

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS
DE FILMES DE NANOCELULOSE E
NANOPARTÍCULAS DE PRATA

CASSIANO HEITOR SANTOS DE MEDEIROS

ORIENTADORA: DRA. ADRIANA DE OLIVEIRA DELGADO SILVA

COORIENTADORA: DRA. ELIDIANE CIPRIANO RANGEL

Sorocaba - SP
Março/2019

Medeiros, Cassiano Heitor Santos de

Estudo das Propriedades Antimicrobianas de Filmes de Nanocelulose e Nanopartículas de Prata / Cassiano Heitor Santos de Medeiros. -- 2019.
76 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva
Banca examinadora: Dra. Marina de Moraes Lessa, Dr. Giovanni Pimenta Mambrini

Bibliografia

1. Nanopartículas de Prata. 2. Nanocelulose. 3. Atividade antimicrobiana.
I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Cassiano Heitor Santos de Medeiros, realizada em 28/03/2019:

Adriana de O. O. Silva

Profa. Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva
UFSCar

Giovanni P. Mambrini

Prof. Dr. Giovanni Pimenta Mambrini
UFSCar

Marina

Profa. Dra. Marina de Moraes Lessa
ESAMC - Sorocaba



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS
DE FILMES DE NANOCELULOSE E
NANOPARTÍCULAS DE PRATA

CASSIANO HEITOR SANTOS DE MEDEIROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal de São Carlos Campus Sorocaba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais, área de concentração: Nanotecnologia e Nanociência de Materiais.

Orientadora: Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva.

Coorientadora: Dra. Elidiane Cipriano Rangel

Sorocaba - SP
Março/2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE FILMES DE
NANOCELULOSE E NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

CASSIANO HEITOR SANTOS DE MEDEIROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal de São Carlos Campus Sorocaba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais, área de concentração: Nanociência e Nanotecnologia de Materiais.

Aprovado em 28 de Março de 2019.

Membros da Banca:

Prof.^a Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva
Universidade Federal de São Carlos- UFSCar (Orientadora – DC-UFSCar)

Prof. Dr. Giovanni Pimenta Mambrini
Universidade Federal de São Carlos- UFSCar (DC-UFSCar)

Prof.^a Dra. Marina de Moraes Lessa
Escola Superior de Administração, Marketing e Comunicação- ESAMC

Sorocaba - SP
Março/2019

Dedico este trabalho ao meu irmão Fabiano

À Universidade Federal de São Carlos Campus Sorocaba, seus professores e funcionários.

Aos meus pais Lázaro e Angelita, que sempre foram referência de perseverança e dedicação ao trabalho e aos desafios.

À minha querida esposa Bruna, sempre ao meu lado nos momentos de sucessos e insucessos ocorridos durante a pesquisa, pela sua parceria e incentivo ao meu pleno desenvolvimento acadêmico.

A todos os meus familiares, pela compreensão em relação às minhas ausências e pelo incentivo permanente.

À prof.^a Marina, pela amizade e influência sempre positiva em relação à pesquisa científica.

Aos professores Giovanni Mambrini, Iolanda Duarte, Aparecido Junior e Fábio Leite, por todo o suporte relacionado aos reagentes, laboratórios e equipamentos que foram cedidos para a realização deste trabalho.

À minha Coorientadora Dra. Elidiane Rangel, pela disponibilidade e oportunidade de troca de experiências nas aulas de Plasma e experimentos de deposição a plasma realizados no LapTec - Laboratório de Plasmas Tecnológicos da UNESP *campus* Sorocaba.

Aos meus colegas Rafael Ribeiro, Larissa Almeida e Lucas pelo suporte técnico experimental dentro do LapTec.

Às minhas colegas Larissa Mendes, Amanda Souza, Jéssica Assumpção, Akemi Higa, Maria Menck e Gabriela da Silva pela parceria e colaboração em diversas etapas desde projeto, desde a troca de experiências até ao auxílio nos experimentos e caracterizações.

À minha orientadora Dra. Adriana de O. Delgado Silva, pela paciência e pelos direcionamentos prestados, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

"Podemos facilmente perdoar uma criança que tem medo do escuro.

A real tragédia da vida é quando os homens têm medo da luz."

Alegoria da Caverna - Platão

RESUMO

A prata é um elemento com reconhecida atividade bactericida. Seu uso na modificação de materiais vem sendo estudado há décadas e seu emprego passa por diferentes formas de incorporação nas matrizes de interesse, quais sejam instrumentos cirúrgicos, próteses, válvulas cardíacas, tecidos, produtos de higiene pessoal e recipientes para alimentos. O presente trabalho de pesquisa pretende analisar o desempenho antimicrobiano agregado em filmes de nanocelulose contendo nanopartículas de prata (AgNPs). Foram produzidos filmes nanocompósitos através de uma suspensão de nanocelulose vegetal e AgNPs sintetizadas utilizando o citrato de sódio como agente redutor e estabilizador, a técnica baseia-se na adaptação de um sistema de filtração à vácuo e posterior secagem em sistema de fabricação própria. A caracterização dos filmes nanocompósitos, em relação às suas propriedades antimicrobianas foi realizada através da técnica de disco-difusão em ágar em triplicata de amostras teste incubadas por 24 horas a 35 °C em placas Petri cultivadas com as cepas de microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bastante presentes em surtos de infecção hospitalar. Análises de UV-Vis foram conduzidas na suspensão aquosa de AgNPs que indicaram a presença de partículas com dimensão entre 35 e 50 nm. A espessura média dos filmes retirados do sistema de secagem com 3 dias e 7 dias de “cura” foram $112 \pm 7 \mu\text{m}$ e $93 \pm 5 \mu\text{m}$, respectivamente. Resultados de concentração atômica de prata tiveram valor médio de $0,18 \pm 0,07\%$ com máxima concentração de $0,29 \pm 0,09\%$. Após medição dos halos de inibição formados, com valor médio de $7,2 \pm 0,2 \text{ mm}$ contra *S. aureus* e $7,7 \pm 0,3 \text{ mm}$ contra *P. aeruginosa*, foi possível observar com sucesso o efeito antimicrobiano nos filmes NC-AgNPs obtidos. Outras técnicas como microscopia eletrônica de varredura, ângulo de contato e espectroscopia na região do infravermelho por reflectância total atenuada também foram conduzidas para determinação da morfologia, molhabilidade e grupos funcionais característicos dos filmes.

Palavras-chave: AgNPs, nanocelulose, deposição por plasma, compósitos, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Silver is an element with widely recognized bactericidal activity. Its use in the modification of materials has been studied for decades and its use goes through different forms of incorporation in the matrices of interest, such as surgical instruments, prostheses, heart valves, tissues, personal hygiene products and food containers. The present work intends to analyze the antimicrobial performance aggregated in nanocellulose films containing silver nanoparticles (AgNPs). Nanocomposite films were produced through a suspension of vegetable nanocellulose and AgNPs synthesized using sodium citrate as reductant and stabilizer, the technique is based on the adaptation of a filtration system to the vacuum and subsequent drying in a system of own production. The characterization of the nanocomposite films in relation to their antimicrobial properties was performed by means of the disc diffusion technique in triplicate of "test" samples incubated for 24 hours at 35 °C in Petri dishes cultivated with the strains of microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, present in outbreaks of hospital infection. UV-Vis analyzes were conducted on the aqueous suspension of AgNPs indicating the presence of particles ranging in size from 35 to 50 nm. The average thickness of the films removed from the drying system at 3 days and 7 days of curing was $112 \pm 7 \mu\text{m}$ and $93 \pm 5 \mu\text{m}$, respectively. Results of silver atomic concentration had a mean value of $0.18 \pm 0.07\%$ with maximum concentration of $0.29 \pm 0.09\%$. After measuring the inhibition halos formed, with an average value of $7.2 \pm 0.2 \text{ mm}$ against *S. aureus* and $7.7 \pm 0.3 \text{ mm}$ against *P. aeruginosa*, it was possible to observe successfully the antimicrobial effect in NC-AgNPs films obtained. Other techniques such as scanning electron microscopy, contact angle and infrared spectroscopy by attenuated total reflectance were also conducted to determine the morphology, wettability and functional groups characteristic of the films.

Keywords: AgNPs, nanocellulose, plasma deposition, composites, antimicrobial activity

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Número de artigos publicados nos tópicos Nanociência e Nanotecnologia nos últimos 20 anos.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 2 - Dados de publicações obtidos entre 1998 e 2017 classificados por tópicos.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 3 - Estrutura química da celulose.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 4 – Ilustração dos métodos utilizados na obtenção de nanopartículas: Top-Down e Bottom-Up.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5 - Representação da estabilização eletrostática (a) e estabilização estérica (b).....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6 – Sistema para produção dos filmes nanocompósitos por filtração à vácuo: (a) desenho esquemático, (b) fotografia.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 7 - Sistema de secagem e armazenamento de filmes nanocompósitos: (a) desenho esquemático, (b) e (c) disposição dos porta-grelhas formando os diferentes compartimentos de armazenamento.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 8 - Diagrama da amostragem de espessura realizada.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 9 – Representação dos tipos possíveis de comportamentos de uma superfície em relação à água.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 10 – (a) Amostras de filmes nanocompósitos submetidas à esterilização por radiação ultravioleta em capela de fluxo laminar. (b) amostras posicionadas sobre placas cultivadas com S. aureus e P. aeruginosa em caldo Müeller-Hinton durante 24h a 37 °C.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 11 - Esquema representativo das placas Petri contendo amostras de teste para caracterização das propriedades antimicrobianas. B= branco.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 12 – (a) Registro fotográfico da suspensão de AgNPs-C. (b) Espectro UV-Vis da suspensão coloidal de prata obtida pela redução química com citrato de sódio. .</i>	<i>45</i>
<i>Figura 13 - Filmes nanocompósitos obtidos após filtração à vácuo</i>	<i>46</i>
<i>Figura 14 - Espessura dos filmes nanocompósitos para 3 e 7 dias de secagem.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 15 - Espectro de ATR-FTIR dos filmes de NC-AgNPs com diferentes concentrações de prata.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 16 - Perfil da gota formada sobre a superfície de nanocelulose</i>	<i>49</i>

<i>Figura 17 – Micrografias dos filmes de nanocelulose com diferentes concentrações de AgNPs e diferentes ampliações da imagem.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 18 – Resultados da concentração atômica de prata na superfície dos filmes nanocompósitos determinada por espectroscopia por energia dispersiva EDS.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 19 - Halos de inibição formados para diferentes suspensões de AgNPs.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 20 – Exemplos de placas de cultura com halo de inibição em torno dos filmes nanocompósitos.</i>	<i>55</i>
<i>Figura 21 – Medição média de halos de inibição formados pelos filmes de NC-AgNPs contra cepas de Staphylococcus aureus.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 22 - Medição média de halos de inibição formados pelos filmes de NC-AgNPs contra cepas de Pseudomonas aeruginosa.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 23 - Estabilização de AgNPs em solvente apolar.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 24 - Polímero do tipo-pente utilizado na imobilização e transporte de fármacos.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 25 - Surfactantes de amônio quaternário (a) DODAB e (b) CTAB.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 26 – Configuração do reator em aço inoxidável de plasma de baixa pressão que será utilizado neste trabalho.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 27 - MEV filmes de nanocelulose após P-III.....</i>	<i>65</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Relação da área superficial específica com o tamanho da partícula</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 2 - Correlação entre tamanhos de nanopartículas de prata e a região do espectro esperada na Espectroscopia UV-Vis.</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 3 – Concentração mínima inibitória (CMI) de nanopartículas de prata sintetizadas com citrato de sódio (AgNP-C) sobre diferentes bactérias.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 4 - Cálculo teórico de massa de prata para cada filme NC-AgNPs.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 5 - Relação de Técnicas de Caracterização utilizadas.</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 6 - Resultados EDS após P-III em filmes de nanocelulose.</i>	<i>66</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.1 CONTEXTO	13
1.1.1 <i>Nanociência e Nanotecnologia</i>	13
1.1.2 <i>Nanopartículas</i>	16
1.1.3 <i>Nanocelulose</i>	18
1.1.4 <i>Métodos Top-Down e Bottom-up</i>	20
1.1.5 <i>Nanocompósitos</i>	22
1.1.6 <i>Biofilmes e o efeito antimicrobiano da Prata</i>	24
1.1.7 <i>Nano partículas de Prata (AgNPs) e aplicações</i>	26
1.2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	28
METODOLOGIA	30
2.1 SÍNTESE DE AGNPs	30
2.1.1 <i>Materiais</i>	30
2.1.2 <i>Procedimento experimental</i>	31
2.1.3 <i>Caracterização da suspensão coloidal de AgNPs em relação ao tamanho da partícula</i>	32
2.1.4 <i>Caracterização da suspensão coloidal de AgNPs em relação ao seu efeito antimicrobiano</i>	33
2.2 PRODUÇÃO DE FILMES NANOCOMPÓSITOS	35
2.2.1 <i>Materiais</i>	35
2.2.2 <i>Procedimento Experimental</i>	37
2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NANOCOMPÓSITOS NC-AGNPs	40
2.3.1 <i>Técnicas de caracterização utilizadas</i>	40
2.3.2 <i>Absorção na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis) das suspensões de AgNPs</i>	40
2.3.3 <i>Análise de Espessura dos filmes NC-AgNPs</i>	41
2.3.4 <i>Espectroscopia na região do infravermelho por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR) dos filmes nanocompósitos</i>	41
2.3.5 <i>Determinação do ângulo de contato (AC)</i>	41
2.3.6 <i>Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Dispersão de Energia (MEV-EDS)</i>	42

2.3.7	<i>Determinação do Halo de inibição – Suspensões Controle de prata</i>	43
2.3.8	<i>Determinação do Halo de inibição nos filmes NC-AgNPs</i>	43
RESULTADOS		45
3.1	TAMANHO E FORMA DAS AGNPs	45
3.2	RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE NANOCELULOSE E AGNPs	46
3.2.1	<i>Resultados de Espessura</i>	47
3.2.2	<i>Espectro ATR-FTIR</i>	48
3.2.3	<i>Ângulo de contato - AC</i>	49
3.2.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV</i>	50
3.2.5	<i>Determinação de concentração atômica de prata por EDS</i>	52
3.2.6	<i>Resultado de halo de inibição para suspensões controle de AgNPs</i>	53
3.2.7	<i>Resultados de halo de inibição para os filmes NC-AgNPs</i>	54
TRABALHOS EM ANDAMENTO E PERSPECTIVAS FUTURAS		58
4.1	PROCEDIMENTO PARA ESTABILIZAÇÃO DE AGNPs EM MEIO APOLAR	58
4.1.1	<i>Justificativa da transferência de fase das AgNPs</i>	58
4.1.2	<i>Materiais utilizados</i>	60
4.1.3	<i>Procedimento Experimental</i>	60
4.1.4	<i>Resultados preliminares</i>	60
4.1.5	<i>Outras Alternativas</i>	61
4.2	IMPLANTAÇÃO IÔNICA POR IMERSÃO EM PLASMA P(III) DE AGNPs EM FILMES DE NANOCELULOSE	63
4.2.1	<i>Justificativa da técnica</i>	63
4.2.2	<i>Materiais utilizados</i>	63
4.2.3	<i>Procedimento Experimental</i>	64
4.2.4	<i>Resultados dos testes</i>	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS		67
5.1	<i>Síntese de AgNPs</i>	67
5.2	<i>Metodologia de confecção de filmes e seu efeito antimicrobiano</i>	68
REFERÊNCIAS		69

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias para síntese e incorporação de AgNPs¹ em materiais poliméricos como a nanocelulose possibilitaria a criação de materiais que possuam forte atividade contra a proliferação de microrganismos dado o efeito da nano escala nessa propriedade. Uma técnica amplamente utilizada se baseia na produção de materiais compósitos contendo as AgNPs através da sua imobilização sobre o substrato polimérico. Neste capítulo será abordado dentro do contexto da nanotecnologia, como a incorporação de nanopartículas metálicas em alguns materiais, pode contribuir para intensificar ou auferir características únicas aos materiais poliméricos.

1.1 Contexto

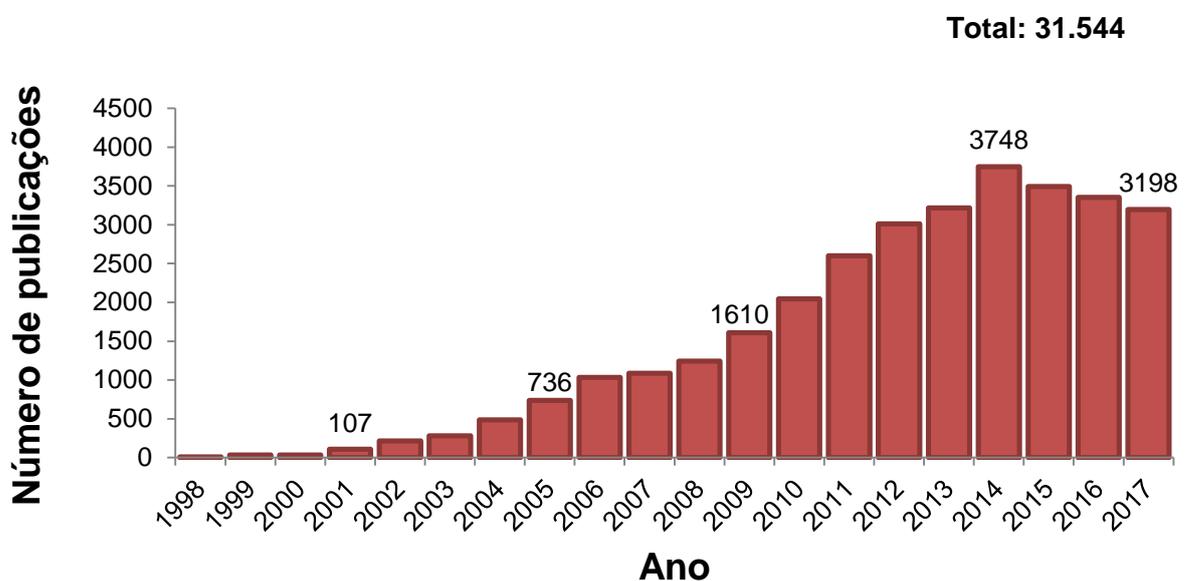
1.1.1 Nanociência e Nanotecnologia

Os termos nanociência e nanotecnologia de materiais têm sido foco de interesse da comunidade científica nas últimas duas décadas, fato que pode ser observado na Figura 1. O crescimento do interesse em nanotecnologia a partir do novo milênio alcançou seu auge em 2014 com 3748 citações e trabalhos publicados naquele ano, tendo uma diminuição nos registros de publicações a partir deste ano que podem ter ocorrido em razão da maior seletividade dos institutos de pesquisas no desenvolvimento desses materiais e também por conta dos diversos mecanismos de regulamentação a que foram submetidos dentro dos

¹ Nanopartículas de prata.

países que já detinham pesquisas aprofundadas nessa emergente área tecnológica. Os dados foram compilados da plataforma “*ISI Web of Science*” em 20/06/18 com o uso das palavras chave “nanoscience” e “nanotechnology”. Isso mostra que tecnologias antes consideradas inviáveis devido ao seu alto custo, na última década já possuem produção de conhecimento científico capazes de viabilizar a produção de nanomateriais em larga escala.

Figura 1 - Número de artigos publicados nos tópicos Nanociência e Nanotecnologia nos últimos 20 anos.



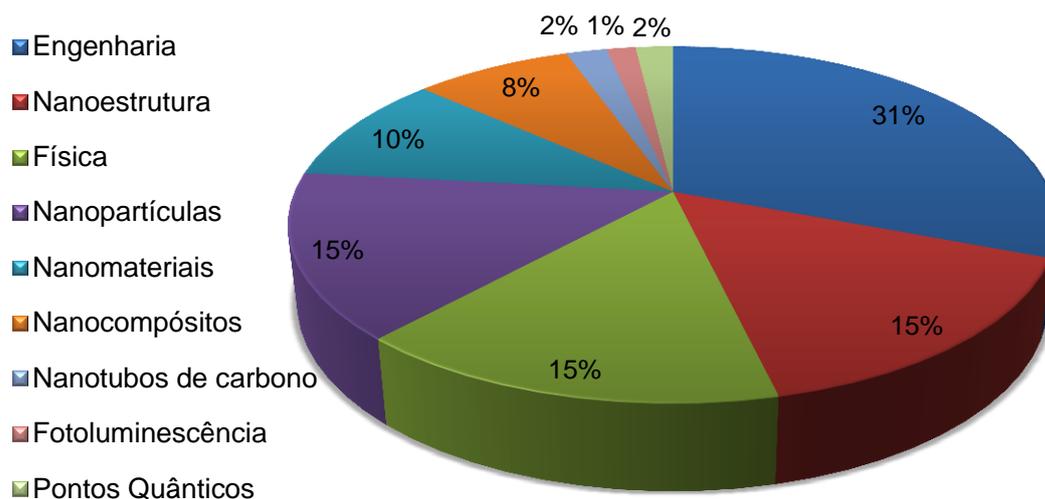
Fonte: O autor. Dados de ‘ISI Web of Science’ usando as palavras chave ‘nanociência’ e ‘nanotecnologia’ consultados em 04 de setembro de 2018.

Ao defender os avanços em materiais nanotecnológicos, assume-se basicamente que esses materiais podem apresentar propriedades muito superiores se comparados aos seus equivalentes massivos, possibilitando um futuro muito promissor nesse novo campo tecnológico (MYERS, 1991).

A Figura 2 classifica o número de publicações obtido anteriormente, publicados entre 1998 e 2017, com a respectiva distinção entre os tópicos Engenharia, Nanoestrutura, Física, Nanopartículas, Nanomateriais, Nanocompósitos, etc., com o objetivo de visualizar como tem sido o empenho da comunidade científica dentro desses temas específicos. A partir do gráfico nota-se um forte interesse quando o tópico Engenharia é incluído na pesquisa, com 31% das publicações relacionadas ao tema, seguida por Nanoestruturas, Física e

Nanopartículas, que ocorrem em 15% das publicações em cada tópico. Cabe ressaltar que dentro desta classificação, muitos artigos podem ter relação com mais de 1 tópico já que as grandes áreas Nanociência e Nanotecnologia possuem tópicos inter-relacionados.

Figura 2 - Dados de publicações obtidos entre 1998 e 2017 classificados por tópicos.



Fonte: Dados coletados do 'ISI Web of Science' utilizando as palavras chave "Nanociência e Nanotecnologia" e classificados em tópicos. Acesso em 04 de setembro de 2018.

No entanto, assim como outras tecnologias emergentes, existem riscos ainda não completamente compreendidos para a saúde humana e que devem ser considerados durante os processos de regulamentação nas federações que desejam avançar nesse promissor campo tecnológico (HOET, BRÜSKE-HOHLFELD, & SALATA, 2004). Em 2013, o tema ganhou relevância no cenário global com o surgimento do programa NanoReg, que foi coordenado pelo Ministério de Infraestrutura e Meio Ambiente da Holanda². Este projeto envolveu mais de 85 parceiros institucionais de países membros da União Europeia, além da Austrália, Canadá, Estados Unidos, Coreia do Sul, Japão e Brasil. Esse consórcio, financiado por entidades governamentais, empresas e cientistas, pretendia responder às principais questões relacionadas à saúde, segurança e meio ambiente provenientes da produção dos nanomateriais manufaturados. O projeto NanoReg

² (MINISTERIE VAN INFRASTRUCTUUR EN MILIEU, 2013). Site do consórcio: <http://www.nanoreg.eu/> acesso em 27/08/2018.

foi finalizado oficialmente em 2017 e seus trabalhos puderam servir de base para os respectivos avanços desse tema dentro dos países parceiros.

A partir das discussões geradas dentro do consórcio NanoReg, Brasil e União Europeia iniciaram a elaboração de um documento em novembro de 2014, que foi publicado pelo Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação no mesmo ano. Este documento abordava os principais aspectos normativos necessários para o avanço da nanotecnologia em seus países. Intitulado “Regulação da Nanotecnologia no Brasil e na União Europeia”, com participação do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas e do Instituto de Medicina Ocupacional do Reino Unido, o documento previa que o segmento movimentaria em 2015 mais de US\$ 1 trilhão, ano em que diversos produtos já possuíam elementos nanotecnológicos em sua composição, incluindo produtos de uso diário como cosméticos e produtos de higiene pessoal (HANKIN & CABALLERO, 2014).

Muito embora esse grande avanço nanotecnológico tenha sido responsável pela criação de um novo nicho de possibilidades para a pesquisa científica, os riscos da ingestão das nanopartículas não são completamente compreendidos para uma grande quantidade de novos materiais que vem sendo descobertos pelo homem (HOENICH, 2006). Certamente, as publicações geradas pelos consórcios internacionais anteriormente citados, contribuíram para elucidar os aspectos mínimos de controle para eventuais contaminações geradas pela ingestão, inalação ou aplicação dermatológica desses produtos, em suas mais diversas aplicações ou até mesmo para os potenciais impactos gerados para o meio ambiente, proveniente dos processos de síntese e obtenção de nanomateriais.

1.1.2 Nanopartículas

De acordo com Ayers citado por (CAO, 2004, p. 4), diversas aplicações para as nanopartículas foram concebidas ao longo dos séculos, desde os chineses, que há mais de um milênio já utilizavam nanopartículas de ouro como corante inorgânico com intuito de auferir a cor vermelha para as suas porcelanas, até os dias atuais. Na medicina já existe a expectativa de poder contar com nanorobôs pré-programados para executarem atividades específicas dentro do

corpo humano, desde atividades como realizar o transporte de fármacos até o diagnóstico de doenças e identificação de defeitos genéticos (CAO, 2004, pp. 391-412).

Com a redução de materiais para a nano escala, de modo que possuam 50% ou mais de suas partículas com pelo menos uma de suas dimensões entre 1 e 100 nanômetros (LOURO, BORGES, & SILVA, 2013), dois fatores em particular são responsáveis por acentuar as propriedades de um material, o primeiro deles é o efeito quântico que é predominante em amostras nanoscópicas, capaz de promover alterações em suas propriedades físicas como cor e condutividade elétrica. O segundo efeito, relacionado com a superfície, tem a relação entre o aumento da razão entre a sua área e seu volume, permitindo que a maioria dos átomos presentes em sua superfície interaja física e quimicamente com o material do meio onde está inserido (MAMANI, 2009).

Muitos pesquisadores têm dedicado esforços para a obtenção de propriedades novas ou aprimoradas dos materiais em nanoescala. Filmes finos nanoestruturados de platina, por exemplo, obtidos pela técnica de pulverização catódica foram produzidos por Lindahl et al. (2017) com o objetivo de testar sua eficiência como catalisadores em células a combustível, sendo possível observar ganhos significativos de eficiência em função do aumento de sua atividade específica para a reação de redução de oxigênio. A economia do elemento em questão, considerado muito raro e de valor bastante elevado, pode chegar a 70% graças à técnica utilizada. Também conhecida como *sputtering*, a mesma é capaz de depositar filmes finos de nanopartículas de platina sobre a superfície do eletrodo através da aplicação de uma diferença de potencial de centenas de volts entre o catodo (alvo) e o ânodo, com a criação de uma descarga elétrica luminosa (plasma) capaz de acelerar os íons originados da descarga orientando-os para colidirem com o catodo e conseqüentemente recobri-lo. A constatação de que a técnica de *sputtering* pode produzir nanocatalisadores com condições de eficiência melhores do que catalisadores convencionais de platina pode levar à produção em massa de dispositivos comerciais dessa natureza, já que se trata de uma técnica que poderia ser escalonada com relativa facilidade (LINDAHL, et al., 2017).

Como evidenciado no caso acima, ocorre na catálise outra evidente contribuição atribuída ao aumento da área superficial, já que no contexto de

química verde essa propriedade pode contribuir em nível molecular com a economia de energia despendida em um reator para obtenção de produtos. Ao facilitar a ocorrência de choques aumenta-se a probabilidade de uma reação acontecer, de modo que, meios reacionais assistidos por catálise têm tido sua eficiência energética aumentada, permitindo a manutenção de temperaturas e pressões reacionais menores, o que em larga escala têm se mostrado bastante compensador.

A Tabela 1 mostra a relação inversamente proporcional entre o tamanho da partícula e sua área superficial específica, considerando um volume fixo de material.

Tabela 1 - Relação da área superficial específica com o tamanho da partícula

Tamanho (cm)	Área superficial total (cm ² /g)
0,77	3,6
0,1	28
0,01	280
0,001	2,8 x 10 ³
10 ⁻⁴ (1 μm)	2,8 x 10 ⁴
10 ⁻⁷ (1 nm)	2,8 x 10 ⁷

Fonte: Adaptado de (CAO, 2004, p. 16).

Quando a redução de escala e sua estabilização são realizadas de tal modo, que ocorra boa distribuição e fixação sobre um substrato, é possível a transferência das propriedades da nanopartícula para o uso final pretendido sem que ocorram perdas nas características físicas e químicas presentes no interior do material (CRUZ, et al., 2015).

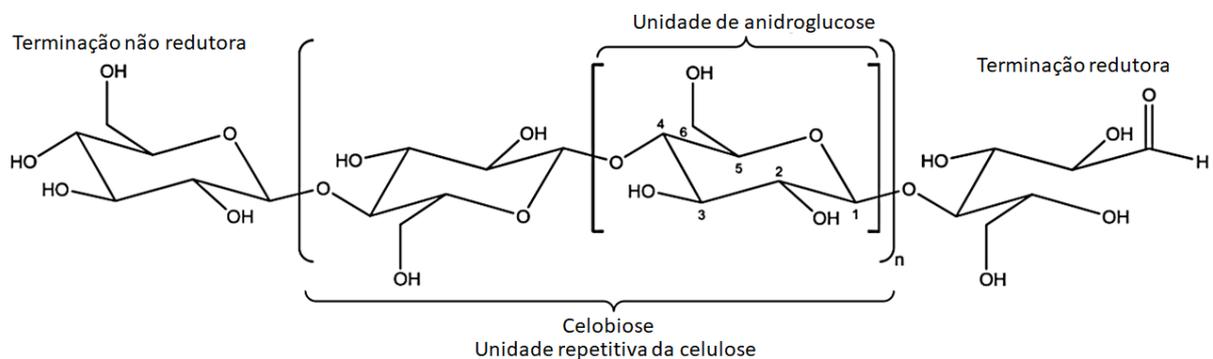
1.1.3 Nanocelulose

A ampla variedade de fontes de matéria prima vegetal disponível sobre a superfície terrestre suscita dentro do meio científico um profundo interesse

pela sua investigação e utilização, seja no reaproveitamento de suas propriedades estruturais, neste caso podemos citar a madeira, que desde os primórdios da humanidade têm sido utilizada na construção de moradias, meios de transporte de carga e fabricação de utensílios domésticos, seja na utilização dos seus derivados, como o papel, o látex, princípios ativos para fármacos, etc.

Dentre os diversos materiais que podem ser extraídos das fontes vegetais, destaca-se a celulose, principal constituinte da parede celular vegetal e um importante polímero natural, que pode oferecer inúmeras possibilidades de aplicação. Sua estrutura química está representada na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura química da celulose



Fonte: (NOVO, 2016)

De característica fibrosa, a celulose é basicamente um polissacarídeo formado por moléculas de anidroglicose através de ligações β-1,4-glicosídicas. No entanto, apesar de a anidroglicose estar presente em todas as unidades, a unidade repetitiva da celulose é a Celobiose (HOENICH, 2006; NOVO, 2016).

Vários processos mecânicos, químicos ou de degradação enzimática podem ser conduzidos na celulose vegetal para fragmentação de sua estrutura em celulose com espessura nanométrica, de onde se obtêm a chamada nanocelulose. Esses processos apesar de custosos podem levar à produção de suspensões estáveis deste material e, dependendo do pré-tratamento que pode ser conduzido, também podem levar à suspensões de menor estabilidade (NOVO, 2016).

Os principais métodos químicos para obtenção de nanocelulose vegetal são baseados na hidrólise ácida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) e na oxidação preferencial do carbono 6 presente nos grupos hidroxila da celulose que ocorre a

partir de um reagente oxidante, conhecido como TEMPO (1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina), associado com os compostos brometo de sódio e hipoclorito de sódio. Nesse tipo de ataque químico, ocorre a inserção de grupos funcionais carboxílicos e aldeídos na cadeias da celulose, que devido às suas cargas iônicas, criam repulsões eletrostáticas capazes de realizar a separação das nanofibrilas (SILVA, 2017).

Nos processos mecânicos por sua vez, as forças cisalhantes impostas às fibras do material são os agentes responsáveis pela sua separação. Podemos destacar o *cryocrushing*, que é basicamente um processo de imobilização das vibrações moleculares, ocasionado pelo resfriamento em nitrogênio líquido, seguido da aplicação de significativa força proporcionada com auxílio de um pilão; e a microfluidização e homogeneização, processos nos quais a polpa celulósica é submetida a elevadas pressões dentro de uma câmara, o que impõe elevada força aos seus grupos moleculares amorfos a ponto de provocar a fragmentação da celulose em nanofibrilas (SILVA, 2017).

A próxima seção destaca as duas principais metodologias utilizadas na obtenção de materiais em nano escala.

1.1.4 Métodos Top-Down e Bottom-up

Para obtenção de nanopartículas, as diversas rotas de síntese existentes podem ser agrupadas em métodos do tipo **Top-Down** “de cima para baixo” ou do tipo **Bottom-up** “de baixo para cima”.

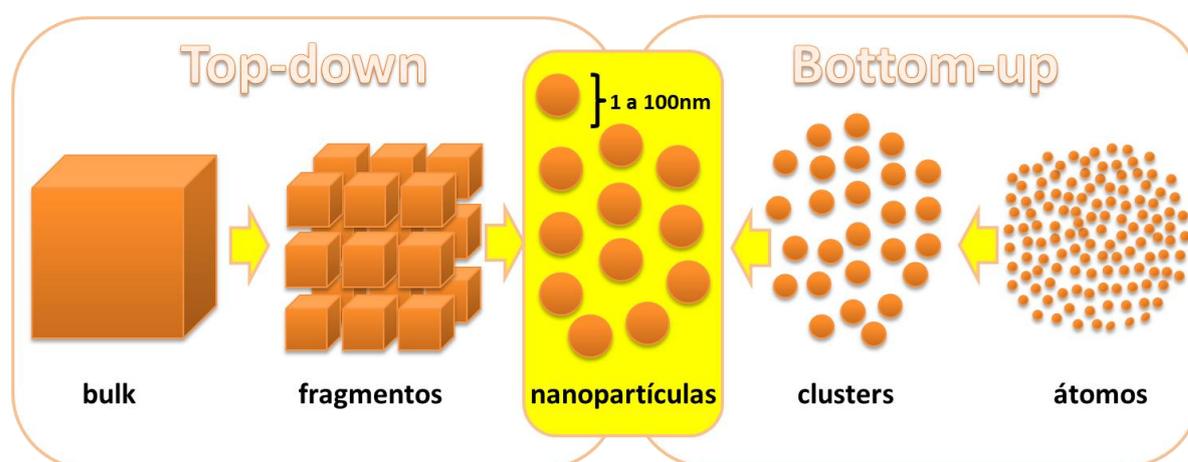
Em métodos *top-down* são empregados processos mecânicos, físicos, químicos ou enzimáticos para redução de escala de materiais massivos, “bulk”, implicando em uma redução progressiva até que atinjam a nano escala. Por outro lado, partículas produzidas a partir de métodos *bottom-up* são constituídas por agrupamentos de átomos ou moléculas individuais, formados a partir de processos elaborados de síntese química ou física (CAO, 2004, p. 7). A Figura 4 ilustra os métodos de obtenção de nanopartículas pelos processos *top-down* e *bottom-up*.

As principais vantagens observadas nos processos bottom-up em relação aos processos top-down estão relacionadas com o melhor controle do tamanho da partícula obtidos por técnicas de baixo pra cima e menor emprego de

energia cisalhante ou de produtos químicos, essenciais para a obtenção de nanopartículas em metodologias de cima para baixo. Se utilizados em condições ideais os processos bottom-up podem viabilizar a construção de nanoestruturas complexas, que dificilmente seriam reproduzidas por técnicas top-down.

Quando sintetizadas em meio líquido, as nanopartículas, NPs, constituem sistemas coloidais dentro de um meio dispersante e têm sua estabilidade relacionada intimamente com as interações entre a fase dispersa (NPs) e o meio. Os mecanismos de estabilização de nanopartículas coloidais são basicamente, fenômenos eletrostáticos ou estéricos (CAO, 2004, pp. 32-47) entre os quais, a escolha do estabilizante adequado é crítica, pois contribuirá para sua estabilidade, solubilidade, reatividade e até mesmo, no tamanho e no formato das nanopartículas durante a síntese (FERNANDES, 2014).

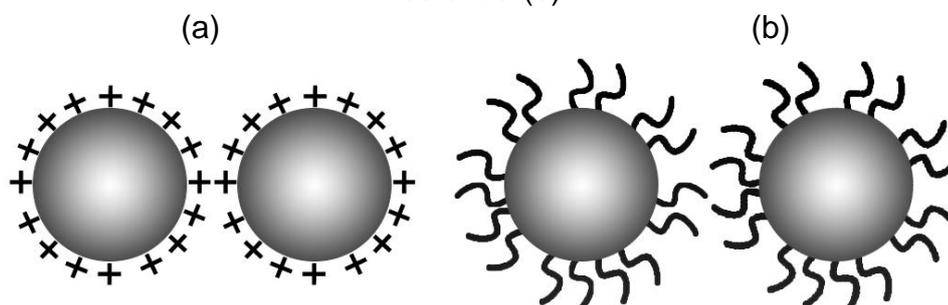
Figura 4 – Ilustração dos métodos utilizados na obtenção de nanopartículas: *Top-Down* e *Bottom-Up*.



Fonte: o autor.

Na estabilização eletrostática as nanopartículas são repelidas devido à interação entre moléculas carregadas na superfície, enquanto na estabilização estérica há a adsorção de surfactantes ao seu redor, de modo que as cadeias sobre sua superfície impeçam a aproximação das partículas dispersas, evitando sua aglomeração. A Figura 5 mostra como se dá a estabilização das NPs pelos dois mecanismos.

Figura 5 - Representação da estabilização eletrostática (a) e estabilização estérica (b).



Fonte: Adaptado de (GARCIA, 2011)

A estabilização eletrostática requer alguns mecanismos dentro de um sistema coloidal para impedir a aglomeração de partículas, também chamada de nucleação. Entre eles está a adsorção preferencial de íons, a dissociação de espécies carregadas na superfície, substituição isomórfica de íons, acumulação e liberação de elétrons da superfície e adsorção física de espécies carregadas sobre a superfície. Todos esses mecanismos garantem que as partículas dispersas não sejam suficientemente atraídas umas pelas outras para formação de blocos mássicos de dimensões superiores a 100 nm. Na estabilização estérica, a fase dispersa está imobilizada pela presença de cadeias longas e a interação entre partículas é de tal modo nula, devido esse impedimento físico, que não seria possível novas etapas de nucleação capazes de formar aglomerados maiores, inclusive na presença de eletrólitos disponíveis no meio (CAO, 2004, pp. 32-47).

1.1.5 Nanocompósitos

Compósitos são uma classe de materiais constituídos por pelo menos duas fases, sendo uma delas a fase dispersa e a outra a matriz. Juntas formam uma rede tridimensional com propriedades únicas, diferente das propriedades das fases isoladas. Quando pelo menos uma das suas fases tem dimensão compreendida entre 1 e 100 nm, o material pode ser chamado de nanocompósito (MEHL, 2011).

Nanocompósitos têm sido desenvolvidos para aplicações diversas, tais como, catálise, optoeletrônica, dispositivos magnéticos, tintas e revestimentos e materiais retardadores de chama (ESTEVES, BARROS-TIMMONS, & TRINDADE, 2004). A combinação de materiais em um nanocompósito pode ser do

tipo inorgânico-inorgânico ou orgânico-inorgânico, que recebem a denominação de materiais híbridos (OLIVEIRA, et al., 2006).

Alguns materiais nanocompósitos empregam a utilização de mais de duas fases dispersas com propriedades distintas e cumulativas capazes de ampliar sua gama de aplicações. Um exemplo interessante é o nanocompósito composto por AgNPs, nanotubos de carbono em matriz de polianilina produzido por Mehl (2011), para potencial aplicação em dispositivos fotovoltaicos. Cada fase foi capaz de fornecer uma característica essencial para o funcionamento dos circuitos, sendo o polímero polianilina responsável pela propriedade fotoativa, os nanotubos de carbono capazes de atuar como captador de elétrons e as nanopartículas de prata que atuaram como captadoras de buracos (MEHL, 2011).

Kausar (2017) preparou filmes nanocompósitos com nanopartículas de prata dispersas sobre uma matriz de poli(acrilonitrila-co-metil acrilato)/polianilina (PANMA/PANI) e AgNPs estabilizadas em celulose (Cell-AgNPs) para posteriormente verificar sua atividade antimicrobiana contra cepas³ de *S. aureus*. A síntese de AgNPs foi realizada a partir de uma solução de nitrato de prata 0,2 mM, contendo 0,2 % em massa de polivinilpirrolidona (PVP), que teve os íons Ag⁺ foto-reduzidos em luz ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm com auxílio de 4 lâmpadas de mercúrio de 40 W em temperatura ambiente. Posteriormente 0,5 g de celulose foi agitada em 50 ml do solvente dimetil-acetamida 99% (DMAc) por 3 horas, enquanto 0,5 g de AgNPs foram adicionadas em 50 ml de DMAc e mantidos, também por 3 h, em banho de ultrassom. Após o período de homogeneização, as dispersões foram misturadas e mantidas em sistema de refluxo por 12 h a 110 °C para permitir a separação de fase, no qual o sobrenadante foi descartado e o sólido depositado, seco em estufa a 80 °C por 24 h. Diferentes massas de Cell-AgNPs foram então adicionadas a uma mistura 90:10 de poli(acrilonitrila-co-metil acrilato)/polianilina (PANMA/PANI) e submetidas ao método de refluxo em DMAc a 130 °C por 6 horas, para o nanocompósito ser coletado através do método de precipitação em xileno. Resultados dos testes antimicrobianos demonstraram efeito de inibição satisfatórios nos filmes testados, indicando diminuição do crescimento

³ Sinônimo de Estirpe. Está relacionado ao conjunto de descendentes da mesma origem genética que apresentam semelhanças morfológicas ou fisiológicas e constituem uma variante genética ou um subtipo.

logarítmico de *Staphylococcus aureus* em relação ao aumento da massa de Cell-AgNPs nos filmes.

1.1.6 Biofilmes e o efeito antimicrobiano da Prata

O perfil antimicrobiano de muitos materiais é desejado sempre que a proliferação bacteriana necessite ser controlada por processos subsequentes de desinfecção e esterilização antes da aplicação final desse material. Dois exemplos que podem ser citados são a aplicação em embalagens de alimentos e os materiais de uso médico, como os curativos para feridas, que não podem carregar contaminantes microbiológicos devido ao risco de atentarem contra a saúde de um consumidor ou paciente.

A formação de colônias de microrganismos sobre instrumentos cirúrgicos pode ser favorecida por um mecanismo de sobrevivência inerente destes, que são capazes de criar uma matriz extracelular de polissacarídeos ao seu redor e servem de escudo para a remoção física e também ataque químico de produtos de limpeza, os chamados *biofilmes* (CLUTTERBUCK, COCHRANE, DOLMAN, & PERCIVAL, 2007).

Após sua formação, o efeito dos biofilmes na indústria alimentícia é preocupante e oferece, portanto, risco iminente de contaminação alimentar dos produtos por microrganismos patogênicos, devido à dificuldade de resolução após seu surgimento. A indústria alimentícia tem atuado basicamente na prevenção dos biofilmes com procedimentos operacionais padrão que devem ser intensificados em área de produto e têm sua eficácia avaliada mediante coleta de SWAB⁴ de superfície. Essa técnica geralmente detecta a presença de material orgânico aderido sobre a superfície, que serviria de alimento para os microrganismos presentes sobre os equipamentos utilizados para o processamento dos alimentos (KASNOWSKI, MANTILLA, OLIVEIRA, & FRANCO, 2010).

Os biofilmes também são um problema para a indústria de saneamento básico, principalmente no tratamento de água potável, pelo fato de causarem o entupimento nas membranas, e conseqüentemente redução da sua

⁴Cotonete/Esfregão que possui um chumaço de material absorvente enrolado em uma das extremidades, comumente utilizado na aplicação de medicações ou na amostragem de material de uma área.

vida útil, com impacto direto no consumo de energia elétrica dessas estações de tratamento. Apesar das etapas prévias de coagulação, limpeza química com cloro ou retro lavagem se mostrarem eficientes para evitar a formação de biofilmes, algumas membranas poliméricas não são resistentes à corrosão provocada pelos produtos químicos convencionais, implicando em sua substituição (ZODROW, et al., 2009).

Neste cenário, alguns materiais metálicos que possuem efeito antimicrobiano característico, podem auxiliar a proteção de materiais e superfícies contra a ação dos microrganismos. Um exemplo importante é a Prata, que corresponde a um dos três primeiros metais descobertos pelo homem, além do ouro e do cobre, sendo descoberto aproximadamente em 4000 a.C. Antes mesmo do entendimento de que eram os micróbios os agentes causadores das infecções, aproximadamente 1000 a.C., a prata teve sua ingestão empiricamente motivada para tratamento de doenças e infecções, pois àquela época sua eficácia contra infecções já era conhecida. A partir daí, foi então utilizada para as mais variadas aplicações, desde recipientes para líquidos, moedas, suturas, soluções, etc. (ALEXANDER, 2009, p. 1).

O incentivo indiscriminado pelo seu uso medicinal, na forma de prata coloidal, deu origem à doença Argiria, assim chamada em alusão ao nome, em latim, do seu elemento precursor, o *Argentum*. Essa doença consiste na deposição acumulativa sobre a pele e em outros tecidos humanos levando à alteração da pigmentação da pele, conferindo-lhe uma cor azul. Mesmo em casos de argiria crônica, não há registros de alterações patológicas nos órgãos afetados ou alterações na fisiologia destes pacientes. Estudos realizados pela Associação Americana de Produtores de Prata indicaram registros de intoxicação a partir de 1700, sendo que em 1939 um total de 357 casos registrados dos quais mais de 67% era proveniente de indicação médica e 33% ocasionados a partir de atividades de mineração e refino. A utilização medicinal da prata somente perdeu adesão após o surgimento dos antibióticos em 1940, motivada pela sua utilização na Segunda Guerra Mundial (ALEXANDER, 2009, p. 3).

1.1.7 Nano partículas de Prata (AgNPs) e aplicações

O uso da prata em sua forma metálica ou em soluções de sais de prata (óxido, brometo, cloreto e iodeto) foi bastante diversificado, conforme relatado no tópico anterior, porém, o estudo da relação entre o tamanho de partícula e os efeitos sobre suas propriedades antimicrobianas se deram a partir de 1924, quando foram introduzidos os estudos sobre a síntese e estabilização de coloides por processos eletrolíticos, capazes de obter partículas com dimensões entre 0,1 e 0,001 μm de diâmetro. Posteriormente, em 1951, Turkevich, Stevenson e Hillier e, em 1982, Lee e Meisel desenvolveram novas rotas de síntese, que permitiram a redução ainda mais acentuada no diâmetro dessas partículas. Esses processos serão discutidos em detalhes no capítulo de Desenvolvimento.

Entre os materiais que se beneficiam preferencialmente das propriedades antimicrobianas das AgNPs, temos atualmente embalagens de alimentos que utilizam as nanopartículas como carga. Esses nanocompósitos são basicamente “embalagens ativas”, capazes de cumprir sua função de barreira contra gases, umidade e luz. Além disso, nos casos de predisposição à contaminação microbiológica do alimento, como o exemplo do leite que é classificado como alimento líquido de baixa acidez⁵, tais embalagens podem atuar como barreira para o crescimento microbiológico e conseqüentemente aumentar o tempo de prateleira do alimento.

O armazenamento de alimentos sólidos em filmes poliméricos contendo AgNPs também têm demonstrado resultados interessantes. Já existe no mercado brasileiro um material compósito a base de Polietileno e micropartículas de prata, sendo produzido e comercializado pela empresa Nanox⁶, sediada em São Carlos, interior do estado de São Paulo. Seus desenvolvedores elaboraram um compósito em que são misturadas na forma de um pó, micropartículas de prata na matriz do polietileno que posteriormente será submetido aos processos de moldagem de garrafas plásticas por injeção. O uso dessa tecnologia para armazenamento do leite fresco tipo A produzido pela empresa Agrindus, também

⁵ Alimentos que apresentam elevada atividade de água $A_w \geq 0,98$ e $\text{pH} \geq 4,50$. Nesta classe de alimentos a maioria dos microrganismos consegue se proliferar com grande velocidade (VALSECHI, 2006).

⁶ <http://www.nanox.com.br/>

localizada na cidade de São Carlos, aumentou o *shelf life*⁷ do produto de 7 para 15 dias. A tecnologia foi financiada pelo Programa FAPESP de Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas, o PIPE, e por uma *spin off* do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais, CDMF (ALISSON, 2015).

Fernandez, Picouet e Lloret, por sua vez, empregaram filmes de celulose contendo AgNPs para armazenamento de cortes de melão fresco. Como resultado, durante o período de armazenamento, esses alimentos apresentaram baixa contagem de microrganismos mesófilos, psicotróficos e leveduras em comparação com filmes de celulose sem a presença de AgNPs (FERNANDEZ, PICOUET, & LLORET, 2010).

Em seu trabalho, Li et al (2011) mostraram que filmes de celulose microcristalina com AgNPs obtidas através de rotas de síntese assistida por micro-ondas apresentaram melhor efeito antimicrobiano quando a concentração de prata nos filmes compósitos era aumentada. Em filmes compósitos com 0,075g de conteúdo de prata, os halos de inibição formados contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram de 10 mm e 2.5 mm, respectivamente. Para a concentração de prata de 0,15 g os halos de inibição passaram a ser de 12,5 mm e 6,5 mm, respectivamente. Esses resultados demonstraram claramente a dependência entre a concentração das AgNPs nos filmes compósitos e o aumento do perfil antimicrobiano dos filmes (LI, et al., 2011).

Em um trabalho mais recente, Claro (2017) confeccionou filmes de nanocelulose vegetal e os impregnou com óleo essencial de calêndula e nanopartículas de prata para testar se suas características físicas e químicas poderiam viabilizar sua utilização como curativos para queimaduras. Os resultados de cicatrização obtidos apresentaram-se bastante semelhantes aos encontrados com curativos fabricados a partir de celulose bacteriana que já são amplamente utilizados como pele artificial, mas que têm baixa eficiência e elevado custo de fabricação. Porém, não foi observado nos filmes ação antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli* nos testes de disco-difusão em ágar (CLARO, 2017).

⁷ Tempo de prateleira / validade de um alimento.

1.2 Objetivos e Justificativa

Com base no exposto anteriormente, objetivou-se neste trabalho o desenvolvimento de uma metodologia de baixo custo para produção de filmes nanocompósitos de nanocelulose vegetal com nanopartículas de prata (AgNPs) e a posterior caracterização de seu efeito antimicrobiano contra cepas de microrganismos comuns em ambiente hospitalar.

O material em questão poderia ser utilizado como curativo para feridas já que possuiria excelentes propriedades mecânicas oriundas da nanocelulose além da presença de nanopartículas de prata que possuem amplo espectro antimicrobiano de natureza bacteriostática, impedindo a adesão de microrganismos e consequente formação de biofilme sobre a superfície, e também bactericida, levando os microrganismos à morte celular devido a interrupção dos processos de respiração celular após permeação das nanopartículas através da membrana das células.

Destacam-se ainda os objetivos específicos do trabalho:

- Otimização do processo de síntese de nanopartículas de prata, possibilitando a obtenção de nanopartículas estáveis em suspensões de diferentes polaridades e, conseqüentemente, viabilizando diferentes rotas de incorporação de nanopartículas nos filmes de nanocelulose;
- Otimização do processo de confecção dos filmes de nanocelulose por meio do desenvolvimento de uma técnica para secagem capaz de garantir espessura regular, reprodutibilidade e economia de espaço e tempo de secagem;
- Caracterização física e química dos filmes nanocompósitos por diferentes técnicas, com intuito de verificar principalmente as propriedades superficiais do material, que implicam diretamente na sua interação com os microrganismos;

- Estudo do efeito antimicrobiano dos nanocompósitos pela técnica de medição de halo de inibição utilizando as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Capítulo 2

METODOLOGIA

Serão tratados neste capítulo os procedimentos experimentais utilizados para síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) obtidas por redução química com citrato de sódio e a metodologia desenvolvida para confecção de filmes de nanocelulose com AgNPs (NC-AgNPs) a partir de um sistema de filtração à vácuo de baixo custo. Também será apresentado um sistema alternativo para secagem dos filmes obtidos com o uso de um aparato de fabricação própria, capaz de otimizar o processo de secagem e possibilitar a confecção de filmes em tempo reduzido e com características de espessura e energia de superfície controladas.

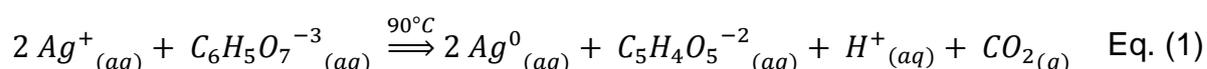
2.1 Síntese de AgNPs

2.1.1 Materiais

Os reagentes utilizados na síntese de AgNPs foram o Nitrato de Prata PA (Cennabras), Citrato de Sódio 2.H₂O P.A.-A.C.S. (Labsynth) e água deionizada milli-Q. Os equipamentos utilizados foram uma balança Marte, 2 béqueres de vidro de 25 ml, balões volumétricos de 100 ml, pHmetro Digimed DM 22, termômetro químico escala de -10 °C à +200 °C (±0,5 °C), frasco reagente Schott de 500 ml e placa de aquecimento com agitação magnética IKA- CMAG H57.

2.1.2 Procedimento experimental

O método experimental mais usual para produção de nanopartículas metálicas é definido por Lee e Meisel com referência ao método Turkevich (TURKEVICH, STEVENSON, & HILLIER, 1951). A reação química da redução dos íons de prata em solução utilizando citrato de sódio como agente redutor está representada na Eq. (1) (PATRA, et al., 2014):



Dois fatores são críticos na síntese em questão, a concentração de citrato de sódio e a temperatura do meio reacional. Mesmo sendo conduzida em temperatura acima de 75 °C, altas concentrações de citrato [Citrato/Ag⁺] >>1 podem não significar aumento no tempo de redução de prata já que os complexos de citrato formados são altamente estáveis e tendem a tamponar o meio. Neste caso, como não se pretende neste trabalho a obtenção de uma rota de síntese rápida e sim a produção de uma suspensão estável e com condições de estabilidade adequadas, menores concentrações de citrato devem ser utilizadas, implicando em maior tempo de síntese.

Embora esses mecanismos de adsorção de ânions citrato na superfície das nanopartículas não sejam plenamente conhecidos, sabe-se que esses grupos de citrato coordenam a superfície metálica na complexação de esfera interna dos grupos carboxilatos na superfície do metal onde há íons vestigiais do metal e de grupos OH⁻ (PARK & SHUMAKER-PARRY, 2014). Entende-se como complexação de esfera interna os processos oriundos do chamado efeito de adsorção específica, nos quais existem pares iônicos de curta ligação entre íon e partícula, sem interposição de moléculas de água (LANGMUIR, 1979).

Foram então preparadas soluções de nitrato de prata 1,0 mmol.l⁻¹ e citrato de sódio 0,55 mmol.l⁻¹, considerando proporções próximas da estequiométrica [Citrato] / 2 * [Ag]. Após o preparo dos reagentes, a solução de nitrato de prata (AgNO₃) foi então aquecida no agitador magnético a 90 °C com rotação mantida em 3000 RPM para então ser adicionada a solução de citrato de sódio. O tempo de reação foi monitorado até que o meio apresentasse coloração amarela. Nas condições experimentadas, a alteração da cor do meio reacional se deu após

aproximadamente 30 minutos. Na sequência, foi observada a alteração da coloração do meio com o objetivo de evitar o aumento demasiado das partículas, o que levaria a coloração do meio para uma tonalidade alaranjada indesejável. Após 4 minutos de reação a coloração amarela foi intensificada, indicando um tamanho de partícula ideal para este trabalho. Neste momento o aquecimento e a agitação foram interrompidos e o frasco com a suspensão foi resfriado em água corrente até temperatura ambiente.

Com a suspensão resfriada a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, seu pH foi determinado para verificar a necessidade de neutralização (pH 7,00), já que são esperadas pequenas variações negativas no pH devido liberação de H^+ no meio reacional, o que pode implicar na perda de estabilidade das AgNPs e novas etapas de nucleação de partículas. Em condições de síntese com citrato de sódio não estequiométrico são esperadas alterações mais significativas em seu pH, sendo necessário o ajuste com uma solução alcalina de hidróxido de amônio 28% para elevação do pH do meio. Sua adição também ajuda a inibir o crescimento das partículas, já que os íons de prata ainda presentes no meio podem ser complexados pela amônia (GARCIA, 2011).

2.1.3 Caracterização da suspensão coloidal de AgNPs em relação ao tamanho da partícula

Análises de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) são comumente utilizadas para constatar a presença de nanopartículas em suspensão e determinar seu tamanho, visto que o espectro de absorção de uma suspensão de nanopartículas se altera conforme o estágio de agregação é aumentado durante a síntese via técnica bottom-up. Segundo informações da literatura (HE & SHI, 2005), suspensões coloidais de prata produzidas por este método apresentam banda de absorção entre 420 e 435 nm, o que é indicativo da presença de nanopartículas com tamanho entre 35 e 50 nm.

A Tabela 2 apresenta o tamanho esperado de partícula em cada região do espectro.

Tabela 2 - Correlação entre tamanhos de nanopartículas de prata e a região do espectro esperada na Espectroscopia UV-Vis.

Tamanho da partícula (nm)	Comprimento de Onda (nm)
5 - 10	380 - 390
10 - 14	395 - 405
35 - 50	420 - 435
60 - 80	438 - 450

Fonte: (GARCIA, 2011)

2.1.4 Caracterização da suspensão coloidal de AgNPs em relação ao seu efeito antimicrobiano

A técnica utilizada neste trabalho para estudo de potencial antimicrobiano é também conhecida como técnica de disco-difusão em ágar ou de sensibilidade, em que um microrganismo responde *in vitro* a um agente antimicrobiano convencional nas concentrações séricas⁸ ou residuais que este agente pode alcançar. Normalmente essa metodologia de sensibilidade de uma bactéria a um determinado agente é padronizada em testes farmacocinéticos onde não se pode associar de maneira confiável a concentração mínima inibitória pela simples identificação do microrganismo (NCCLS, 2003, p. 25). Portanto, faz-se necessária a quantificação da concentração mínima desse agente para se atingir o efeito de inibição requerido para um tratamento sistêmico, no qual o fármaco deve ser administrado internamente no paciente por um determinado período.

Para se testar um agente antimicrobiano não convencional, como as AgNPs sintetizadas neste trabalho, deve-se considerar a interação existente entre o ágar e o veículo que o carrega. Considerando que a maioria dos agentes antimicrobianos convencionais (antibióticos) são hidrofílicos, tal qual a suspensão de AgNPs, era esperado um resultado proeminente de halo de inibição para os testes de sensibilidade em questão já que o ágar é um meio que apresenta interações intermoleculares da mesma natureza.

⁸ Sinônimo de plasmático. Este termo é utilizado por profissionais da saúde para se referir à concentração de um determinado medicamento presente no sangue no momento do teste.

O inóculo de microrganismo a ser testado deve ser previamente incubado em caldo Müeller-Hinton a 35 °C até alcançar a turbidez de uma solução padrão McFarland⁹ de 0,5. Caso não seja atingida a turbidez a mesma pode ser ajustada com solução salina estéril ou caldo nutriente até ser atingido o número de unidades formadoras de colônias esperada, normalmente da ordem de 1×10^8 UFC.ml⁻¹. Após obtenção da suspensão ajustada de inóculo, mergulha-se em seu interior um cotonete de algodão (swab) que deve ser pressionado contra as paredes internas do tubo acima do nível do líquido, de modo a eliminar qualquer excesso de inóculo que possa estar presente no swab e então se realiza a técnica do esfregaço sobre a superfície estéril da placa contendo o ágar. Por precaução, devem ser realizados vários esfregaços girando-se a placa 60° cada vez a fim de garantir a distribuição uniforme do inóculo (NCCLS, 2003, p. 32).

Após preparação das placas, as amostras “teste” devem ser cuidadosamente posicionadas sobre o ágar com o cuidado de realizar uma distribuição por igual das amostras, não excedendo o total de recomendado de 12 amostras em placas de 150 mm ou 5 amostras para placas de 100 mm de diâmetro. Outro cuidado importante é virar as placas ao contrário para evitar condensação de líquido sobre os inóculos e amostras, o que poderia levar a gotejamentos indesejáveis e conseqüentemente a uma contaminação cruzada entre as diferentes cepas ou agentes antimicrobianos, deste modo, qualquer condensado que se formar precipitará sobre a face limpa da placa. As mesmas devem ser incubadas a 35 °C em até 15 minutos após a aplicação das amostras e mantidas entre 16 e 24 horas nessas condições até que possam ser realizadas as medições dos halos (NCCLS, 2003, p. 33).

Na avaliação dos halos de inibição total deve se considerado o diâmetro do disco e não somente da área de inibição ao redor da placa. Com auxílio de um paquímetro deve ser medido o perímetro da área sem crescimento de microrganismos detectável a olho nu (NCCLS, 2003, pp. 33-34).

Neste trabalho, para caracterização do efeito antimicrobiano da suspensão de nanopartículas de prata em meio aquoso, foram utilizados como inóculos as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A escolha

⁹ Suspensão de sulfato de bário, utilizada principalmente na padronização de inóculos bacterianos, na confecção do antibiograma, concentração inibitória mínima (C.I.M.) e outros testes qualitativos e quantitativos.

desses organismos se deve ao fato de representarem os dois principais grupos de bactérias que podem colorir através do método clássico de Gram¹⁰, ou seja, resultados positivos para as cepas em questão podem significar efeitos de inibição para outras cepas pertencentes à cada grupo, se o antimicrobiano estiver na concentração mínima inibitória para aquela cepa. Outro fator determinante para sua escolha deve-se ao fato de constituírem bactérias comumente encontradas em materiais de uso médico e estarem diretamente relacionadas aos principais casos de infecções hospitalares, quando não são realizados procedimentos adequados de higienização pelos profissionais de saúde que circulam nesses ambientes (MACIEL & CÂNDIDO, 2010, p. 41).

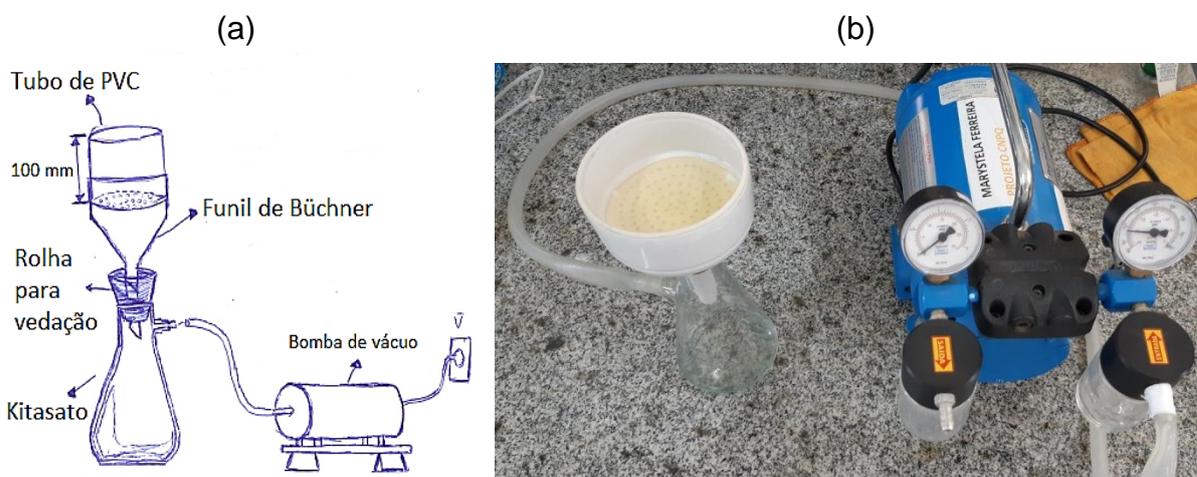
2.2 Produção de filmes nanocompósitos

2.2.1 Materiais

Na produção de filmes nanocompósitos foi utilizada uma suspensão de nanocelulose vegetal de eucalipto a 2%, produzida pela empresa Suzano, juntamente com a suspensão de nanopartículas de prata sintetizadas conforme descrito na seção anterior. As proporções mássicas de cada filme foram determinadas em balança de precisão 1mg da Shimadzu. Para a produção dos filmes foi utilizado um sistema de filtração a vácuo com papel filtro qualitativo com 99 mm de diâmetro (recortado previamente), um funil de Büchner em porcelana de 100 mm de diâmetro, um frasco Kitasato de 500 ml e uma bomba a vácuo Primatec modelo 121 tipo 2 VC, com deslocamento máximo de $2,2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. O sistema de filtração mencionado está representado na Figura 6.

¹⁰ A técnica batizada em alusão ao seu criador o médico Hans Christian Gram, também conhecida por colocação de Gram, baseia-se na coloração de bactérias pelo corante cristal violeta, usualmente o violeta de metila. Bactérias Gram-positivas ao serem submetidas ao corante, por possuírem estrutura celular simples não descoram em contato com o solvente orgânico, enquanto as bactérias Gram-negativas mudam sua coloração para vermelha e são basicamente de estrutura celular complexas (NOGUEIRA & MIGUEL, 2013, p. 228).

Figura 6 – Sistema para produção dos filmes nanocompósitos por filtração à vácuo: (a) desenho esquemático, (b) fotografia.

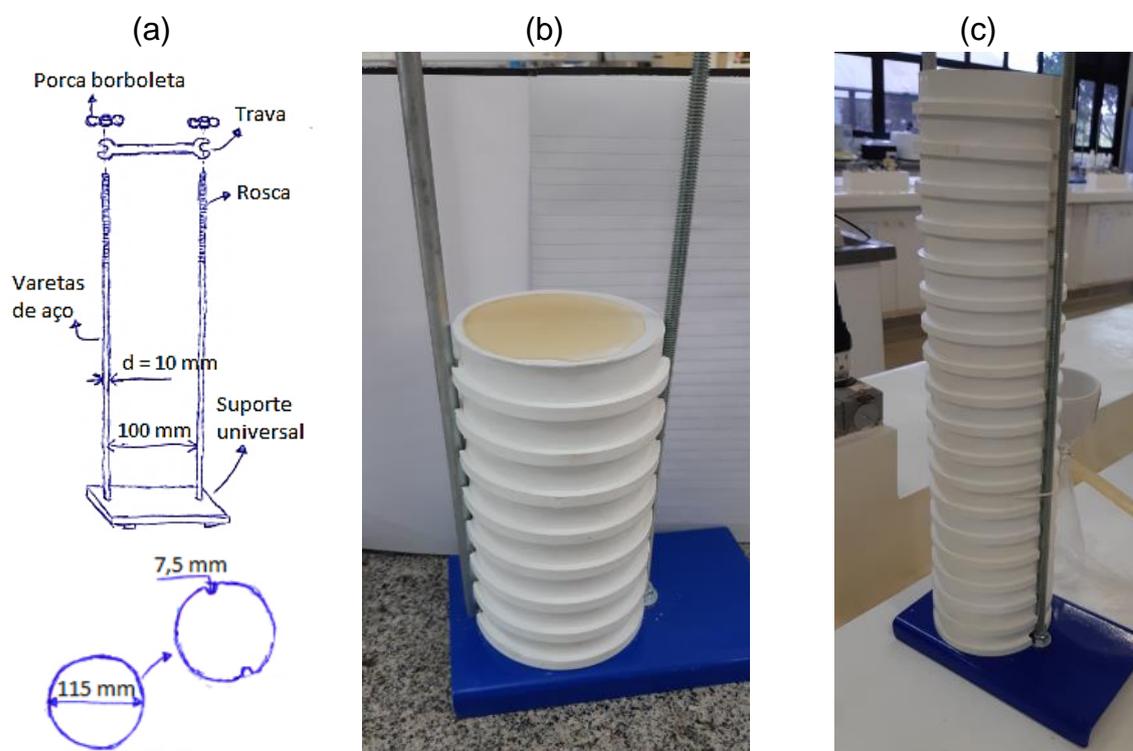


Fonte: o autor.

Para secagem e acondicionamento dos filmes confeccionados, utilizou-se um sistema composto basicamente por um suporte universal com duas hastes, afastadas 100 mm uma da outra e de vários compartimentos de armazenamento de amostras constituídos com porta-grelhas de PVC, comercialmente vendidos para a construção civil para utilização em ralos residenciais. Foi criado um rebaixo nas duas extremidades opostas de cada porta-grelha de modo que as hastes pudessem encaixar por toda a extensão da torre formada a partir do seu empilhamento consecutivo, o que conferiu maior estabilidade estrutural para o suporte de secagem, conforme pode ser visualizado na Figura 7.

Entre cada porta-grelha, o espaço de junção era de 2 mm, permitindo o armazenamento de um “sanduíche” formado pelo filme nanocompósito posicionado entre dois discos de PVC.

Figura 7 - Sistema de secagem e armazenamento de filmes nanocompósitos: (a) desenho esquemático, (b) e (c) disposição dos porta-grelhas formando os diferentes compartimentos de armazenamento.



Fonte: o autor.

2.2.2 Procedimento Experimental

As massas das suspensões de nanocelulose e AgNPs determinadas para cada filme foram submetidas ao processo de filtração à vácuo. Para uma mesma massa de suspensão de nanocelulose foram utilizadas diferentes massas de suspensão de nanopartículas de prata.

Fernandes (2014) definiu em seu trabalho a concentração mínima inibitória (CMI) de nanopartículas de prata para uma série de microrganismos *gram-positivos* e *gram-negativos* (Tabela 3). Sua determinação considera que o elemento antimicrobiano (Ag^0) está livre para difusão sobre o meio de cultura, ou seja, a suspensão de Ag^0 é colocada diretamente sobre o ágar em poços perfurados previamente com moldes de plástico auto clavados, com as placas deixadas em descanso sob refrigeração entre 7 °C e 10 °C para difusão do antimicrobiano e posterior incubação para determinação do halo de inibição (FERNANDES, 2014).

Tabela 3 – Concentração mínima inibitória (CMI) de nanopartículas de prata sintetizadas com citrato de sódio (AgNP-C) sobre diferentes bactérias

Bactérias	CMI (g.L ⁻¹) AgNP-C ¹¹
<i>S. aureus</i>	0,05
<i>B. cereus</i>	0,05
<i>E. faecalis</i>	0,05
<i>P. aeruginosa</i>	0,00625
<i>E. coli</i>	0,00625
<i>S. Typhimurium</i>	0,00625

Fonte: Adaptado de (FERNANDES, 2014).

No entanto, neste trabalho pretende-se criar um filme com as AgNPs imobilizadas em sua superfície, preferencialmente, de modo que seja possível observar um mecanismo de impedimento e inibição do crescimento tanto na vizinhança da amostra quanto em sua superfície. Um filme que possua efeito antimicrobiano nessas condições poderia ser armazenado e utilizado em condições de teste não laboratoriais, já que não precisa ser armazenado em ambiente inócuo ou mesmo ser conservado sob refrigeração para que possa exibir a mesma atividade contra cepas de microrganismos anteriormente testadas.

Deste modo, para facilitar a observação do efeito antimicrobiano foram utilizadas massas de suspensões de AgNPs superiores ao estabelecido na Tabela 3. Os cálculos realizados para definição da massa utilizada em cada filme estão descritos na Tabela 4.

As massas de suspensão de nanocelulose foram definidas de modo que os filmes pudessem apresentar gramatura semelhante a um papel comercial de fina espessura, como o papel de jornal, que possui gramatura estabelecida entre 35 e 55 g.m⁻². Desta maneira foi definida uma massa de 15 g de suspensão de nanocelulose, 2% em água, onde a massa total disponível de polímero equivaleria a 0,3 g após remoção do elemento dispersante (água). O diâmetro dos filmes foi definido a partir do diâmetro do Funil de Büchner utilizado na filtração à vácuo, ou seja, 100 mm de diâmetro. Para fins de cálculo de gramatura, considera-se que o

¹¹ Nanopartículas de prata obtidas através da reação de síntese com agente redutor Citrato de Sódio (FERNANDES, 2014).

filme tem raio de 0,05 m o que proporciona uma gramatura equivalente $G_{NC}^{12} =$ (massa nanocelulose em gramas) \div (área do filme em m^2).

Portanto, a gramatura resultante dos filmes produzidos utilizando a massa de 15 g de suspensão de nanocelulose é igual a $G_{NC} = 0,3 \text{ g} \div [(0,05)^2 \times \pi] = 38,2 \text{ g.m}^{-2}$.

Tabela 4 - Cálculo teórico de massa de prata para cada filme NC-AgNPs

# Ref.	Massa de Suspensão de Ag^0 (g)	Massa de Ag (g)	Massa de NC^{13} (g) ¹⁴	$\frac{g. Ag^0}{kg. NC}$
10	10,00	0,001079	0,3	3,6
15	15,00	0,001618	0,3	5,4
20	20,00	0,002157	0,3	7,2
25	25,00	0,002697	0,3	9,0
30	30,00	0,003236	0,3	10,8
40	40,00	0,004315	0,3	14,4
50	50,00	0,005394	0,3	18,0

Fonte: o autor.

Para a confecção dos filmes, colocou-se o papel filtro sobre o funil e despejou-se a massa de 15 g de suspensão de nanocelulose. Em seguida foram cronometrados 3 minutos de secagem em pressão negativa de -600 mmHg. Posteriormente foi adicionada a massa de suspensão de AgNPs, correspondente para cada concentração de prata, sobre o filme de nanocelulose formado e sistema de secagem à vácuo mantido por mais 3 minutos sob as mesmas condições.

Após secos por um total de 6 minutos, os filmes foram cuidadosamente removidos do papel filtro com o auxílio de luvas. Para tanto, deve-se percorrer toda a borda do filme e suspender o filme excedente provocado pela diferença, intencionalmente provocada, entre o diâmetro do funil de Büchner e o papel filtro, que teve seu diâmetro reduzido previamente com uma tesoura. Após o levantamento das bordas e a retirada cuidadosa de todo o filme, o mesmo foi posicionado sobre um disco de PVC, previamente limpo com papel e álcool e posteriormente recoberto com outro disco por cima.

¹² G_{NC} = Gramatura dos filmes de Nanocelulose.

¹³ NC = Nanocelulose.

¹⁴ Definida para uma massa de suspensão de nanocelulose (2% em água) equivalente a 15 g.

Esse “sanduiche” foi levado ao sistema de secagem e acondicionamento de amostras e disposto no espaço da junção entre um portagrelha e outro, conforme já ilustrado na Figura 7.

2.3 Caracterização dos filmes nanocompósitos NC-AgNPs.

2.3.1 Técnicas de caracterização utilizadas

Na Tabela 5 estão descritas as técnicas utilizadas neste trabalho para caracterização das propriedades físicas, químicas e microbiológicas das suspensões de AgNPs e dos filmes de nanocelulose com nanopartículas de prata.

Tabela 5 - Relação de Técnicas de Caracterização utilizadas.

Técnica	Propriedade de Interesse
UV-Vis	Determinação do tamanho de partícula em relação ao máximo de absorção no espectro ultravioleta-visível.
Espessura	Determinação da espessura dos filmes
ATR - FTIR	Observação dos grupos funcionais de interesse presentes na superfície dos filmes de nanocelulose com AgNPs (NC-AgNPs).
AC	Caracterização do grau de molhabilidade dos filmes mediante determinação do ângulo de contato.
MEV/EDS	Topografia dos filmes e determinação da concentração elementar de prata.
Halo de inibição	Determinação do potencial antimicrobiano das suspensões controle de prata e dos filmes de nanocelulose com AgNPs.

Fonte: o autor.

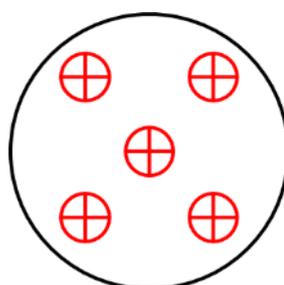
2.3.2 Absorção na região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis) das suspensões de AgNPs

Para a análise das suspensões coloidais de AgNPs, foi utilizado um espectrofotômetro de absorção de UV-visível U-2900 da HITACHI com auxílio de cubetas de quartzo. As amostras foram analisadas logo após a sua preparação. Como amostra de referência (“branco”) utilizou-se água milli-Q, que foi também utilizada no preparo da solução de AgNO₃, precursora da prata.

2.3.3 Análise de Espessura dos filmes NC-AgNPs

Com auxílio de um micrômetro Mitutoyo IP65 Coolant Proof (0 - 25 mm) com 0,001 mm de exatidão, foram determinadas as espessuras dos filmes nanocompósitos NC-AgNPs. O diagrama abaixo (Figura 8) representa as 5 regiões de cada filme escolhidas para medição da espessura.

Figura 8 - Diagrama da amostragem de espessura realizada



Fonte: o autor.

2.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR) dos filmes nanocompósitos

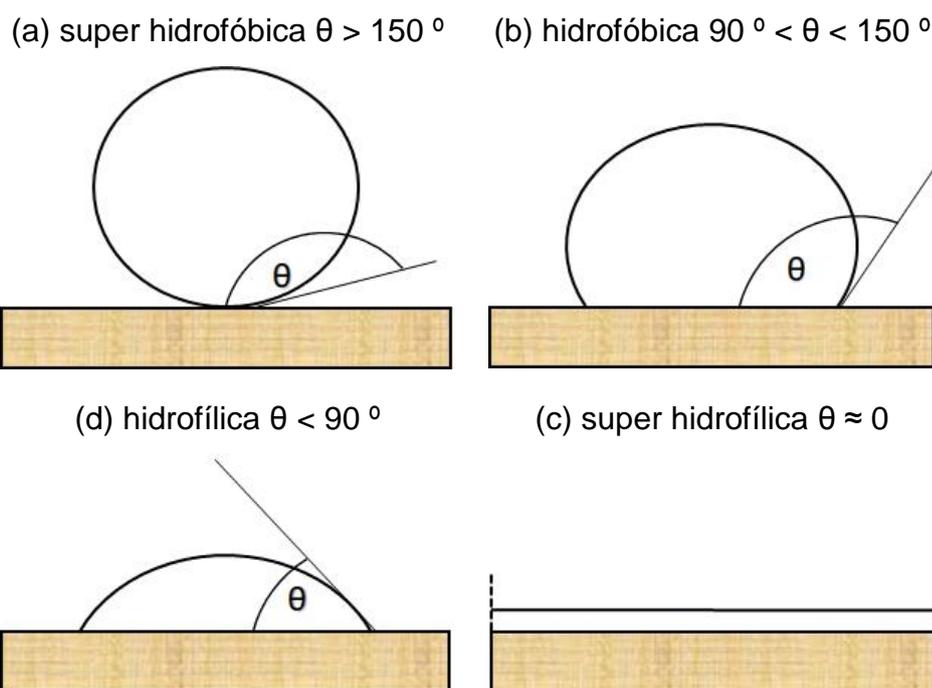
Análises de espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram conduzidas com um espectrômetro Jasco FT / IR-410 em modo de refletância total atenuada (ATR), disponível no laboratório de Plasmas Tecnológicos do Campus Experimental da Unesp em Sorocaba. Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda de 4000-600 cm^{-1} , com 128 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

2.3.5 Determinação do ângulo de contato (AC)

O ângulo de contato das amostras foi medido pela técnica de gota séssil em um goniômetro Ramé Hart (modelo 100-00) com água deionizada. Resultados esperados para o comportamento da gota séssil em cada tipo de superfície estão representados na Figura 9. Para a amostras de nanocelulose sem

nanopartículas de prata foram depositadas três gotas de água em diferentes pontos da superfície, com 10 medidas do ângulo de contato cada uma. Os resultados correspondem à média das 30 medições \pm o desvio padrão das medições. Para as amostras contendo nanopartículas, as gotas depositadas sobre a superfície espalharam-se imediatamente.

Figura 9 – Representação dos tipos possíveis de comportamentos de uma superfície em relação à água.



Fonte: o autor.

Para cada condição apresentada na Figura 9, em (a) a adesão líquido-sólido é praticamente zero sem qualquer molhabilidade da superfície, em (b) há uma leve adesão líquido-sólido porém, não há espalhamento sobre a superfície, em (c) há um espalhamento espontâneo da gota sobre o sólido e em (d) a gota se espalha indefinidamente sobre a superfície do sólido e seu molhamento é total (LUZ, RIBEIRO, & PANDOLFELLI, 2008).

2.3.6 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por Dispersão de Energia (MEV-EDS)

Foi utilizando um microscópio JEOL JSM-6010 LA, utilizando energia incidente de 2,5 a 10 kV e um detector para elétrons secundários. Para a análise, as amostras foram revestidas com uma película fina de Pd-Au, de modo a evitar o efeito

de carga. O método de Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS) foi utilizado para analisar elementos químicos presentes na superfície da amostra, utilizando energia de 3 kV.

2.3.7 Determinação do Halo de inibição – Suspensões Controle de prata

Os testes de halo de inibição foram conduzidos nas suspensões de prata através da técnica de disco-difusão em ágar, com cepas de microrganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa* previamente cultivadas em caldo Müeller-Hinton durante 24h, a 37 °C.

Foram criados “poços” de 10 mm de diâmetro sobre as culturas de microrganismos, onde foi adicionado 0,5 ml das suspensões de prata (controle) para então serem incubadas por 24 h a 35 °C.

2.3.8 Determinação do Halo de inibição nos filmes NC-AgNPs

Foram cultivadas em caldo Müeller-Hinton durante 24h, a 37 °C, cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* em placas Petri previamente esterilizadas.

As amostras dos filmes nanocompósitos foram cortadas em formato circular com 5 mm de diâmetro dentro de uma capela de fluxo laminar e posteriormente ficaram em repouso sobre radiação ultravioleta para esterilização por 45 minutos conforme demonstrado na Figura 10, cabe salientar que a exposição não promoveu alteração na morfologia ou coloração dos filmes tendo sido empregada apenas para inativação de microrganismos presentes em sua superfície antes das etapas subsequentes.

Após esse período de descontaminação, as amostras foram agrupadas nas placas Petri contendo o inóculo e posteriormente acondicionadas em estufa para avaliar após 24 horas se havia formação de halo de inibição.

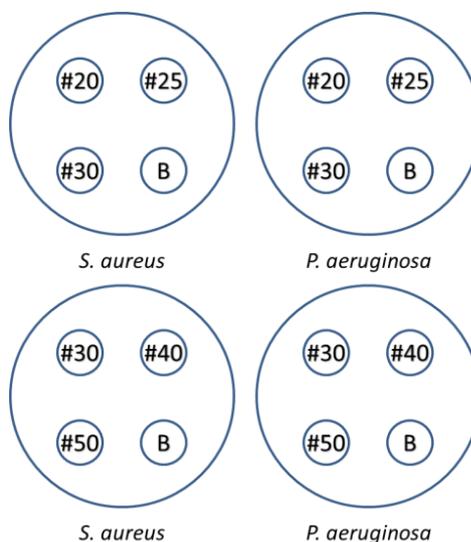
Figura 10 – (a) Amostras de filmes nanocompósitos submetidas à esterilização por radiação ultravioleta em capela de fluxo laminar. (b) amostras posicionadas sobre placas cultivadas com *S. aureus* e *P. aeruginosa* em caldo Müller-Hinton durante 24h a 37 °C.



Fonte: o autor.

Cada teste foi realizado em triplicata, para cada uma das concentrações de filmes nanocompósitos produzidos, tendo sido utilizadas ao todo 12 placas Petri. A Figura 11 apresenta um diagrama das disposições das amostras para caracterização do efeito microbiológico.

Figura 11 - Esquema representativo das placas Petri contendo amostras de teste para caracterização das propriedades antimicrobianas. B= branco.



Fonte: o autor.

Capítulo 3

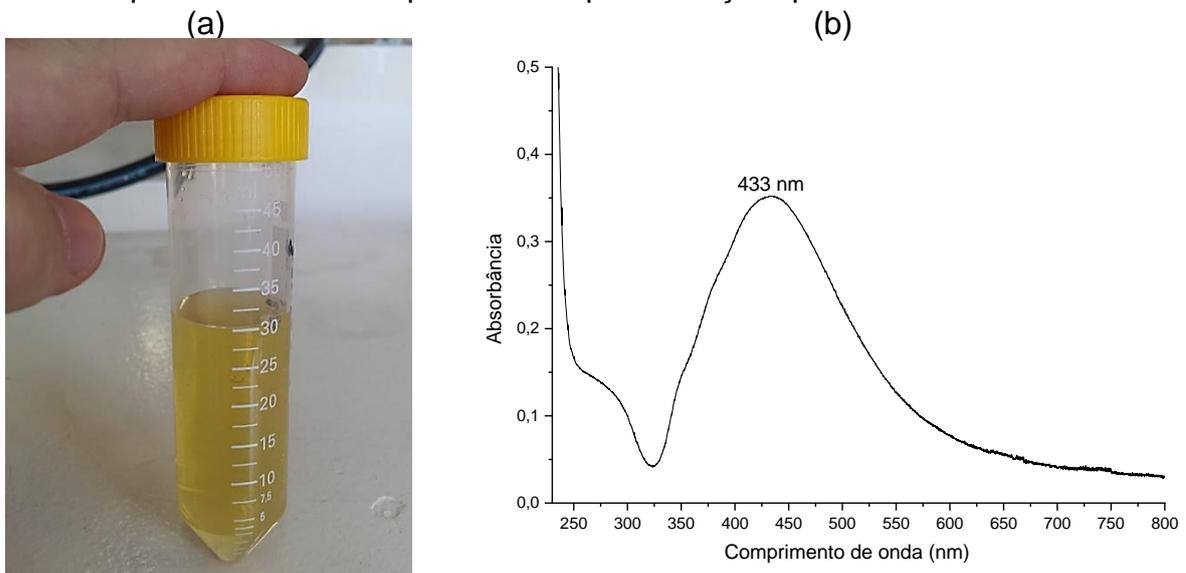
RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos a partir das técnicas de caracterização especificadas na Tabela 5, algumas considerações relevantes em relação às propriedades dos filmes serão comentadas brevemente assim como as dificuldades observadas ou a necessidade de emprego de outras técnicas complementares que pudessem auxiliar na compreensão das propriedades dos filmes confeccionados neste trabalho.

3.1 Tamanho e forma das AgNPs

O espectro UV-Vis obtido das AgNPs sintetizadas pela técnica de redução química com citrato de sódio (AgNPs-C) está representado na Figura 12.

Figura 12 – (a) Registro fotográfico da suspensão de AgNPs-C. (b) Espectro UV-Vis da suspensão coloidal de prata obtida pela redução química com citrato de sódio.



Fonte: o autor

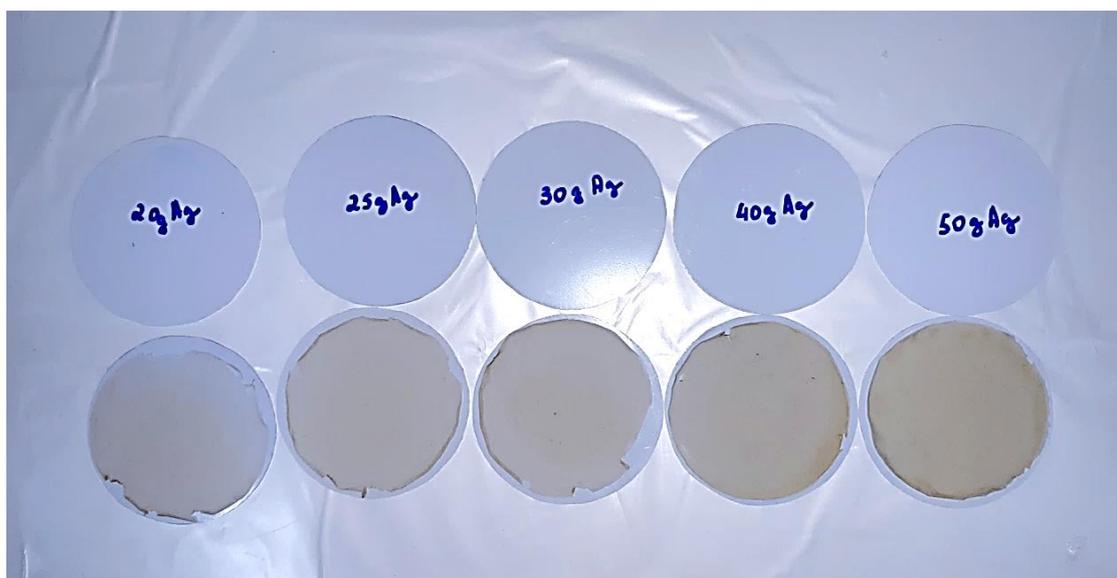
É possível verificar que as AgNPs obtidas possuem de 35-50 nm de diâmetro, e de acordo com a literatura, AgNPs obtidas através do método de síntese com citrato de sódio apresentam formato esférico (ROY, PATRA, SAHA, MADHURI, & SHARMA, 2015).

3.2 Resultados da caracterização dos filmes de nanocelulose e AgNPs

A Figura 13 apresenta os filmes nanocompósitos obtidos após filtração à vácuo e antes da sua montagem no sistema de secagem onde ficaram em processo de cura por 3 a 7 dias. Na figura é possível perceber o aumento da coloração dos filmes em função do aumento da massa de solução de nanopartículas imposta ao filme durante o processo de filtração.

A análise visual indica que foi possível obter filmes com diferentes teores de nanopartículas de prata incorporadas ao filme de nanocelulose.

Figura 13 - Filmes nanocompósitos obtidos após filtração à vácuo

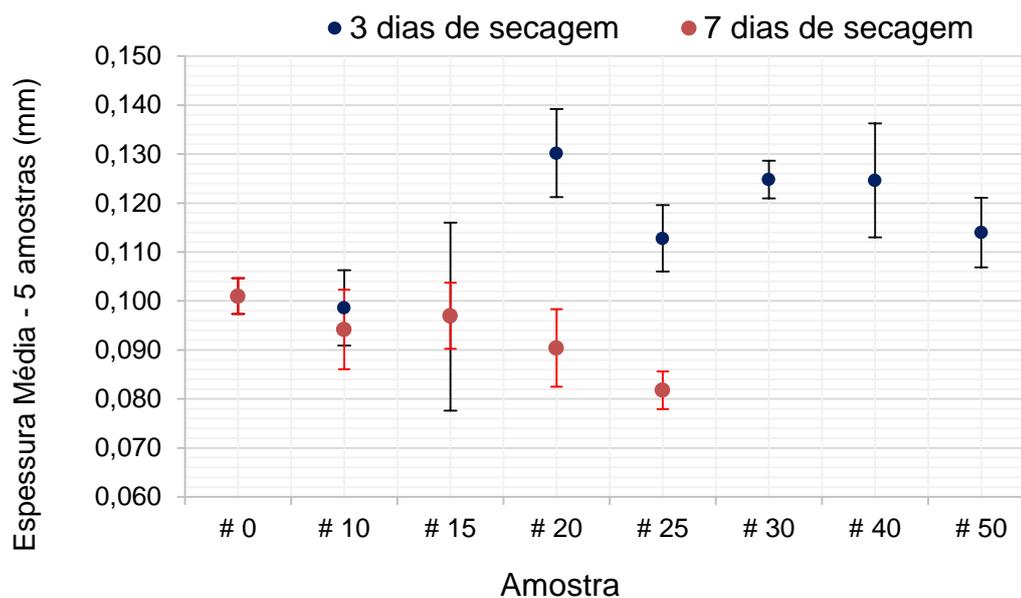


Fonte: o autor.

3.2.1 Resultados de Espessura

Na Figura 14 estão representados os resultados de espessura determinados a partir de uma média de 5 medições realizadas em cada filme.

Figura 14 - Espessura dos filmes nanocompósitos para 3 e 7 dias de secagem.



Fonte: o autor.

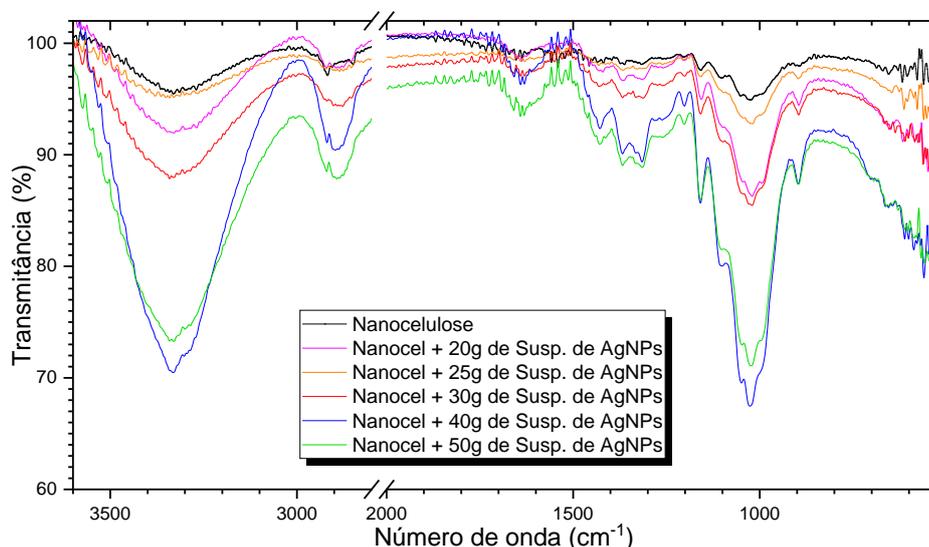
A elevada interação das ligações de hidrogênio presentes entre os grupos OH da nanocelulose e sua umidade residual, permite que ocorram pontos de ancoragem enquanto o filme está em processo de secagem (quando as moléculas de água vão sendo liberadas no ar), o que torna sua superfície mais rugosa. Os discos de PVC são empregados para ajudar na conformação das nanofibrilas, mas também, para diminuir a taxa de perda de umidade dos filmes, impedindo a reorganização em sentido perpendicular à orientação das nanofibrilas de celulose, anteriormente assentadas durante o processo de filtração à vácuo.

Observa-se que a retirada dos filmes do sistema de secagem após 3 dias produziu filmes com espessura levemente superior em relação aos filmes que ficaram por 7 dias no sistema de secagem. A inspeção visual dos filmes mais espessos indicou maior rugosidade, o que pode ter acarretado na sua maior espessura efetiva.

3.2.2 Espectro ATR-FTIR

Os filmes obtidos foram submetidos à análise de ATR-FTIR de modo que pudessem ser observadas a presença de grupos funcionais e suas respectivas ligações. A Figura 15 apresenta o espectro obtido para filmes de nanocelulose com diferentes concentrações de prata. A região entre 2000 e 2800 cm^{-1} foi omitida pois não apresentou absorções relevantes do material.

Figura 15 - Espectro de ATR-FTIR dos filmes de NC-AgNPs com diferentes concentrações de prata



Fonte: o autor.

O espectro de infravermelho por reflectância total atenuada demonstra na região de 3400 cm^{-1} o modo vibracional característico para o grupo hidroxila e em 2900 cm^{-1} os grupos relacionados às vibrações simétricas e assimétricas do grupo CH_2 , assimétrica do grupo CH_2OH e a deformação axial assimétrica da ligação C-H presente nos grupos metílicos. Em 1175 e 1000 cm^{-1} estão evidentes bandas de absorção características nas ligações presentes entre C-O, C-C, C-OH e C-O-C. Na proximidade há uma banda de absorção em 895 cm^{-1} também associada à ligação CH_2 (SOCRATES, 1980).

Como as nanopartículas de prata não estão quimicamente ligadas ao filme de nanocelulose, era esperado que não fossem observadas absorções relacionadas à prata no espectro FTIR, como pôde ser confirmado pela Figura 15. Seu efeito no filme, contudo, está associado ao aumento da espessura óptica

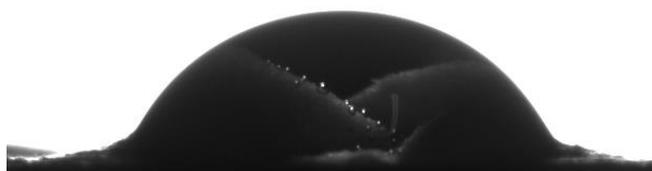
efetiva, e conseqüentemente do índice de refração, uma vez que as nanopartículas provavelmente foram incorporadas nas regiões “vazias” entre as nanofibrilas de celulose. Esse aumento, evidente na alteração de coloração observada anteriormente na Figura 13, ocasiona o aumento na intensidade de absorção observado para todas as bandas do espectro na Figura 15.

3.2.3 Ângulo de contato - AC

A medida de ângulo de contato permite identificar o tipo de afinidade de uma superfície com um determinado líquido e determinar sua energia de superfície. O método utilizado neste trabalho utilizou um goniômetro que é capaz de medir a tangente da gota líquida com a superfície sólida dos filmes de nanocelulose com AgNPs para um dado número de medições, e desta maneira determinar o ângulo de contato correspondente. As representações do tipo de superfície em relação ao ângulo apresentado estão ilustradas na Figura 9.

Os filmes de nanocelulose sem a adição de AgNPs apresentaram um valor médio de ângulo de contato de $76,0 \pm 0,9^\circ$ para um total de 30 medições, indicando seu perfil hidrofílico. A Figura 16 exibe a imagem da gota formada nessa condição. A presença de grupos OH característicos da superfície da nanocelulose justificam a interação entre a gota de água e a superfície dos filmes.

Figura 16 - Perfil da gota formada sobre a superfície de nanocelulose



Fonte: o autor.

Para os filmes de nanocelulose com AgNPs não foi possível realizar o registro do ângulo de contato, já que ocorreu espalhamento quase total da gota

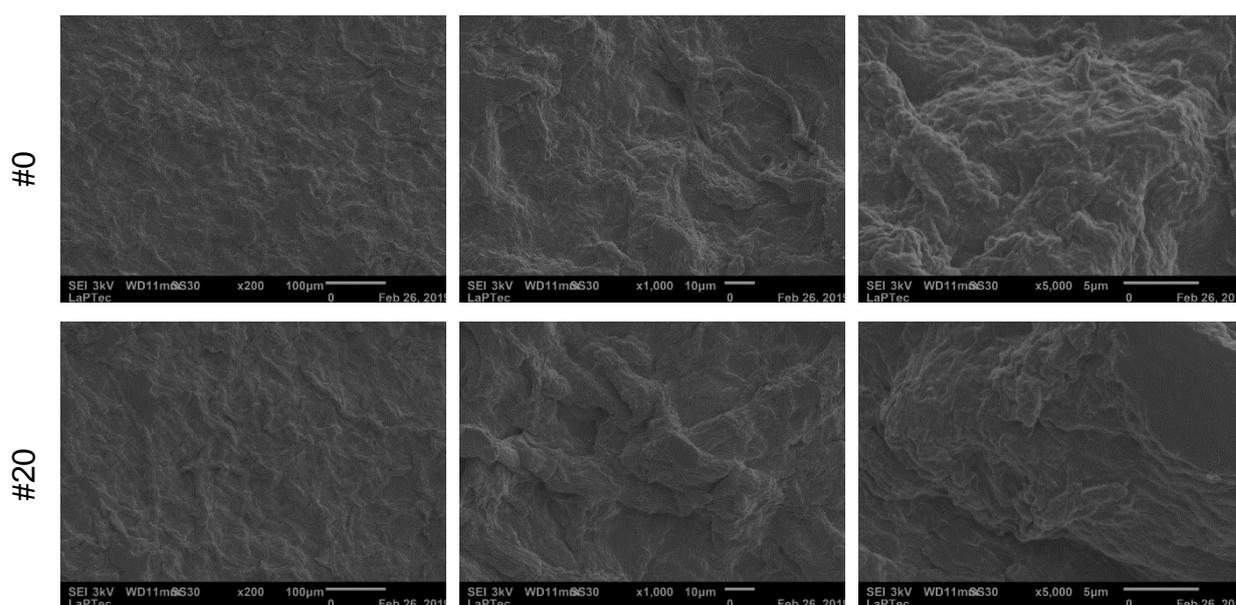
sobre a superfície. Uma das hipóteses é a característica rugosa apresentada nos filmes, além de a presença de partículas com elevada energia de superfície, as AgNPs, sobre a superfície dos filmes e em seu interior possivelmente terem acentuado as interações de Van der Waals entre o sólido e o líquido.

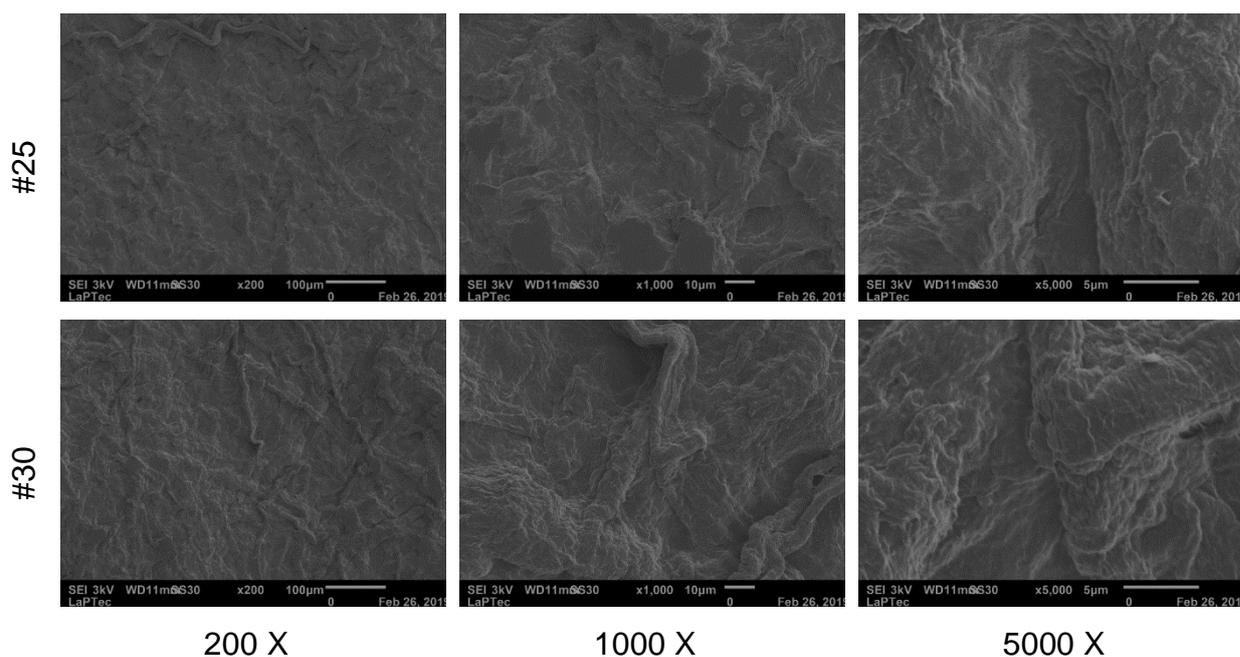
Tentativas de medidas para os filmes #20 até #30, resultaram em valores muito menores que os resultados encontrados nas medições da nanocelulose pura, nos casos em que foi possível medir um dos lados da gota. Porém, os valores de desvio padrão foram muito elevados, já que a rápida absorção da gota sésil em cada caso superou a capacidade do software do equipamento (goniômetro) em adquirir as 10 medidas.

3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Imagens obtidas com o microscópio eletrônico de varredura com ampliações nominais de 200x, 1000x e 5000x realizadas nas amostras com diferentes concentrações de nanopartículas de prata denominadas #0, #20, #25 e #30 foram analisadas com objetivo de avaliar a morfologia do filme e verificar se há um padrão de distribuição de elementos dispersos em sua superfície.

Figura 17 – Micrografias dos filmes de nanocelulose com diferentes concentrações de AgNPs e diferentes ampliações da imagem.





Fonte: o autor.

Nas imagens de microscopia registradas não foram observadas diferenças perceptíveis relacionadas à variação da concentração de nanopartículas de prata incorporadas nos filmes de nanocelulose. Em todas as amostras verifica-se uma distribuição uniforme das fibras de nanocelulose.

Na varredura em diferentes pontos do material não foi observada nenhuma grande variação em relação a morfologia ilustrada na Figura 17. Esse resultado confirma a obtenção de filmes compósitos com boa uniformidade a partir de uma metodologia simples e barata, que consistiu na filtração a vácuo, com materiais disponíveis na maioria dos laboratórios. É importante ressaltar que o sistema desenvolvido para a secagem das amostras contribuiu para manutenção dessa uniformidade, uma vez que alguns testes da secagem de filmes fora do “sanduiche” de PVC resultaram em filmes com grande enrugamento.

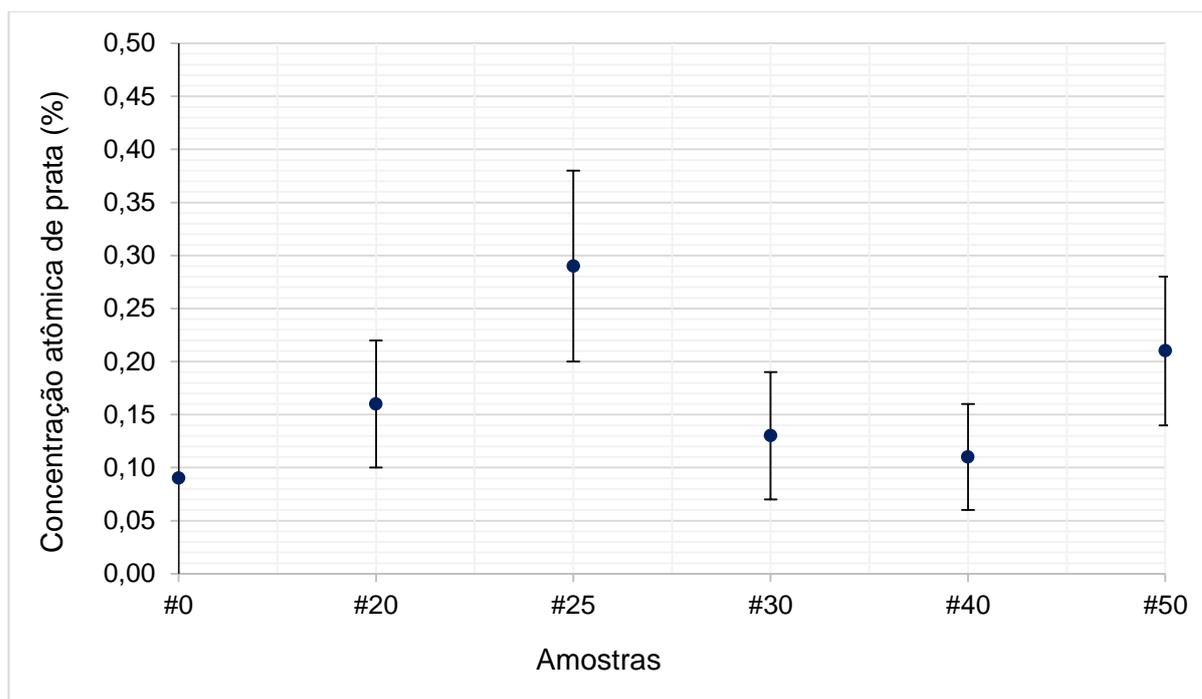
A não-observação das nanopartículas incorporadas ao filme é atribuída a resolução do equipamento combinada às características da amostra. Por se tratar de amostra não condutora, mesmo após metalização com filme de ouro-paládio, as amostras não permitem alcançar valores de ampliação mais elevados, nas condições de melhor operação do equipamento. O fato de metalizar a amostra também pode ter ocultado a presença das nanopartículas, cujo tamanho está no limite de resolução do microscópio utilizado.

3.2.5 Determinação de concentração atômica de prata por EDS

Com a finalidade de determinar o percentual atômico de prata na superfície nos filmes obtidos, as amostras com diferentes concentrações de prata foram analisadas por espectroscopia por energia dispersiva, a partir do microscópio eletrônico de varredura.

Os resultados apresentados na Figura 18 indicam baixa concentração de AgNPs sobre a superfície do filme, porém acima do erro em cada determinação, confirmando a incorporação das nanopartículas de prata no filme, que já havia sido evidenciada pela alteração de coloração observada nos filmes imediatamente após a preparação das amostras.

Figura 18 – Resultados da concentração atômica de prata na superfície dos filmes nanocompósitos determinada por espectroscopia por energia dispersiva EDS.



Fonte: o autor.

Os resultados esperados para a concentração de prata, partindo dos cálculos realizados na Tabela 4 em relação ao valor determinado por EDS não são concordantes, porém, sabe-se que a análise de Espectroscopia por Dispersão de Energia está limitada à análise de composição atômica de superfície e dependendo da energia de penetração no filme utilizada, alguns micrômetros do filme podem ser

também analisados. Porém, nos filmes obtidos por filtração à vácuo há uma concentração significativa de prata adsorvida na região entre as fibras de nanocelulose no interior do material e que não podem ser detectadas na técnica EDS.

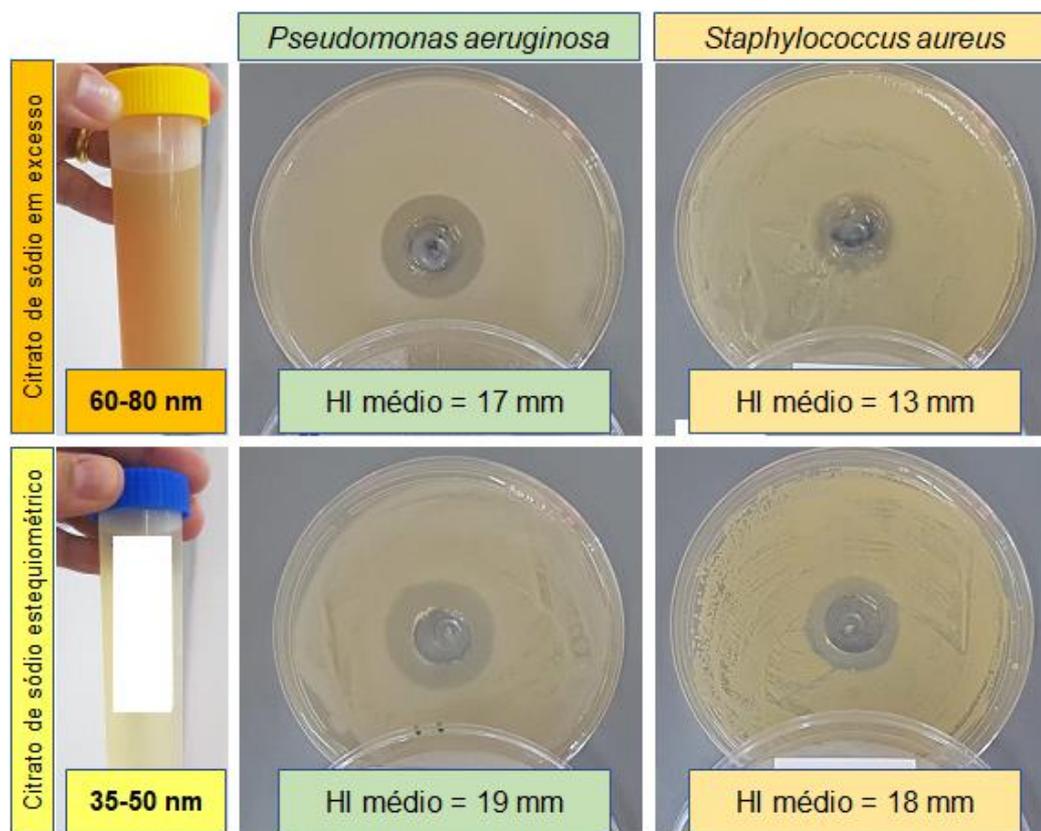
É importante lembrar ainda que o cálculo de concentração de referência na Tabela 4 assume por hipótese que toda quantidade de nanopartículas de prata presente na suspensão inicial fica retida entre as nanofibrilas do filme de celulose, o que não foi verificado.

Medidas mais precisas da concentração de prata, exigem a análise do líquido que passa pelo filtro no processo de confecção dos filmes nanocompósitos, além de outros tipos de análises de composição elementar, como fluorescência de raios X.

3.2.6 Resultado de halo de inibição para suspensões controle de AgNPs

Foram determinados os halos de inibição das suspensões de AgNPs sintetizadas neste trabalho, com a finalidade de observar seu efeito antimicrobiano característico antes da determinação do halo nos filmes nanocompósitos. Como é possível observar na Figura 19, os halos formados para diferentes suspensões, com diferentes estágios de agregação de partículas indicaram desempenho distinto contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Figura 19 - Halos de inibição formados para diferentes suspensões de AgNPs



Fonte: o autor.

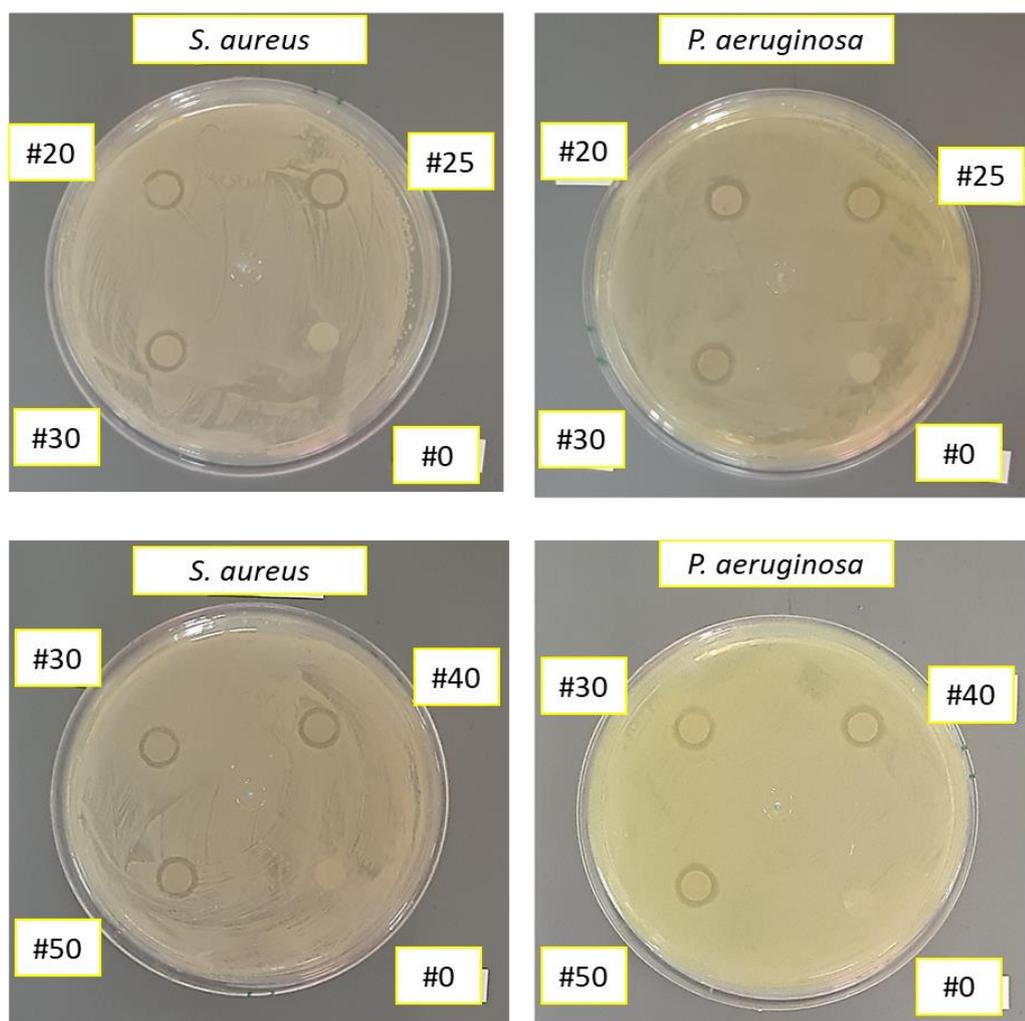
Nanopartículas com tamanho compreendido entre 35 e 50 nm apresentaram resultados de halo de inibição médio de 19 mm para *P. aeruginosa* e 18 mm para *S. aureus*, enquanto AgNPs com tamanho médio entre 60 e 80 nm apresentaram valores de 17 mm e 13 mm, respectivamente.

Esse resultado já era esperado pois com um tamanho menor de partícula aumenta-se o número de faces disponíveis na estrutura cristalina da prata, o que acentua sua reatividade contra cepas de microrganismos (GARCIA, 2011).

3.2.7 Resultados de halo de inibição para os filmes NC-AgNPs

A Figura 20 apresenta os halos de inibição formados em torno dos filmes de nanocelulose com AgNPs (NC-AgNPs), caracterizados quanto ao seu efeito antimicrobiano.

Figura 20 – Exemplos de placas de cultura com halo de inibição em torno dos filmes nanocompósitos.

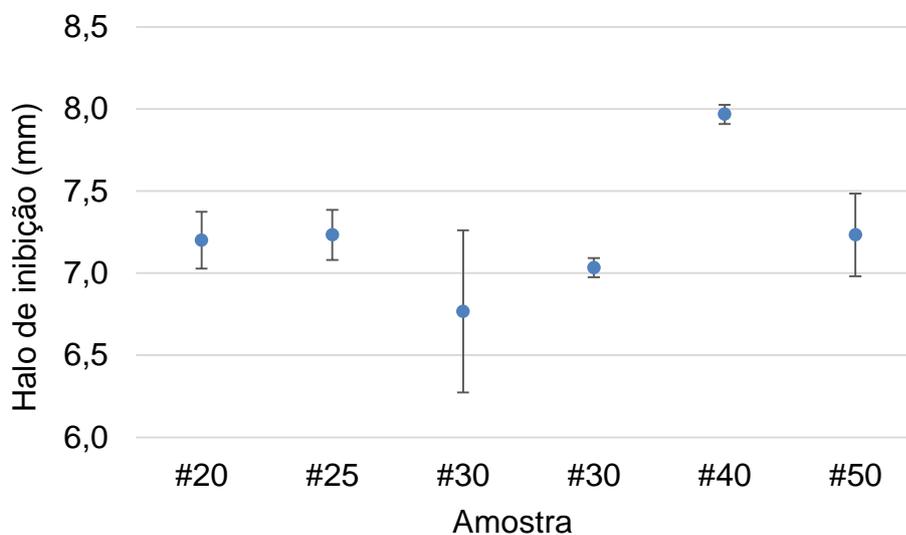


Fonte: O autor.

Na Figura 20, observa-se que em todos os casos não houve halo de inibição em torno do filme de nanocelulose sem nanopartículas de prata (#0), considerado filme controle. Para todas as outras concentrações testadas houve inibição do crescimento bacteriano na redondeza das amostras. Esse resultado deixa clara a dependência em relação à presença da prata e o efeito bactericida dos filmes produzidos.

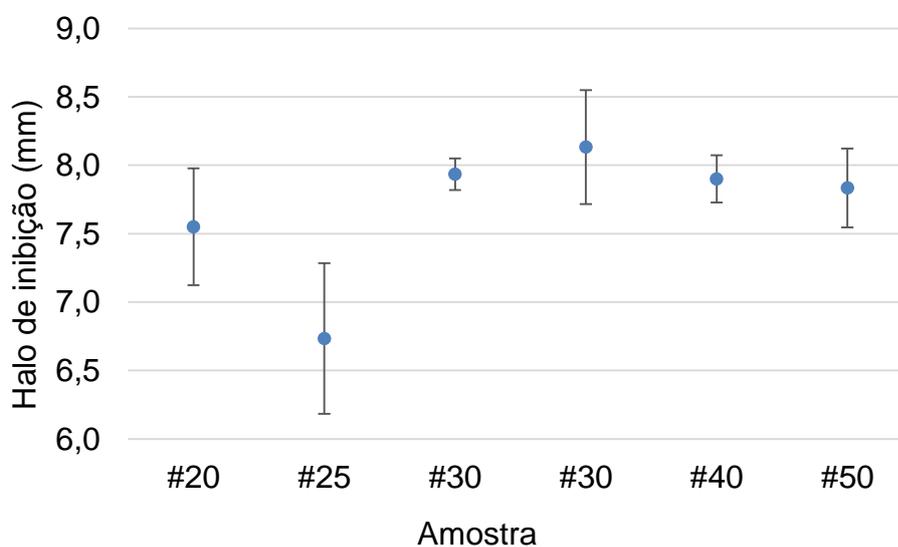
Após realização das medições dos halos formados com auxílio de um paquímetro, os resultados das medidas e dos respectivos erros associados estão presentes na Figura 21 e Figura 22, respectivamente.

Figura 21 – Medição média de halos de inibição formados pelos filmes de NC-AgNPs contra cepas de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: o autor.

Figura 22 - Medição média de halos de inibição formados pelos filmes de NC-AgNPs contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: o autor.

Como podemos observar nas Figuras 21 e 22, os halos de inibição formados para os discos de filmes NC-AgNPs são semelhantes e não foram superiores quando a concentração de prata nos filmes aumentou. Apesar destes resultados não apresentarem efeito proporcional à concentração de prata em cada filme, são fundamentais para demonstrar que mesmo com as AgNPs imobilizadas na

superfície do filme e em seu interior, essa característica pode viabilizar a sua aplicação em diversos materiais em que o efeito antimicrobiano é uma propriedade de interesse, seja em utensílios de uso médico, curativos para feridas ou embalagens para alimentos, entre outros.

Capítulo 4

TRABALHOS EM ANDAMENTO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste capítulo serão apresentados alguns trabalhos que estão em andamento ou ainda serão realizados, com a finalidade de viabilizar a implantação de AgNPs em filmes de nanocelulose utilizando sistemas que requerem essas partículas dispersas em suspensões coloidais apolares. Uma técnica conhecida como Implantação Iônica por Imersão em Plasma (PIII) pode ser vantajosa no sentido de permitir a alteração apenas superficial das características de filmes de nanocelulose previamente preparados, sem que suas propriedades internas sejam alteradas. Alguns surfactantes de amônio quaternário podem auxiliar na dispersão estável de AgNPs sobre solventes orgânicos voláteis que podem transportar com maior facilidade essas partículas para o ambiente de excitação do plasma.

4.1 Procedimento para estabilização de AgNPs em meio apolar

4.1.1 Justificativa da transferência de fase das AgNPs

Inicialmente, faz-se necessário o entendimento das peculiaridades da técnica de Implantação Iônica por Imersão em Plasma, a P-III, para então ser compreendida a importância da transferência de fase das AgNPs sintetizadas neste trabalho do meio aquoso para um meio não aquoso.

A técnica consiste na implantação, sobre um determinado substrato, de elementos químicos presentes dentro da atmosfera de um reator de plasma de radiofrequência, que são orientados a partir das colisões inelásticas entre elétrons

fortemente acelerados e fragmentos moleculares neutros e ativos presentes em seu interior. Dentro deste conjunto complexo de reações químicas há a produção de radiação visível e ultravioleta.

O ambiente energeticamente favorável disponível no plasma é uma alternativa aos processos químicos de polimerização convencionais, em que catalisadores específicos são utilizados para diminuir a energia de ativação necessária para geração de radicais livres e, conseqüentemente, dar início às etapas de crescimento polimérico a partir dos monômeros que estão sendo alimentados nas reações.

Tendo em vista que os monômeros precisam estar expostos às interações inelásticas presentes no plasma, o mesmo deve ocorrer em relação às nanopartículas metálicas, como as AgNPs, logo, seu meio de dispersão deve oferecer algumas vantagens para facilitar a mobilização de partículas para dentro do reator, como fácil volatilização dentro do reator.

São diversas as possibilidades de aplicação para nanopartículas em geral, e na maioria das vezes as barreiras encontradas estão relacionadas com a forma de estabilização e meio em que estão dispersas. Em geral, reações que ocorrem em meio aquoso ou não aquoso, dependem de aditivos poliméricos ou eletrólitos específicos que devem estar adsorvidos sobre a superfície das partículas para impedir sua agregação. Na técnica de síntese desenvolvida neste trabalho, grupos citrato estão ligados sobre a superfície das AgNPs e promovem uma estabilização eletrostática destes elementos sobre a água, o que torna necessária sua substituição ou adição de novos grupos sobre os já existentes, para que seja possível sua transferência para um meio não aquoso.

Em alguns testes preliminares, o ácido oleico foi utilizado como substituto para o citrato na imobilização das AgNPs, inicialmente sintetizadas em meio aquoso, que passariam a ser estabilizadas estericamente pelas longas cadeias presentes na molécula do ácido carboxílico e posteriormente, poderiam ser transferidas para um solvente orgânico escolhido com boa qualidade de vaporização, neste caso o THF, tetrahydrofurano.

A seguir serão descritos os materiais e métodos utilizados nos testes iniciais de estabilização de AgNPs em meio não aquoso.

4.1.2 Materiais utilizados

Foram utilizados 2 tubos Falcon de 15 ml e 2 béqueres de 50 ml. Os reagentes empregados foram ácido oleico P.A. (Synth), tetrahidrofurano P.A.-A.C.S. (Hexis) e um novo lote de suspensão coloidal de prata obtida pela técnica de síntese descrita no capítulo 2.1 Síntese de AgNPs.

4.1.3 Procedimento Experimental

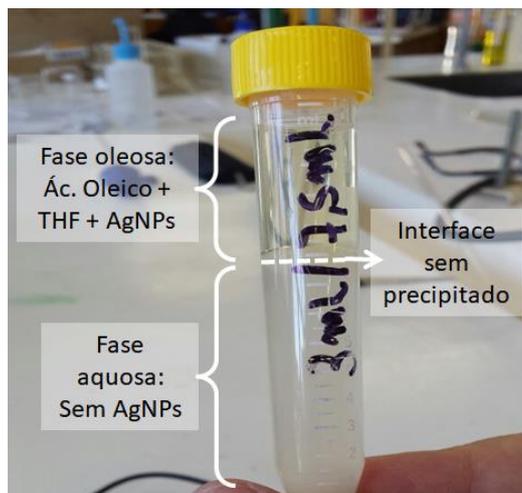
Em um tubo Falcon foram adicionados 7,5 ml de suspensão coloidal de prata, 1 ml de ácido oleico e 6,5 ml de tetrahidrofurano (THF). No segundo tubo Falcon, foi variada a concentração de ácido oleico sendo utilizado 7,5 ml de suspensão coloidal de prata, 3 ml de ácido oleico e 3,5 ml de THF. Ambos os tubos Falcon apresentaram separação de fase entre a fase superior não aquosa (ác. Oleico + THF) e a fase inferior aquosa (H₂O desmineralizada + AgNPs).

Os tubos foram agitados vigorosamente em sentido axial (↑↓) por 5 minutos para promover maior interação entre as fases e permitir o contato das AgNPs, presentes na fase aquosa, com a fase superior não aquosa. Os tubos foram mantidos por sete 7 dias em repouso para separação de fase para então avaliar a estabilidade dos agentes dispersantes (AgNPs) em cada um dos meios.

4.1.4 Resultados preliminares

Foi observado que as AgNPs presentes no tubo falcon 1 se aglomeraram na interface das fases, apresentando precipitado na cor característica de prata metálica. No tubo falcon 2 (Figura 23) foi possível observar que as AgNPs mantiveram-se estáveis na fase não aquosa, que apresentou cor amarela característica sem promover a formação de precipitado metálico na interface, indicando que com uma maior concentração de ácido oleico na fase apolar, há maior estabilidade na dispersão coloidal, permitindo que o dispersante (AgNPs) não se aglomere na interface das fases.

Figura 23 - Estabilização de AgNPs em solvente apolar



Fonte: o autor.

Após novos testes de estabilização, realizados a partir de outro lote de nanopartículas de prata com tamanho de partícula semelhante (35 – 50 nm) e mesmo lote dos reagentes, infelizmente não foi possível reproduzir suspensões semelhantes às encontradas anteriormente com as AgNPs estáveis em meio não aquoso. Algumas hipóteses foram levantadas em relação à não reprodutibilidade da técnica de transferência de fase, como condições ambientais, envelhecimento dos reagentes, porém após ações sistemáticas de repetição não terem surtido o efeito desejado, optou-se pela busca de alternativas reprodutíveis de transferência de fase, com melhor aprofundamento técnico e teórico.

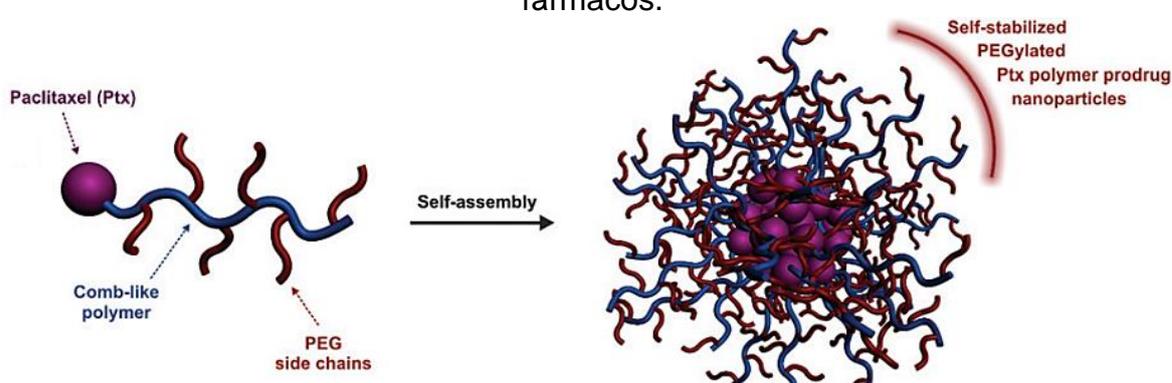
4.1.5 Outras Alternativas

Sastry (2013) sugere que nanopartículas de ouro presentes em meio polar devem ser submetidas previamente à um processo de hidrofobização antes de ser possível sua transferência de fase para o solvente Acetato de Butila. Também sintetizadas utilizando o citrato de sódio como agente redutor, como descreve o método Turkevich, as mesmas poderiam ser transferidas para o solvente orgânico através da complexação das partículas com um polímero do tipo pente, que deve estar presente na fase orgânica.

Um exemplo de estrutura de polímero do tipo pente está representado na Figura 24. Bao et. al (2018) utilizaram as técnicas de polimerização mediada por nitróxido (NMRP) e polimerização radicalar controlada por transferência de cadeia

reversível por adição-fragmentação (RAFT) para obterem a molécula do Paclitaxel (Taxol®) (convencional fármaco utilizado em tratamento quimioterápico) encapsulada com ramificações de cadeias de polietileno glicol, formando uma micro cápsula de proteção auto montada com cadeias que impedem a interação direta do fármaco com elementos químicos próximos, mecanismo comumente utilizado no desenvolvimento de pesquisa na área da liberação controlada de fármacos (BAO, GUÉGAIN, MOUGIN, & NICOLAS, 2018).

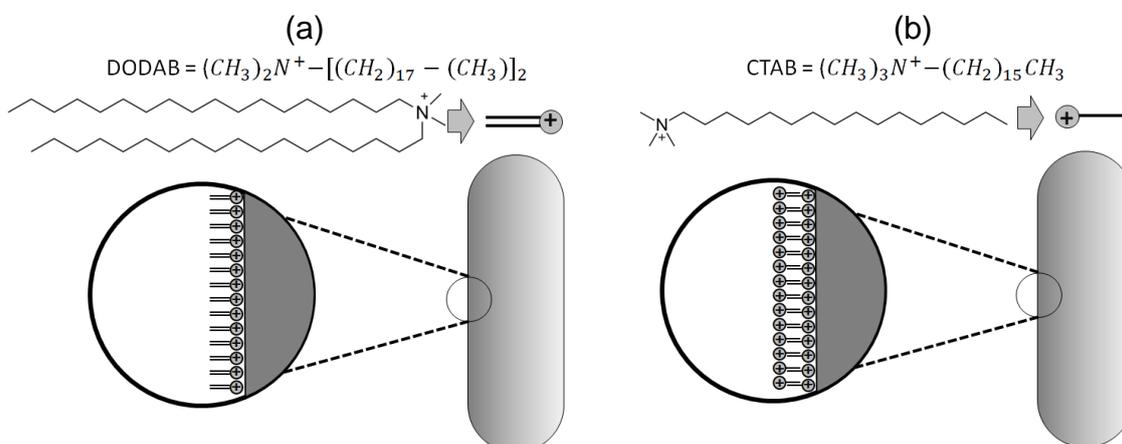
Figura 24 - Polímero do tipo-pente utilizado na imobilização e transporte de fármacos.



Fonte: Adaptado de (BAO, GUÉGAIN, MOUGIN, & NICOLAS, 2018)

Alternativas para a utilização do ácido oleico podem compreender a utilização de surfactantes catiônicos de amônio quaternário como o brometo de dimetil-di-octadecilamônio (DODAB) e o brometo de cetil trimetilamônio (CTAB), que podem promover reações de complexação com as AgNPs de modo que seja possível aumentar a interação das mesmas com solventes de caráter apolar e de fácil volatilização. As estruturas estão representadas na Figura 25.

Figura 25 - Surfactantes de amônio quaternário (a) DODAB e (b) CTAB.



Fonte: (a) e (b) adaptado de (BERNABÓ, PUCCI, RAMANITRA, & RUGGERI, 2010, p. 1463)

É possível visualizar na Figura 25 a forma de interação do CTAB e DODAB em superfícies de nanotubos de prata, onde as cabeças polares podem interagir com a superfície das partículas de modo que as caudas apolares alterem a sua miscibilidade em água, provocando portanto o efeito de hidrofobização da superfície. Ao se estimar a concentração micelar crítica (CMC¹⁵) de uma superfície, podem ser fornecidas somente as moléculas dos respectivos compostos que serão suficientes para o recobrimento total das partículas, de modo que não ocorra o efeito de interação de caudas apolares, representadas na Figura 25 (b), que ocorrem em decorrência da alteração total da estabilidade do sistema devido aumento demasiado da concentração do surfactante.

4.2 Implantação iônica por imersão em plasma P(III) de AgNPs em filmes de nanocelulose

4.2.1 Justificativa da técnica

A implantação de AgNPs sobre diferentes substratos utilizando a técnica P-III, poderia criar uma interessante alternativa para obtenção de nanocompósitos. Entre os quais, materiais que tivessem somente suas características de superfície alteradas e onde seria possível selecionar, a partir de técnicas de síntese de nanopartículas adequadas, o tamanho de partícula para se alcançar uma propriedade específica. Para tanto, foi realizada uma deposição a partir da primeira alíquota de suspensão de AgNPs em meio não aquoso obtida anteriormente, cerca de 3 ml. Os materiais, métodos e um esquema do reator utilizado na síntese estão descritos na próxima seção.

4.2.2 Materiais utilizados

Foram utilizados filmes de nanocelulose produzidos pelo sistema de filtração à vácuo, suspensão coloidal em meio apolar de AgNPs obtidas na seção

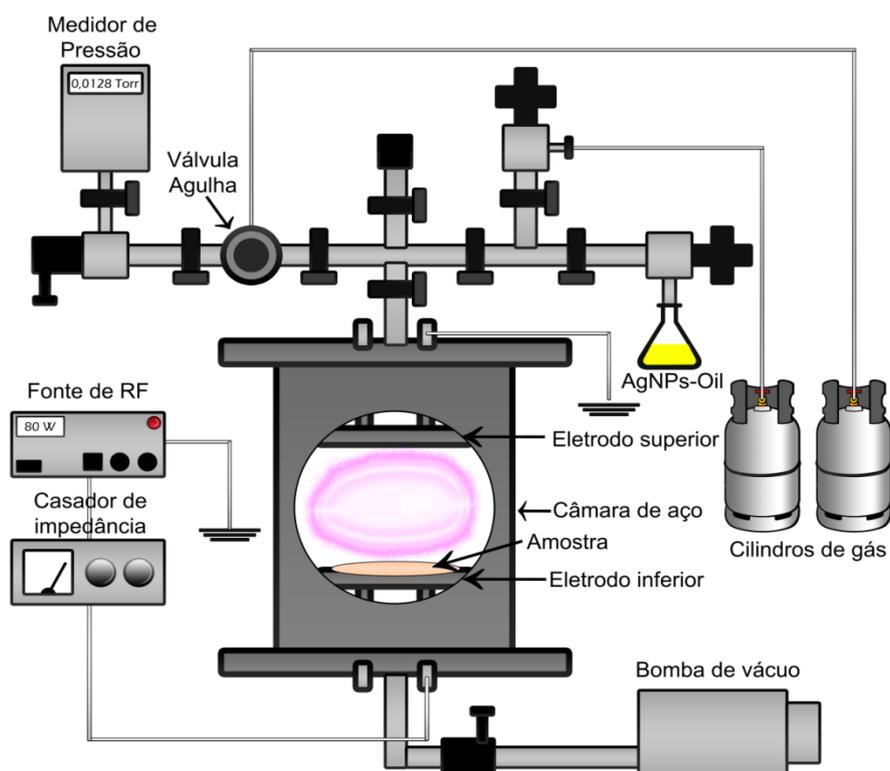
¹⁵ Menor concentração de um surfactante capaz de formar micelas. Experimentalmente é definida como a concentração em que a mudança de uma dada propriedade do sistema é observada (MUKERJEE & MYSELS, 1971).

2.2, em colaboração com o Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais PPGCM, no laboratório de plasmas tecnológicos da UNESP Sorocaba Campus Experimental. Os experimentos foram realizados em reator de plasma de aço inoxidável configurado com gás precursor de argônio.

4.2.3 Procedimento Experimental

Nos processos P-III foi utilizado plasma de argônio. Interligado no sistema, colocou-se a suspensão coloidal de AgNPs em meio não aquoso (AgNP-Oil), as quais eram conduzidas para o interior da atmosfera do plasma, possibilitando sua implantação sobre a superfície dos filmes de nanocelulose, através do sistema ilustrado na Figura 26.

Figura 26 – Configuração do reator em aço inoxidável de plasma de baixa pressão que será utilizado neste trabalho.



Fonte: o autor.

Foram realizadas duas tentativas de implantação, nas quais se utilizou a suspensão de AgNPs + THF + ácido oleico anexadas ao reator (AgNPs-Oil). As condições de plasma trabalhadas foram baseadas em uma pressão de trabalho (P_T) igual a 0,124 Torr (16,5 Pa), com uma pressão de fundo (P_F) de $1,2 \times 10^{-2}$ Torr. A

filme submetido ao plasma e #2 refere-se à segunda tentativa de implantação iônica por imersão em plasma.

São observadas alterações na morfologia dos filmes quando os mesmos são submetidos à atmosfera do plasma, levando à formação de pequenos sulcos na superfície dos filmes. Na magnificação de X5000, essa alteração é mais perceptível na amostra #2. Nenhum perfil de distribuição de AgNPs pode ser observado nas amostras.

Além da análise da morfologia, foi realizada análise EDS dos filmes submetidos ao plasma, cujos resultados estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados EDS após P-III em filmes de nanocelulose.

Amostra	Concentração atômica C (%)	Concentração atômica O (%)	Concentração atômica Ag (%)
#1	72,13 ± 0,02	27,86 ± 0,06	0,01 ± 0,04
#2	60,81 ± 0,02	39,19 ± 0,06	ND ¹⁶

Fonte: o autor.

A partir da Tabela 6 conclui-se que não foi encontrada concentração percentual de prata sobre os filmes depositados. Acredita-se que o volume relativamente pequeno de suspensão apolar obtida e a pouca mobilidade das partículas por conta do seu elevado peso molecular, tenham sido determinantes para não serem observadas concentrações de prata sobre os filmes com valores superiores ao erro experimental.

A obtenção de suspensões apolares de AgNPs com a utilização de agentes imobilizadores de amônio quaternário como o DODAB e o CTAB pode viabilizar o transporte de AgNPs para dentro do reator de modo que se obtenha maior concentração de Ag sobre a superfície dos filmes.

¹⁶ Não determinado.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Síntese de AgNPs

Foram obtidos resultados satisfatórios em relação à otimização da síntese de AgNPs via redução química com Citrato de sódio. Após testes de estabilidade preliminares foram identificadas oportunidades de melhorias em relação às proporções estequiométricas entre o sal redutor e o precursor da prata.

Os principais parâmetros de controle, tempo e temperatura, foram consideravelmente fáceis de serem controlados durante a síntese, porém, após o seu término, a suspensão obtida teve de ser imediatamente retirada do aquecimento e submetida à resfriamento forçado com água corrente, pois observou-se que qualquer prolongamento no tempo de aquecimento dos reagentes poderia favorecer novas etapas de nucleação indesejáveis, resultando no aumento do tamanho médio das partículas e conduzindo a uma mudança na coloração da suspensão de amarelo para uma cor levemente alaranjada.

Tendo sido conduzida em concentrações estequiométricas, a síntese possibilitou a obtenção de nanopartículas de prata com tamanho entre 35 e 50 nm e pH = 6,88, ou seja, não foi necessária a adição de soluções alcalinas para neutralização do meio, como sugerido na literatura. Após mais de 30 dias em armazenamento refrigerado (entre 5 °C e 10 °C) o frasco de AgNPs não apresentou precipitado de prata metálica e a coloração da suspensão também se manteve inalterada, o que significa uma suspensão bastante estável em condições controladas.

Para verificação do seu efeito antimicrobiano intrínseco, sem a imobilização das AgNPs sobre o substrato de nanocelulose, testes de disco-difusão

em ágar contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentaram halos de inibição nas suspensões de AgNPs “controle”, com diferentes estágios de agregação, sendo ligeiramente maiores para partículas de tamanho médio menor.

São sugeridas, contudo, novas rotas de síntese e transferência de fase que podem ser conduzidas na tentativa de se obterem suspensões de AgNPs em meio não aquoso e com potencial de aplicação variado. Através da hidrofobização das partículas através da sua complexação com brometo de dimetil-di-octadecilamonio (DODAB) ou brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) condições interessantes de estabilização de AgNPs em solventes orgânicos podem ser desenvolvidas.

5.2 Metodologia de confecção de filmes e seu efeito antimicrobiano

A confecção de filmes de nanocelulose e AgNPs utilizando um sistema de filtração à vácuo permitiu a obtenção de filmes com controle de sua gramatura e espessura, porém com alta molhabilidade se comparados filmes puros com filmes contendo a prata, já que a presença de AgNPs na superfície e interior das fibras de nanocelulose tende a provocar aumento da interação superficial e maior reatividade química.

Considera-se também que apesar de o sistema de filtração à vácuo apresentar limitações devido efeito de saturação do filme, que pode levar as AgNPs a atravessarem as nanofibrilas de celulose e precipitarem dentro do frasco Kitasato, sua baixa complexidade e o custo relativamente baixo dos materiais podem viabilizar a utilização desta técnica para produção de filmes antimicrobianos em larga escala.

Associando sua produção a baixo custo e a utilização de um suporte de secagem vertical, é possível impedir o enrugamento dos filmes, já que os discos de PVC nas duas superfícies de cada filme restringiam a interação do mesmo com a umidade do ar, e também ampliar o rendimento da secagem já que o seu empilhamento vertical permite a cura segura de até 30 filmes em um mesmo lote.

Para contornar o efeito de saturação descrito anteriormente, algumas técnicas de modificação de superfície como a implantação iônica por imersão em plasma (PIII) podem ser realizadas de modo a atingir a CMI de prata no substrato de interesse sem que ocorram alterações no interior dos filmes e conseqüentemente afetar suas propriedades físicas e químicas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M., NAEEM, N., IFTIKHAR, H., & LATIF, U. (2018). Synthesis, Characterization and Antimicrobial Properties of Silver Nanocomposites. *IntechOpen*, pp. 71-92.
- ALEXANDER, J. W. (2009). History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections*, 10(3).
- ALISSON, E. (12 de Junho de 2015). *Empresa Paulista dobra o prazo de validade de leite fresco pasteurizado*. Acesso em 28 de Agosto de 2018, disponível em Agência FAPESP: <http://agencia.fapesp.br/empresa-paulista-dobra-prazo-de-validade-de-leite-fresco-pasteurizado/21325/>
- BAO, Y., GUÉGAIN, E., MOUGIN, J., & NICOLAS, J. (22 de Dezembro de 2018). Self-stabilized, hydrophobic or PEGylated paclitaxel polymer produg nanoparticles for cancer therapy. *Polymer Chemistry - The Royal Society of Chemistry*.
- BERNABÓ, M., PUCCI, A., RAMANITRA, H. H., & RUGGERI, G. (2010). Polymer Nanocomposites Containing Anisotropic Metal Nanostructures as Internal Strain Indicators. *Materials*, 1461-1477.
- CAO, G. (2004). *Nanostructures & Nanomaterials*. Seattle, WA: Imperial College Press.
- CLARO, F. C. (2017). *Elaboração e caracterização de filmes a partir de fibrilas de celulose vegetal*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, Paraná.
- CLUTTERBUCK, A. L., COCHRANE, C. A., DOLMAN, J., & PERCIVAL, S. L. (2007). Evaluation antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*.
- CRUZ, M. C., RUANO, G., WOLF, M., HECKER, D., VIDAURRE, E. C., SCHMITTGENS, R., & RAJAL, V. B. (2015). Plasma deposition of silver nanoparticles on ultrafiltration membranes: Antibacterial and anti-biofouling properties. *Chemical Engineering Research and Design*, 524-537.

- ESTEVES, A. C., BARROS-TIMMONS, A., & TRINDADE, T. (2004). Nanocompósitos de matriz polimérica: Estratégia de síntese de materiais híbridos. *Química Nova*, 798-806.
- FERNANDES, P. E. (2014). *Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Viçosa, MG.
- FERNANDEZ, A., PICOUET, P., & LLORET, E. (2010). Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, pp. 222-228.
- GARCIA, M. V. (2011). *Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Campinas, SP.
- HANKIN, S. M., & CABALLERO, N. E. (2014). Acesso em 21 de Junho de 2018, disponível em Diálogos Setoriais União Europeia - Brasil: http://sectordialogues.org/sites/default/acoes/documentos/dialogos_setoriais_-_nanotecnologia_portugues.pdf
- HE, Y., & SHI, G. (2005). Surface Plasmon Resonances of Silver Triangle Nanoplates: Graphic Assignments of Resonance Modes and Linear Fittings of Resonance Peaks. *American Chemical Society*, 17503-17511.
- HOENICH, N. (2006). Cellulose for medical applications: past, present and future. Newcastle upon Tyne, Tyne and Wear, England: School of Clinical Medical Sciences.
- HOET, P. H., BRÜSKE-HOHLFELD, I., & SALATA, O. V. (08 de Dezembro de 2004). Journal of Nanobiotechnology. *Nanoparticles - known and unknown health risks*.
- KASNOWSKI, M. C., MANTILLA, S. P., OLIVEIRA, L. A., & FRANCO, R. M. (2010). Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*(15).
- KAUSAR, A. (2017). Polymer/Silver Nanoparticle Nanocomposite as Antimicrobial Materials. *Frontiers in Science*, pp. 7(2):31-35.
- LANGMUIR, D. J. (1979). Techniques of estimating thermodynamic properties of some aqueous complexes of geochemical interest. *American Chemical Society*, pp. p. 353-387.
- LEE, P. C., & MEISEL, D. (1982). Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 3391-3395.

- LI, S.-M., JIA, N., MA, M.-G., ZHANG, Z., LIU, Q.-H., & SUN, R.-C. (2011). Cellulose-silver nanocomposites: Microwave-assisted synthesis, characterization, their thermal stability, and antimicrobial property. *Carbohydrate Polymers*, 441-447.
- LINDAHL, N., ZAMBURLINI, E., FENG, L., GRÖNBECK, H., ESCUDERO-ESCRIBANO, M., STEPHENS, I. E., . . . WICKMAN, B. (2017). High specific and mass activity for the oxygen reduction reaction for thin film catalysts of sputtered Pt₃Y. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*.
- LOURO, H., BORGES, T., & SILVA, M. J. (2013). Nanomateriais manufacturados: novos desafios para a saúde pública. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 188-200.
- LUZ, A., RIBEIRO, S., & PANDOLFELLI, V. (2008). Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. *Cerâmica*(54), pp. 174-183.
- MACIEL, C. d., & CÂNDIDO, H. R. (2010). Infecção Hospitalar: Principais Agentes e Drogas Administradas. *Revista Eletrônica de Ciências*, 33-43.
- MAMANI, J. B. (2009). *Estrutura e Propriedades de Nanopartículas Preparadas via Sol-Gel*. Tese de Doutorado, Uninversidade de São Paulo, Instituto de Física, São Paulo.
- MEHL, H. (2011). *Nanocompósitos formados por nanotubos de carbono, nanopartículas de prata e polianilina: Síntese e Caracterização*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia - PIPE, Curitiba, SP.
- MINISTERIE VAN INFRASTRUCTUUR EN MILIEU. (28 de Fevereiro de 2013). *A commom European approach to the regulatory testing of nanomaterials*. Acesso em 21 de 08 de 2018, disponível em NanoReg: <http://www.nanoreg.eu/>
- MONTANARI, R. M., BARBOSA, L. C., DEMUNER, A. J., SILVA, C. J., ANDRADE, N. J., ISMAEL, F. M., & BARBOSA, M. C. (14 de Agosto de 2012). Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. *Molecules Open Access Journal*, pp. 17(8), 9728-9740.
- MUKERJEE, P., & MYSELS, K. J. (1971). Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems. In: P. MUKERJEE, & K. J. MYSELS.
- MYERS, D. (1991). *Surfaces, Interfaces and Colloids*. New York: Wiley-VHC.

- NCCLS. (2003). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard - Eighth Edition. M2-A8. Wayne, Pennsylvania, United States of America: NCCLS.
- NOGUEIRA, J. M., & MIGUEL, L. d. (2013). Bacteriologia. In: E. M. MOLINARO, L. F. CAPUTO, & M. R. AMENDOEIRA, *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde* (Vol. 3, pp. 221-397).
- NOVO, L. P. (2016). *Novas perspectivas para uma biorrefinaria de cana-de-açúcar no Brasil*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São carlos.
- OLIVEIRA, M. M., CASTRO, E. G., CANESTRARO, C. D., ZANCHET, D., UGARTE, D., ROMAN, L. S., & ZARBIN, A. J. (2006). A simple two-phase route to silver nanoparticles/polyaniline structures. *The Journal of Physical Chemistry B*(110), pp. 17063-17069.
- PARK, J.-W., & SHUMAKER-PARRY, J. S. (2014). Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, p. (136) 1907.
- PATRA, S., PANDREY, A. K., SEN, D., RAMAGIRI, S. V., BELLARE, J. R., MAZUMDER, S., & GOSWAMI, A. (17 de February de 2014). Redox Decomposition of Silver Citrate Complex in Nanoscale Confinement: An Unusual Mechanism of formation and Growth of Silver Nanoparticles. *Langmuir - American Chemical Society*, pp. (30), 2460-2469.
- REISI, R. F., & NEIDERTII, R. (2011). Influência da limpeza prévia por sputtering na nitretação por plasma de aços inoxidáveis. *Revista Matéria*(16), 683-689.
- ROY, E., PATRA, S., SAHA, S., MADHURI, R., & SHARMA, P. K. (2015). Shaped-specific silver nanoparticles prepared by microwave-assisted green synthesis using pomegranate juice for bacterial inactivation and removal. *The Royal Society of Chemistry*, 95433-95442.
- SASTRY, M. (25 de Dezembro de 2003). Phase transfer protocols in nanoparticle synthesis. *Current Science*, 85(12), 1735-1745.
- SILVA, B. E. (2017). *Tratamento a Plasma de Nanofibrilas de Celulose para aplicação em Compósitos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Materiais, Sorocaba.
- SOCRATES, G. (1980). *Infrared Characteristic Group Frequencies*. Uxbridge: John Wiley & Sons.

TURKEVICH, J., STEVENSON, P. L., & HILLIER, J. (1951). A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. Discuss. *Faraday Society*, 55-75.

VALSECHI, O. A. (2006). *Microbiologia dos Alimentos*. Araras, SP: Centro de Ciências Agrárias - UFSCar.

ZODROW, K., BRUNET, L., MAHENDRA, S., LI, D., ZHANG, A., LI, Q., & ALVAREZ, P. J. (2009). Water Research. *Plysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal*, pp. 715-723.