomposition of Branch-Points by Phospholipase and Chemical Treatments. Biomacromolecules. 6; 4; 1858-63, 2005.
- [24] BITTENCOURT. A, M, B. et al. Aggregation Stability Of Natural Rubber Latex With Low Dry Rubber Content (DRC) in Acidic Medium. Polymer Bulletin, v. 40, n. 1, p. 111-116, jan. 1998.
- [25] FERREIRA, M. *et al.* Angiogenic Properties of Natural Rubber Latex Biomembranes and The Serum Fraction of *Hevea brasiliensis*. Brazilian Journal of Physics, 39, 3, September, 2009.
- [26] PINHO, E.C.C.M. de et al. Uso Experimental da Biomembrana de Látex na Reconstrução Conjuntival. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, n. 67, n. 1, p. 27-32, 2004.
- [27] ISSA , J.P.M. *et al.* Bone Repair Investigation Using rhBMP-2 and Angiogenic Protein Extracted From Latex. MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE 75; 145–152, 2012.
- [28] RATHNAYAKE, W.G.I.U *et al.* Synthesis and characterization of nano silver based natural rubber latex foam for imparting antibacterial and anti-fungal properties. Polymer Testing. 31; 586–592; 2012.
- [29] JAMAL, E. M. A. *et al.* Synthesis of nickel–rubber nanocomposites and evaluation of their dielectric properties. Materials Science and Engineering B. 156; 24–31; 2009.
- [30] CABRERA, F. C. *et al.* Characterization of Natural Rubber/Gold Nanoparticles SERS-Active Substrate. J. APPL. POLYM. SCI. 186 – 192; 2013.
- [31] A. RAHIMI, A.; MASHAK, A. Review on rubbers in medicine: natural, silicone and polyurethane rubbers. Plastics, Rubber and Composites . 42; 6; 223 – 230; 2013.
- [32] REIS, M. C. (2013). Sistema Indutor de Neoformação Tecidual para Pé Diabético com Circuito Emissor de Luz de LEDs e Utilização do Látex Natural. Tese de Doutorado em Engenharia Elétrica, Publicação PGEA.TD-083/2013, Departamento de Engenharia Elétrica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 163p.
- [33] MODY, V. V.; SIWALE, R.; SINGH. A.; MODY, H. R. Introdution to Metallic Nanoparticles. Journal of Pharmacy & BioAliied Sciences. 2, 4; 282 – 289. 2010.
- [34] CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoproduct in medical application. Toxicology Letters. Tuebingen, n.176, p.1-12, 2008.
- [35] CRESPIELHO, F. N.; et al. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles. Journal of physical Chemistry B, Washington, v.110, n.35, p.17478-17483, 2006.
- [36] GLIGA, A. R. et al. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. Particle and Fibre Toxicology 2014, 11.
- [37] GIBBS, R. J. Silver Colloids: *Do they work*. [S. l.]: Edicao do Autor, 1999.
- [38] NOWACK B, KRUG HF, HEIGHT M: 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. Environ Sci Technol 2011, 45(4):1177–1183.

-
- [39] POIRIER, M. et al. Interaction between silver nanoparticles of 20 nm (AgNP20) and human neutrophils: induction of apoptosis and inhibition of de novo protein synthesis by AgNP20 aggregates. *J. Appl. Toxicol.* 2014; 34: 404–412.
- [40] MONTEIRO, D. R. *et al* The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int. J. Antimicrob Agents*; 34:103-10, 2009.
- [41] BÜRGERS R, et al. The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol*; 54:595-601, 2009.
- [42] KIM, K. J, *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals*; 22:235-42; 2009.
- [43] PANÁČEK A, *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 2009;30:6333-40.
- [44] MORONES, J.; ELECHIGUERRA, J.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, Bristol, v. 16, p. 23462353, 2005.
- [45] DASTJERDI, R., MONTAZER, M.; A review on the application of inorganic nanostructured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, p. 5-18, 2010.
- [46] WONG, K. K. Y.; LIU, X. Silver Nanoparticles – The Real “Silver Bullet” in Clinical medicine? *Med. Chem. Commun*, v.1, pp.125-131, 2010.
- [47] LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D.Y.; BRUNET, L.; LIGA, M.V.; LI, D.; ALVAREZ, P.J.J.; Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, v. 42, p. 4591-4602, 2008.
- [48] PARK, J; LAKES, R. S. “Biomaterials – An Introduction”. Springer. 3ª edição. p. 2; 2007.
- [49] GÁLIA, C. A; et al. “Uso de enxerto homólogo e heterólogo em diáfise femoral de ratos: comparação entre enxerto ósseo congelado e liofilizado”. *Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia*. 2005.
- [50] <http://www.integralife.com/index.aspx?redir=Soft+Tissue>. Acesso em 01/03/2016.
- [51] PINHO, R. *et al.* Falência de artroplastia total do joelho primária e sua revisão - um caso extremo de hipersensibilidade aos metais. *Portuguese Journal of Orthopaedics and Traumatology*. 23(2): 177-184, 2015.
- [52] MAIA, M. *et al.* Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 25(3), 566-72, 2010.
- [53] PARIDA, P.; BEHERA, A.; MISHRA, S. C. Classification of Biomaterials used in Medicine. *International Journal of Advances in Applied Sciences (IJAAS)*, 1, 3, 31 – 35, 2012.
- [54] Norma I.S. EN ISO 10993-5 (2009) (English): Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [Authority: The European Union Per Directive 90/385/EEC].
- [55] Norma ASTM F813 - Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices. 2012.
- [56] Norma ASTM F 619/14. Standard Practice for Extraction of Medical Plastics. 2014.
- [57] AZEVEDO, A. P. G. B. et al. Uso da Informação de Patentes para Estudo dos Métodos de Avaliação de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao Uso de Animais. *Cadernos de Prospecção* , 8, .2, 213-221. 2015.

-
- [58] RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. *Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier: Oxford. Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. 2013.
- [59] LIANG, R. *et al.* Quantum Dots-Based Flexible Films and Their Application as the Phosphor in White Light-Emitting Diodes. *Chemistry of Materials*, 26, 2595–2600, 2014.
- [60] ZHU, L. *et al.* Photoluminescent poly(ether ether ketone)–quantum dot composite films. *Chem. Commun.*, 49, 5283, 2013.
- [61] WOELFLE, C., CLAUS, R. O. Transparent and flexible quantum dot–polymer composites using an ionic liquid as compatible polymerization medium. *Nanotechnology*. 18, 025402, 2007.
- [62] ZHU, J. *et al.* Ionic liquid assisted electrospinning of quantum dots/elastomer composite nanofibers. *Polymer* 52, 1954-1962. 2011.
- [63] JIN, F. *et al.* A facile layer-by-layer assembly method for the fabrication of fluorescent polymer/quantum dot nanocomposite thin films. *RSC Adv.*, 4, 33206, 2014.
- [64] ROSSETTI, R., BECK, B. M.; BRUS, L. E. Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution. *J. Chem. Phys.* 79, 1086–1088, 1983.
- [65] EKIMOV, A.I.; EFROS, A.L.; Onushchenko, A.A. Quantum size effect in semiconductor microcrystals. *Solid State Commun.*, 56, 921–924, 1985.
- [66] DRUMMEN, G. P. C. Quantum Dots—From Synthesis to Applications in Biomedicine and Life Sciences. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 154-163. 2010.
- [67] BRUS, L. E. Kavli Prize Lecture: Semiconductor Nanocrystals; disponível em: <http://go.nature.com/jI95ft>.
- [68] Ioannou, D. and Griffin, D. K. Nanotechnology and molecular cytogenetics: the future has not yet arrived. Disponível em: <http://www.nano-reviews.net/index.php/nano/article/view/5117>.
- [69] BRUS, L. E. Commentary: Carbon Nanotubes, CdSe Nanocrystals, and Electron-Electron Interaction. *Nano Letters*, 10, 363 – 365, 2010.
- [70] WANG, H. Transparent, flexible and luminescent composite films by incorporating CuInS₂ based quantum dots into a cyanoethyl cellulose matrix. *RSC Advances*, 2, 2675–2677, 2012.
- [71] NOGUEZ, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The influence of shape and physical environment. *Journal of Physical Chemistry*. Washington, v.11, p.3806-3819, 2007.
- [72] SKOOG, D. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª edicao, Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.
- [73] BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 35, 4, 369–430; 2002.
- [74] STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd. 2004.
- [75] Acesso em: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>. Data de acesso: 11/08/2015.
- [76] *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Three – Volume Set. 1999.
- [77] ALCANTARA JR, P. *Espectroscopia Molecular*. Curso. Física Moderna II. 2002.
- [78] DEDAVID, B. A.; GOMES, I. C.; Machado, G. *Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras, materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. 2007.

-
- [79] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods*, v.65, p.55-63, 1983
- [80] CAVALCANTE, D. G.S.M.; *et al.* Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of biodiesel produced by different routes on ZFL cell line. *Toxicology in Vitro*. V. 28, 6, 1117–1125, 2014.
- [81] CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. V. 655, 1 – 2, 2008.
- [82] GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*. 94, 1-2, 57-63, 1986.
- [83] SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE R.R.; SCHNEIDER E.L. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184-191, 1998.
- [84] CAVALCANTE, DALITA GOMES SILVA MORAIS. Biomarcadores genéticos e bioquímicos para avaliar os efeitos do biodiesel, por meio de bioensaios in vivo e in vitro. Tese (doutorado), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 2012.
- [85] KOBAYASHI, H.; SUGUYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun*, 3:103–115, 1995.
- [86] TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221, 2000.
- [87] ZHANG, Y. *et al.* Morphology and Antibacterial Properties of Natural Rubber Composites Based on Biosynthesized Nanosilver. *Journal of Applied Polymer Science*. 2014.
- [88] YING, E. *et al.* Synthesis and Bio-Imaging Application of Highly Luminescent Mercaptosuccinic Acid-Coated CdTe Nanocrystals. *PLoS ONE* 3(5): e2222. doi:10.1371/journal.pone.0002222, 2008.
- [89] PÉREZ-DONOSO, J. M., *et al.* Biomimetic, Mild Chemical Synthesis of CdTe-GSH Quantum Dots with Improved Biocompatibility. *PLoS ONE* 7(1): e30741. doi:10.1371/journal.pone.0030741. 2012.
- [90] MONTEIRO, R. D. *et al.* Silver Distribution and Release from an Antimicrobial Denture Base Resin Containing Silver Colloidal Nanoparticles. *Journal of Prosthodontics*. v. 21; 7–15; 2012.
- [91] QIN, Y. *et al.* Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 372, 172–176; 2010.
- [92] KONG, J.; YU, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39, 8, 549–559, 2007.
- [93] TAMM, L. K.; TATULIAN, S. A. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Quarterly Reviews of Biophysics* 30, 4, 365 – 429, 1997.
- [94] ANTONIA, A.C.D., MARTINS, M. A., MORENO, R.M.B., MOTTOSO, L.H.C., GONÇALVES, P.S., JOB, A.E., Caracterização Mecânica e Térmica da Borracha Natural Formulada e Vulcanizada dos Clones: GT 1, IAN 873, PB 235 e RRIM 600. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v 19, p. 63-71. 2009.
- [95] BAEK, H. S. Evaluation of the Extraction Method for the Cytotoxicity Testing of Latex Gloves. *Yonsei Medical Journal*. vol. 46, n. 4, 579 - 583, 2005.
- [96] NOGUEIRA, P.F. M.; PAINO, I. M. M.; ZUCOLOTTI, V. Nanosilver: Properties, Applications and Impacts on Health and Environment. *Vigilância Sanitária em Debate*. 1, 4, 59-71. 2013.

-
- [97] DE SOUZA, T.A.J., FRANCHI, L.P., TAKAHASHI, C.S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles of Different Sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 Cell Lines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. In Press, Accepted Manuscript, Available online 19 November 2015.
- [98] KABA, S.I.; EGOROVA, E.M. In Vitro Studies of the Toxic Effects of Silver Nanoparticles on HeLa and U937 Cells, *Nanotechnol. Sci. Appl.*, 8, 19-29, 2015.
- [99] ZHANG, T.; WANG, L.; CHEN, Q.; CHEN, C. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles, *Yonsei Medical Journal*, 55 283-291, 2014.
- [100] RIVEROS A. L., et al. Capping Biological Quantum dots with the Peptide CLPFFD to Increase Stability and to Reduce Effects on Cell Viability. *Nanoscience and Nanotechnology*. 2015 .