

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

*“Ação Antibacteriana de Nanopartículas de Prata em Poli
(ácido lático) – PLA e a avaliação da Biodegradação”*

Izabel Cristina Gibelli

São Carlos
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

*“Ação Antibacteriana de Nanopartículas de Prata em Poli
(ácido lático) – PLA e estudo da Biodegradação”*

Izabel Cristina Gibelli

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
de São Carlos como parte dos requisitos
para a obtenção do título de mestre em
Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira

Colaborador:

Prof. Dr. José Augusto Marcondes Agnelli

São Carlos
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G445aa Gibelli, Izabel Cristina.
Ação antibacteriana de nanopartículas de prata em Poli
(ácido láctico) : PLA e estudo da biodegradação / Izabel
Cristina Gibelli. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
52 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Nanopartículas de prata. 3. Poli (ácido
láctico). 4. Biofilme. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Izabel Cristina Gibelli

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 29/05/2012

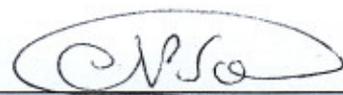
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza (Orientador)
(UFSCar)



Prof. Dr. Josias Rodrigues (UNESP)



Prof. Dr. Cristina Paiva de Souza (UFSCar)

Dedicatória

À mulher que mais admiro e amo incondicionalmente, minha mãe, ***Maria Aparecida Rodrigues Gibelli***, que sempre se esforçou ao máximo para o meu desenvolvimento e formação. Agradeço pelo esforço, dedicação, incentivo, palavras, pensamentos positivos e olhar de fé. Se sou uma grande filha é porque tenho uma grande mãe. Obrigada por tudo, amo muito você.

Ao meu pai ***Thomaz Gibelli*** (in memoriam) dedico mais essa conquista.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza e Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira pela orientação e atenção durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Augusto Marcondes Agnelli por toda colaboração não só para a realização desta pesquisa, mas também pelo meu crescimento profissional. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

A empresa ***Nanox***® Tecnologia S. A., (São Carlos-SP, Brasil) por fornecer, para a realização do presente estudo, as nanopartículas de prata que produzem.

As funcionárias do Laboratório do Departamento de Morfologia e Patologia.

Ao DEMa e Laboratório de Polímeros por disponibilizarem os equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Caracterização Estrutural do DEMa (Departamento de Engenharia de Materiais), da UFSCar, pela ajuda técnica a observação das amostras por meio de microscopia eletrônica de varredura.

A minha amiga Patrícia que sempre esteve ao meu lado dando força e apoio.

As minhas irmãs que me acompanharam até chegar a essa realização.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização não só desta pesquisa, mas de um sonho.

“ Se quiser êxito em seu trabalho, precisa dedicar totalmente sua vida a ele com seriedade. Somente se realiza um trabalho sério dedicando muito amor”

Seicho Tanaguchi

RESUMO

A contaminação biológica causa grande preocupação na indústria de polímeros, cujos materiais são usados para embalagens de alimentos. A maior parte das bactérias se encontra associadas a um biofilme; complexo ecossistema microbiano, bem estruturado; sendo assim, é essencial buscar alternativas que proporcionem a redução do acúmulo de biofilme nas superfícies. Uma das alternativas é o uso de nanomateriais para tal controle. Um exemplo deste material é a nanopartícula de prata. As atividades humanas produzem muito resíduos de difícil decomposição. Impulsionada pela consciência ecológica, as pesquisas e produção com plásticos biodegradáveis ganham espaço. Exemplo de tal plástico é o Poli (ácido láctico) (PLA). O objetivo desta pesquisa foi avaliar a ação antibacteriana, biodegradante e a inibitória na formação dos biofilmes sobre o PLA modificado com nanopartícula de prata nas concentrações de 0,3, 0,5, 1,0 e 1,5 %. Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* para a avaliação da atividade antibacteriana, através da norma japonesa JIS Z 2801:2000. Para a avaliação da inibição do biofilme as amostras foram incubadas com cepas formadoras de biofilme de *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em constante agitação e avaliadas em 1, 3 e 7 dias. Para a observação da degradação natural em solo orgânico as amostras foram enterradas com um sistema de ar e umidade, favorável ao crescimento bacteriano por 328 dias. Os resultados mostraram que a ação antibacteriana da prata foi de aproximadamente 70 % para *E. coli* e uma pequena inibição do biofilme foi observada no terceiro dia para *E. coli* e *P. aeruginosa*. A biodegradação natural do PLA foi estável para a perda de massa e foi observada redução significativa de massa molar. A análise do composto apresentou boa distribuição e má dispersão, que pode ter influenciado na atividade antibacteriana. Novos métodos de processamento para a incorporação das nanopartículas devem ser realizados para melhor dispersão e disponibilidade da prata na superfície do PLA.

Palavras-chave: Nanopartícula de Prata, PLA, Biofilme, Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

The biological contamination causes a great depth of concern in the polymers industry, whose materials are used for food packaging. Most of the bacteria are associated to a biofilm; complex microbial ecosystem, well structured; thus, it is essential to search for alternatives which can provide the reduction of biofilm accumulation on the surface. One of the alternatives is the usage of nanomaterial for such control. One example of such material is the silver nanoparticle. The human activities produce a lot of residue which have hard decomposition. Research and production with biodegradable plastic open space to a new market by being driven to ecological awareness. One example of such plastic is Poli (lactic acid) (PLA). The aim of such research was to evaluate the anti-bacterial, biodegradable and inhibitory action in the shaping of biofilms on the modified PLA with silver nanoparticle in concentrations of 0,3, 0,5, 1,0 and 1,5 %. Standard strain *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were used for the antibacterial activity evaluation, through the Japanese regulation JIS Z 2801:2000. For the biofilm inhibition evaluation, the samples were incubated with biofilm forming strains from *S. aureus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in a constant shaking and evaluated in 1, 3 and 7 days. The samples were buried with a humidity air system for observation of natural degradation in organic soil, in favor of its bacterial growing for 328 days. The results show that the silver antibacterial action was around 70% for *E. coli* and a small inhibition of biofilm was observed on the third day for *E. coli* and *P. aeruginosa*. The PLA natural biodegradation was stable for the mass loss as well as he significantly loss of molar mass. The analysis of the compound presented good distribution and bad dispersion, which could have influenced on the antibacterial activity. New process methods for the nanoparticle incorporation must be carried out for better dispersion and availability of PLA silver surface.

Key words: Silver Nanoparticle, PLA, Biofilm, Antimicrobial Activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	2
2.1 PRATA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO.....	2
2.2 BIOFILME BACTERIANO.....	5
2.3 POLI (ÁCIDO LÁTICO) (PLA).....	6
2.4 BIODEGRADAÇÃO.....	7
3. OBJETIVOS.....	7
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
5.1 PREPARO DO COMPOSTO PLA + NANOPARTÍCULA.....	11
5.2 CONFECÇÕES DOS CORPOS DE PROVA.....	12
5.3 TESTE ANTIMICROBIANO.....	15
5.3.1 MICRORGANISMO.....	15
5.3.2 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA.....	15
5.3.3 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO.....	16
5.3.4 VIABILIDADE CELULAR.....	16
5.3.5 RECUPERAÇÃO DE BACTERÍAS DOS CORPOS DE PROVA.....	17
5.4 MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DO BIOFILME.....	18
5.4.1 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	18
5.4.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS (<i>Montville & Schaffner, 2003</i>).....	18
5.4.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS CÉLULAS VIÁVEIS RECUPERADAS DO BIOFILME BACTERIANO (<i>Miyano et al., 2003</i>).....	19
5.5 BIODEGRADAÇÃO.....	20
5.6 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR VISCOSIMÉTRICO MÉDIO.....	22
5.6.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	23

5.7 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X	24
5.8 MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV).....	25
5.9 ANÁLISE QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE PLA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	26
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1 TESTE ANTIMICROBIANO (<i>Norma JIS Z 2801:2000</i>).....	28
6.2 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS CÉLULAS VIÁVEIS RECUPERADAS DO BIOFILME BACTERIANO.....	29
6.3 BIODEGRADAÇÃO NATURAL EM SOLO ORGÂNICO.....	31
6.4 MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA.....	32
6.5 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X.....	34
6.6 VISUALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS AMOSTRAS DE PLA SEM NANOPARTÍCULA DE PRATA ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	35
6.7 ANÁLISE QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE PLA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	37
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÕES.....	41
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
10. APÊNDICE.....	47

1. INTRODUÇÃO

A nova fronteira científica, a nanotecnologia, que é a construção de estruturas e materiais em escala nanométrica, em medidas equivalentes a um milímetro dividido por um milhão de vezes, tem permitido a fabricação de produtos com características diferenciadas porque modifica as propriedades dos materiais no nível atômico. Nanotecnologia refere-se a qualquer material, dispositivo ou processo cuja principal propriedade derive da nanoescala, que compreende tamanhos de 0,1 a 100 nanômetros (nm) (*Gong et al. 2007*). Nanotecnologia tem atraído o interesse de grupos de pesquisa, devido a sua aplicação nos mais variados setores industriais e a contribuição que seus resultados podem dar ao desenvolvimento tecnológico e econômico. Neste contexto, existe uma infinidade de áreas onde a nanotecnologia pode oferecer uma contribuição significativa, algumas das quais, inclusive, já possuem produtos sendo comercializados (*Duran et al., 2006*).

Diferentes tipos de nanomateriais como cobre, zinco, titânio, magnésio, ouro e prata têm surgido, mas nanopartículas de prata provaram ser mais eficazes, uma vez que tem uma boa atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, protozoários e alguns tipos de vírus (*Rai et al., 2009*).

Segundo *Li et al. (2008)* o TiO_2 , ZnO e fulereno reagem com as células através de mecanismos de produção fotocatalítica de espécies reativas de oxigênio, a quitosana, nanotubos de carbono, ZnO e nanopartículas de prata causam danos à membrana celular bacteriana e ao transporte de elétrons e a quitosana e nanopartículas de prata inibem a síntese de DNA bacteriano (*De Muynck et al., 2009; Allaker, 2010*). Estudos mostraram também que as nanopartículas de prata não são tóxicas às células humanas, (*Sayes et al. (2004), Sondi & Salopek-Sondi (2004), Reddy et al. (2007), Yudovin-Farber et al. (2008) e Panacek et al. (2009)*). Estes mecanismos de ação são apresentados na Figura 1.

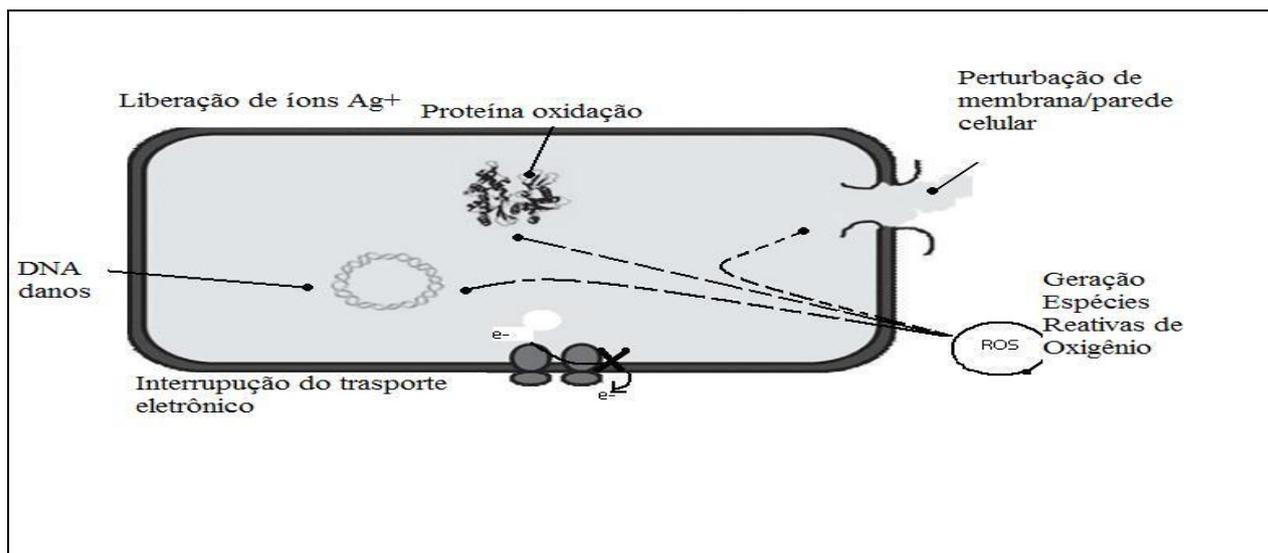


Figura 1. Esquema ilustrativo de uma forma bacteriana e os mecanismos de atividade antimicrobiana exercida pelos nanomateriais (Li et al., 2008).

As nanopartículas podem interagir diretamente com as células microbianas, por exemplo, interrompendo a transferência eletrônica transmembrana, perturbação de membrana ou parede celular, ou componente celular oxidante, ou produzir produtos secundários (por exemplo, espécies reativa de oxigênio (ROS), causando danos (Li et al., 2008).

Superfícies antimicrobianas para impedir o crescimento de microrganismos é um objetivo muito desejado. Aderência microbiana às superfícies seguidas de crescimento celular resulta na colonização e formação de uma matriz de biofilme compacto capaz de proteger os microrganismos de antibióticos (Costerton et al., 1999). A aderência microbiana na superfície de dispositivos biomédicos como cateteres, próteses, implantes, pode resultar em infecções graves e falha do dispositivo (Barth et al., 1989).

O crescimento populacional e econômico leva a um aumento na produção de lixo. Dados estatísticos mostram que, no Brasil, são despejados de 240 a 300 mil toneladas diárias de resíduos urbanos no meio ambiente, dos quais, cerca de 19% são plásticos. A produção anual de plásticos no Brasil é de aproximadamente 6 milhões de toneladas, dos quais 48% destinam-se à indústria de embalagens (ABIPLAST, 2010). Para contornar esses problemas, os polímeros biodegradáveis vêm se destacando cada vez mais. Busca-se um material com durabilidade em uso e degradabilidade após o descarte. Estes materiais se constituem em compostos que devido à ação de micro-organismos (fungos e bactérias) serão degradados a compostos de baixa massa molar (Karlsson et al., 1998). Outra característica importante refere-se ao fato de alguns polímeros biodegradáveis serem provenientes de fontes renováveis e possuem aplicações no setor de embalagens e setor agrícola (Chandra et al., 1998).

A preocupação da indústria de alimentos com a contaminação biológica e embalagens que promovam uma maior durabilidade do alimento e que não seja poluente, é um grande objetivo.

Para prolongar a vida de prateleira os alimentos necessitam de embalagens apropriadas para manter a qualidade e frescor durante o transporte e armazenamento (*Simon et al., 2008*). Segundo *Kreyenschmidt et al. (2010)*, a qualidade, segurança e o tempo de prateleira de alimentos perecíveis sofrem influencia principalmente pelas condições ambientais durante a produção, processamento, transporte e armazenamento. A contaminação cruzada através de superfícies ou do ar é um aspecto chave para a propagação de bactérias. Agentes antimicrobianos podem fornecer um benefício adicional não só pela melhoria das condições de higiene durante o processamento, mas também enquanto o alimento está armazenado; podendo reduzir o crescimento de microrganismos prolongando assim a vida de prateleira e melhorando a segurança alimentar.

Esses dados mostram a importância de uma embalagem incorporada com nanopartícula de prata, tendo como aplicação para embalagens de alimentos promovendo uma maior durabilidade e ao ser descartado é degradado, contribuindo para um controle ecológico.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. PRATA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

A prata tem sido usada durante séculos para o tratamento de queimaduras e feridas crônicas (Rai et al., 2009; Castellano et al., 2007). Em 1700, o nitrato de prata foi utilizado para o tratamento de doenças venéreas, fístulas das glândulas salivares, e óssea e abscessos perianais (Klasen, 2000; Landsdown, 2002). O nitrato de prata foi usado em diferentes concentrações para tratar queimaduras (Castellano et al. 2007; Klasen, 2000), não interfere na proliferação epidérmica e possui propriedades antibacterianas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Rai et al., 2009; Bellinger & Conway, 1970). Na década de 1940, após penicilina foi introduzida a utilização de prata para o tratamento de infecções bacterianas (Rai et al., 2009).

Devido ao aparecimento de bactérias resistentes e limitações ao uso de antibióticos os médicos voltaram à prata, fazendo curativos de feridas contendo diferentes níveis de prata (Gemmell et al., 2006).

A propriedade antimicrobiana da prata está relacionada à quantidade e a taxa de prata liberados. A Prata em seu estado metálico é inerte, mas ela reage com a umidade da pele e do fluido da ferida ficando ionizada e altamente reativa, uma vez que se liga a proteínas dos tecidos e traz mudanças estruturais na parede da célula bacteriana e membrana nuclear provocando uma distorção celular e morte. A prata também se liga ao DNA e RNA bacteriano por desnaturação e inibe a replicação bacteriana (Lansdown, 2002; Castellano et al., 2007). Íons de prata interagem com grupos tióis em proteínas, resultando em inativação de enzimas respiratórias e levando à produção de espécies reativa de oxigênio (Matsumura et al., 2003).

Vários mecanismos têm sido indicados para a propriedade antimicrobiana da nanopartículas de prata; como aderência de nanopartículas para modificar a propriedade da superfície de membrana. Foi notificado que partículas de prata degradam moléculas de lipopolissacarídeo, acumulam no interior da membrana formando "covas", e causam aumento na permeabilidade das membranas (Sondi & Salopek-Sondi, 2004), e ainda partículas de prata penetram no interior das células bacterianas, resultando em danos no DNA (Morones et al., 2005). Propriedades físico-químicas desempenham um papel importante na atividade

antimicrobiana da prata. Em geral, as partículas de menos de 10 nanômetros são mais tóxicas para bactérias como a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gogoi et al., 2006).

2.2. BIOFILME BACTERIANO

É a associação de microrganismos e de seus produtos extracelulares, que se encontram aderidos a superfícies bióticas ou abióticas (Sutherland, 2001).

Com a adesão bacteriana à superfície inicia um processo de varias etapas para a formação do biofilme o que depois de formado é de difícil tratamento, pois as bactérias no interior do biofilme são protegidas da fagocitose e da ação de antibióticos. (Costerton et al.,1999). O biofilme é um complexo ecossistema microbiano, bem estruturado, altamente dinâmico, que facilita a obtenção de nutrientes e a manutenção de um ambiente com condições físicas e químicas apropriadas (Caixeta, 2008), permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (Kasnowski et al.,2010).

Os estágios da formação de um biofilme são representados na Figura 2.

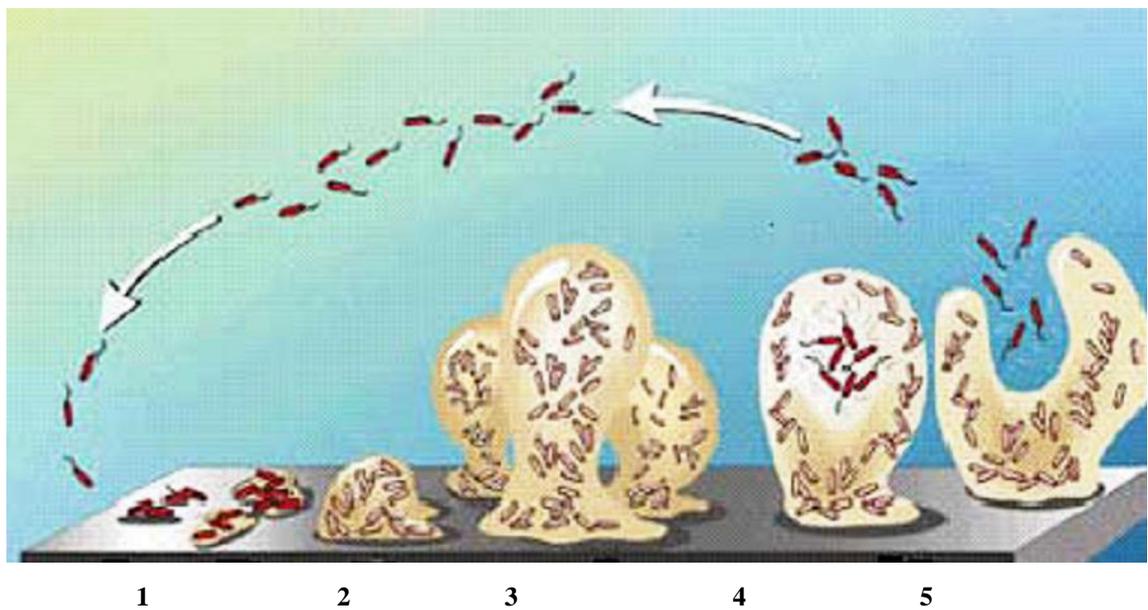


Figura 2. Ciclo de desenvolvimento de um biofilme, que pode ser dividido em cinco estágios: 1) adesão; 2) colonização; 3) acumulação; 4) comunidade clímax; 5) dispersão (Figura adaptada de Caixeta, 2008).

O biofilme causa grande preocupação à indústria de alimentos por sua potencialidade em resistir a tratamentos antimicrobianos e à sanitizantes, além de causar deterioração, perda da qualidade ou veiculação de patógenos (Kasnowski et al.,2010). Assim, há um interesse

significativo no desenvolvimento de materiais e superfícies antimicrobianas que proporcionem a redução do acúmulo de biofilme (*Samuel & Guggenbichler, 2004*).

2.3. POLI (ÁCIDO LÁTICO) (PLA)

O ácido láctico, constituinte básico do PLA, pode ser manufaturado tanto através da fermentação de carboidratos quanto por síntese química. Portanto, o PLA é um poliéster alifático, obtido por polimerização do ácido láctico. Possui alta resistência, alto módulo elástico, pode ser obtido de fontes renováveis e utilizado para produção de embalagens ou mesmo artigos biocompatíveis e bioabsorvíveis (*Garlotta, 2002*).

O ácido láctico, ou 2-hidroxi ácido propionico, é o hidroxi ácido mais simples. Possui um grupo metil no carbono α , formando uma molécula quiral, com possibilidade de existência dos isômeros ópticos: L, D e DL (*Garlotta, 2002; Gupta & Kumar, 2007*). A Figura 3 ilustra a estrutura isomérica do ácido láctico D e L.

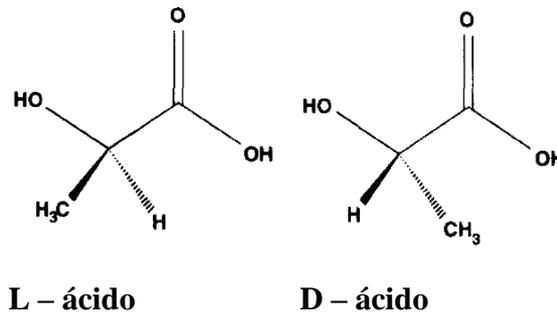


Figura 3. Estruturas isoméricas do ácido láctico.

A maioria da produção mundial de PLA é feita pela fermentação bacteriana de carboidratos através do microrganismo do gênero *Lactobacilli*, que formam exclusivamente o ácido láctico. Estas bactérias são classificadas como homofermentativas, que produzem o ácido láctico através da glicólise pela rota de Embden-Meyerhof e convertem 1.8 mols de ácido láctico por mol de hexose. A principal fonte de ácido láctico está na hexose, molécula com seis átomos de carbono que constitui um dos mais importantes grupos de monossacarídeos (*Garlotta, 2002*).

A fonte de ácido láctico pode ser encontrada na maioria dos açúcares obtidos na agricultura. Estes açúcares incluem: glicose, maltose e dextrose de amido de milho ou batata; sucrose da cana-de-açúcar ou beterraba; lactose do soro de leite (*Garlotta, 2002*).

2.4. BIODEGRADAÇÃO

O principal mecanismo de degradação de PLA é através da hidrólise, nas ligações éster, catalisada pela temperatura, seguido por ataque bacteriano (*Rudnik & Briassoulis, 2011*).

Quando o peso molecular do polímero atinge a faixa de 10.000 g/mol, os micro-organismos presentes no solo começam a digerir os oligômeros de menor peso molecular, produzindo dióxido de carbono e água (*Lunt, 1998*).

A rota mais indicada para a biodegradação é a compostagem, um ambiente de alta umidade e temperaturas na faixa de 50 a 70°C (*Lunt, 1998*).

3. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram avaliar;

- A ação antibacteriana das nanopartículas de prata incorporadas em PLA
- A redução do número de células bacterianas aderidas à superfície do polímero (inibição do Biofilme Microbiano).
- A biodegradação natural em solo orgânico do polímero em diferentes intervalos de tempo.
- A dispersão e distribuição das nanopartículas na superfície das amostras.

4. Revisão de Literatura

Sondi & Salopek-Sondi (2004) fizeram um estudo modelo para *Escherichia coli* onde observaram através de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão a ação da nanopartícula de prata. Os resultados mostraram que as células bacterianas foram danificadas, devido as nanopartículas acumularam-se na membrana externa bacteriana promovendo a formação de lesões na parede celular e levando ao aumento significativo na permeabilidade, resultando em morte celular.

Jain & Pradeep (2005) revestiram espuma de poliuretano com nanopartículas de prata, que pode ser usado como filtro de água potável onde a contaminação bacteriana da água é um risco para a saúde, e observaram que a contagem final para *Escherichia coli* foi nula partindo de uma população inicial de 10^5 unidades formadoras de colônia por mL. Combinado com o baixo custo e a eficácia em suas aplicações, a tecnologia pode ter grandes implicações para os países em desenvolvimento.

Pal et al. (2007) investigaram as propriedades antibacterianas em diferentes formas de nanopartícula de prata contra *Escherichia coli*. A nanopartícula na forma triangular exibiu a ação biocida mais forte, em comparação com nanopartículas esféricas e em forma de bastonete. Propõe-se que o tamanho em nanoescala e a presença de uma liga plana combinam para promover esta propriedade biocida.

Kim et al. (2007) viram que, em concentrações baixas de nanopartícula de prata suplementada em sistema líquido em placas de ágar Muller Hinton, ocorreu a inibição de *Escherichia coli* e leveduras, enquanto que os efeitos inibitórios sobre *Staphylococcus aureus* foram leves.

Jung et al. (2008) estudaram o efeito antibacteriano de íons de prata, gerado eletricamente, para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As bactérias foram expostas á solução de íons de prata por diferentes períodos de tempo e através do método convencional de contagem em placas e por citometria de fluxo, observaram a ação antibacteriana. Microscopia eletrônica mostrou mudanças consideráveis nas membranas celulares das bactérias após o tratamento com íons de prata, que pode ser a causa da morte celular.

Simon et al. (2008) mostraram que materiais para embalagens contendo nanopartícula de prata inibiram o crescimento bacteriano, retardando os processos de deterioração de alimentos perecíveis.

Dukalska et al. (2008) realizaram teste com filmes de PLA(0,04mm de espessura) para recobrir pão de centeio e filmes de PHB (0,05mm de espessura) para recobrir salada de carne e maionese (carne cozida, batata, ovos, pepinos em conserva, sal e maionese). Os resultados mostram através do controle de umidade, (massa final menos a massa inicial), que a vida de prateleira para o pão de centeio embalados em filme de PLA é de uma semana, quando a perda de umidade ainda é insignificante. O crescimento de microrganismos na salada demonstrou que o armazenamento não pode ser maior do que dez semanas.

Travan et al. (2009) mostraram ação bactericida de nanocompósitos de prata para Gram-positivos e negativos; no entanto não mostra efeito citotóxico para três diferentes linhagens de células eucariótica, pois as nanopartículas, imobilizadas na matriz de gel, podem exercer a sua atividade pelo simples contato com a membrana bacteriana, não podendo ser captado e internalizado pelas células eucarióticas. O resultado desta publicação pode contribuir para responder às crescentes preocupações sobre a toxicidade das nanopartículas.

Egger et al. (2009) compararam a atividade antimicrobiana da prata-sílica com a atividade de nitrato de prata em poliestireno. A atividade antimicrobiana foi avaliada de acordo com a norma japonesa (JIS Z 2801:2000). Os resultados demonstram que a prata sílica teve uma atividade antibacteriana significativa contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, uma redução de 4,4 e 2,1 log respectivamente.

Kreyenschmidt et al. (2010) investigaram a ação de nanopartícula de prata revestida no interior de geladeiras (polipropileno) e através da metodologia japonesa JIS Z 2801 (2000) observaram uma redução bacteriana na superfície do material testado. Através dos experimentos de armazenamento de alimentos ficou evidente que esse material revestido proporcionou uma melhor qualidade dos produtos armazenados e somente aos alimentos a base de amido houve uma baixa eficácia.

Shameli et al. (2010) investigaram a características antibacterianas de filme, (1,5cm x 1,5cm com 3,0mg em peso) de Poli(ácido láctico) ,PLA, contendo nanopartículas de prata. A atividade antibacteriana do teste in vitro foi avaliada através do método de difusão em disco com Muller-Hinton e a zona de inibição foi determinada em milímetros. O Estudo demonstrou ser eficaz contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*. Os resultados indicaram que o filme possuiu uma forte atividade antimicrobiana com o aumento na porcentagem de nanopartícula de prata no PLA. Assim, filmes podem ser usados para engenharia de tecidos e aplicações médicas.

Shawaphun & Manangan (2010) revestiram, através da técnica de dip-coating, papel com PLA e PHB para embalagens de alimentos. Observaram que os papéis revestidos

apresentaram melhor barreira contra ar, água e óleo do que o papel não revestido, sendo PHB mais resistente a água e PLA ao óleo.

Liu et al. (2010) estudaram três diferentes tamanhos de nanopartícula de prata e observaram que a atividade antibacteriana foi melhor para *Escherichia coli*, começou com uma concentração eficaz de 0,1-1ppm, enquanto que *Staphylococcus aureus* começou com maiores concentrações de 1-10ppm. Concluíram que nanocompositos com 60ppm e 5nm teve a maior atividade antibacteriana, a boa exposição da partícula causou a inibição do crescimento de *Escherichia coli*.

Fortunati et al. (2011) produziram filmes poli biodegradável (DL-ácido láctico-co-glicólico) copolímero (PLGA) e diferentes concentrações de nanopartículas de prata (Ag) por vazamento de solvente. *In vitro* os estudos da degradação do PLGA / Ag foram conduzidos sob condições fisiológicas, durante um período de cinco semanas, e em comparação com o comportamento do polímero puro. Os resultados mostram que o filme PLGA pode ser modificado introduzindo-se uma pequena porcentagem de nanopartículas de prata que não afeta o mecanismo de degradação do polímero, assim há uma perspectiva para o uso de nanomateriais para a obtenção de superfícies antimicrobianas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados para esta pesquisa os seguintes materiais:

- **PLA 2002D** foi fornecido por NatureWorks, representada no Brasil pela Cargill, a especificação do PLA encontra-se na Tabela 1 no Apêndice 1.

- **Nanopartículas de prata** foram fornecidas pela empresa Nanox® Tecnologia S. A., (São Carlos – SP, Brasil). As características básicas destas partículas são indicadas no Apêndice 2.

- **Microrganismos:** *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*; (para a avaliação da ação antibacteriana e avaliação da redução do biofilme), *Pseudomonas aeruginosa*; (avaliação da redução do biofilme).

Os compostos de PLA com nanopartículas de prata e os corpos de prova para a avaliação antibacteriana, inibição do biofilme e biodegradação foram confeccionados no Laboratório de Polímeros, do Departamento de Engenharia de Materiais - Universidade Federal de São Carlos (DEMa - UFSCar), utilizando-se as normas ASTM D6003 e ASTM G160.

Os estudos para a atividade antimicrobiana e biofilme foram realizados no Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar.

5.1 PREPARO DO COMPOSTO PLA + NANOPARTÍCULA

O composto foi confeccionado em quatro concentrações de nanopartícula de prata: 0,3%, 0,5%, 1% e 1,5% seguindo o fluxograma abaixo.

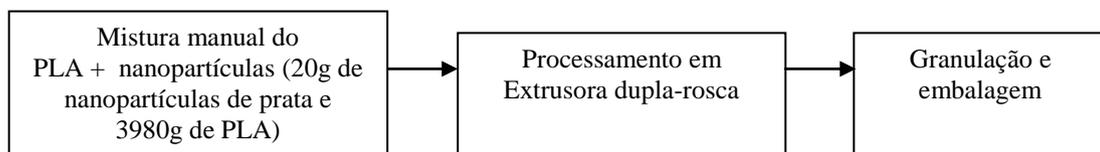


Figura 4. Fluxograma de preparação da composição de PLA com nanopartícula de prata.

Após a mistura manual do PLA com as nanopartículas foi feito o processamento em extrusora dupla-rosca (Figura 5) para misturar e fundir o material.



Figura 5. Extrusora IMACOM modelo DRC 30:40, dupla rosca, utilizada para a preparação do composto.

Maiores informações sobre as condições do processamento por extrusão estão apresentadas no Quadro 1 e 2 no Apêndice 3.

5.2 CONFECÇÕES DOS CORPOS DE PROVA

Após a extrusão os materiais foram moldados em injetora industrial (Figura 6) na forma quadrada (Figura 7A) para o teste antimicrobiano (placas de 6,0cm x 6,0cm x 3,2mm), cilíndrica (Figura 7B) para o estudo do biofilme e retangular (12,0cm x 1,0 cm x 2,0mm – Figura 7C) para os corpos de prova para a biodegradação no solo, obtendo assim 5 tipos de corpos de prova: PLA puro, 0,3%, 0,5% , 1% e 1,5% de nanopartículas de prata. Só foi possível a injeção de 10 corpos de prova na forma retangular, (para biodegradação), na concentração de 1,5% de nanopartícula de prata, por isso não foi confeccionado nessa

concentração os corpos de prova para os demais testes. O perfil de temperatura para o processo de injeção encontra-se nos Quadros 3 e 4 no Apêndice 4.



Figura 6. A: Injetora: ROMI® Prática 130 utilizada para a confecção dos corpos de prova. B: PLA com nanopartícula de prata sendo injetado.

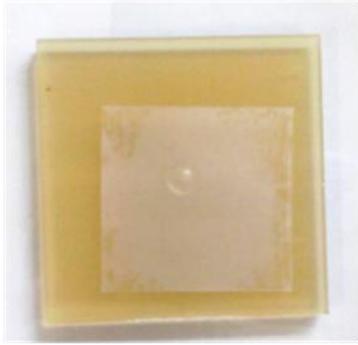


Figura 7A. Ilustração do corpo de prova para teste antimicrobiano (placa)



7B. Ilustração do corpo de prova para biofilme (cilíndrica)



7C. Ilustração do corpo de prova para biodegradação (retangular)

O molde retangular da injetora apresenta 3,2mm e foi adaptado com uma “régua” de aço (Figura 8) para ficar com uma espessura de 2,0mm, facilitando a degradação comparada com um de espessura maior.



Figura 8. Molde da Injetora com a “régua” para confecção dos corpos de prova retangulares.

5.3 TESTE ANTIMICROBIANO (Norma JIS Z 2801:2000)

As amostras foram testadas com base na norma Japonesa JIS Z 2801:2000 que foi desenvolvida para testar a atividade antibacteriana de materiais sólidos incorporados com agentes antimicrobianos, para inibir o crescimento de microrganismos ou matá-los, ao longo de um período de 24 horas de contato (Figura 9). Foram realizados dois experimentos independentes para cada microrganismo testado.

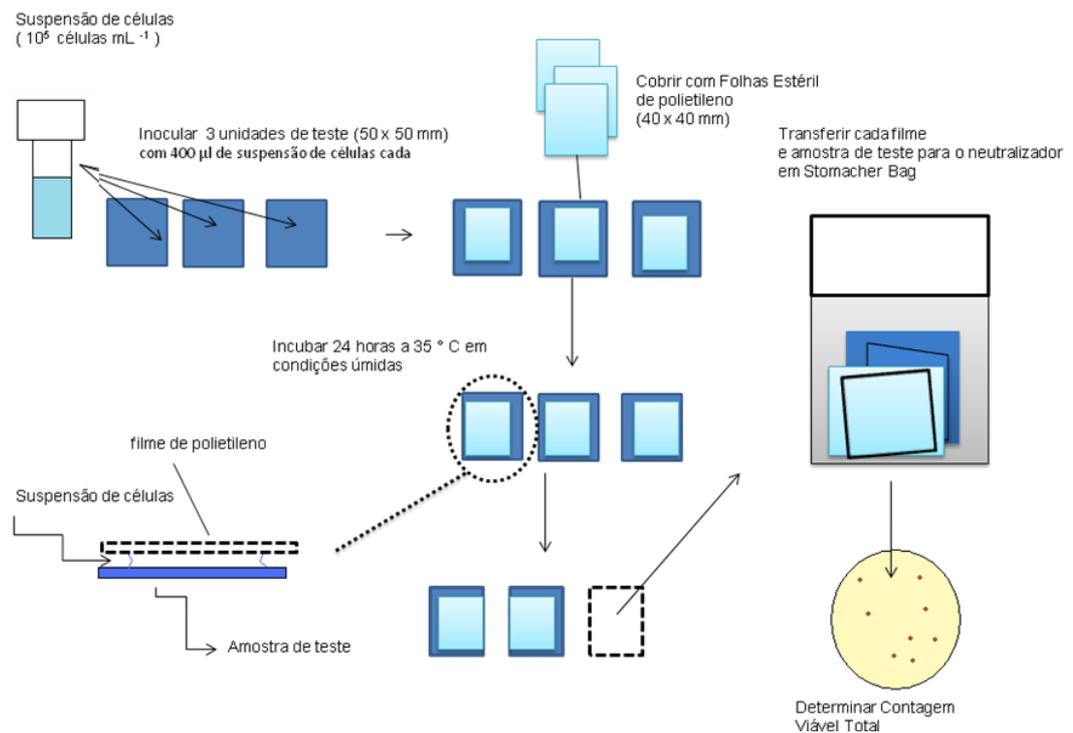


Figura 9. Representação esquemática da norma técnica (JIS Z 2801:2000)

5.3.1 MICRORGANISMOS

Seguindo a norma técnica Japonesa, as cepas bacterianas submetidas ao experimento foram: *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

5.3.2 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA

Antes da análise bacteriológica os corpos de prova, PLA e PLA com prata, foram lavados com detergente neutro e deixados em água corrente por 10 minutos, foram passados por três vezes em água destilada, e ficaram imerso em álcool 70% por 15 minutos. Decorrido os

15 minutos, os corpos de prova foram expostos a luz UV dentro do fluxo laminar por 15 minutos cada lado. Após a descontaminação foram colocados dentro de Placas de Petri esterilizadas e identificados de acordo com suas concentrações de Prata. O filme de polietileno foi esterilizado em autoclave (121°C, 1 atm), por 15 minutos, dentro de placa de Petri de vidro.

5.3.3 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO

Partindo de uma cultura bacteriana foi transferida uma pequena quantidade, com alça de inoculação estéril, para um tubo contendo TSB (Tryptic Soy Broth) e incubado a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação a suspensão bacteriana foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm (centrífuga Excelsa II, modelo 206-BL, FANEM), foi descartado o sobrenadante e a biomassa obtida foi ressuspensa em 9,0mL de PBS (solução salina tamponada fosfatada). A turvação da suspensão bacteriana foi acertada a escala de 0,5 de Mc Farland, estimada em 10^8 UFC/mL. A partir desta suspensão foi realizada diluição seriada para obter o inóculo em com aproximadamente 10^5 UFC/mL.

Para os ensaios foram utilizados três corpos de prova de cada concentração de prata e seis corpos de prova do material sem prata (controle). Metade dos corpos de prova controle foram usados para medir as células viáveis imediatamente após a inoculação, chamado de T_0 , este é considerado como a população inicial em todas as amostras, e metade são usados para medir as células viáveis após incubação de 24 horas, chamado de T_{24} .

5.3.4 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade do inóculo foi determinada pelo método de *Pour Plate*, com o plaqueamento em duplicata, em PCA (Plate Count Agar), nos volumes de 1,0mL e 0,1mL da diluição decimal de 10^{-2} e incubadas a 37°C por 48 horas. A contagem após incubação só foi feita nas placas que apresentaram 30-300 unidades formadoras de colônia (UFC) e multiplicada pelo fator da diluição, para se obter o valor de UFC presente no inóculo.

Partindo do inóculo de aproximadamente 10^5 UFC/mL, 400 μ L foram inoculados sobre a superfície de teste e coberto com filme de polietileno estéril de 4,0cm x 4,0cm e pressionado suavemente para o inóculo se distribuía de forma uniforme por toda a área e certificando-se que o inóculo de teste não transborde além das bordas do filme. Posteriormente, a tampa da placa de Petri foi recolocada. (ver Figura 10), as placas de Petri contendo os corpos de prova

inoculados, foram incubadas a 37°C e umidade relativa de pelo menos 90%, para evitar a dessecação, por 24 horas.

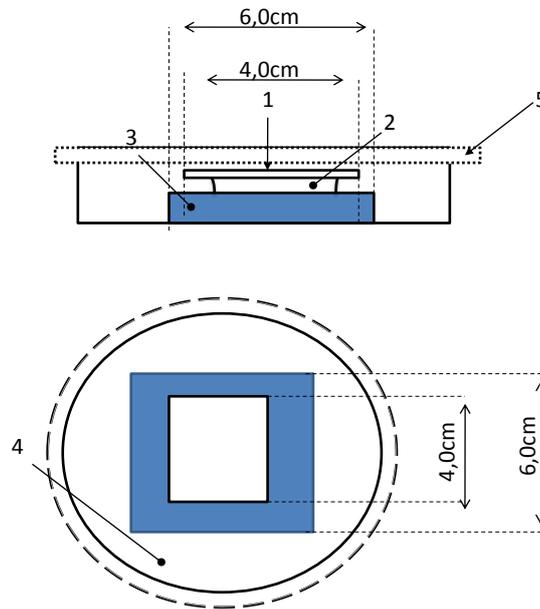


Figura 10. Ilustração da inoculação da amostra teste e colocação da película de cobertura

Dimensões em centímetros

- 1- Uma folha de cobertura
- 2- Inóculo de teste (400µL)
- 3- Corpo de prova
- 4- Placa de Petri
- 5- Tampa da placa de Petri

5.3.5 RECUPERAÇÃO DE BACTERÉRIAS DOS CORPOS DE PROVA

Imediatamente após a inoculação, com uma pinça estéril o T₀ foi transferido individualmente para um saco plástico estéril e adicionado 10 mL de caldo SCDLP (Apêndice 7) e homogeneizado manualmente por 1 minuto. Com uma pipeta graduada estéril o caldo foi coletado e solto por quatro vezes para garantir a lavagem completa da amostra. A partir do lavado pipetou-se 1mL e transferiu-se para um tubo contendo 9,0mL de PBS fazendo diluição seriada até 10⁻⁴. Em diferentes placas de Petri foi colocado 1,0mL de cada diluição e em seguida despejado 15mL de PCA (Plate Count Agar) a 45-50°C, homogeneizadas

delicadamente para dispersar as bactérias. Após esfriamento do ágar as placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 48 horas.

Passado o período de incubação as placas que apresentaram entre 30 a 300 colônias, foram contadas e multiplicadas pelo fator da diluição, obtendo o valor de UFC.

O processo para a recuperação das bactérias dos corpos de prova após a incubação de 24 h ocorreu igualmente ao T₀.

5.4 MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DO BIOFILME

5.4.1 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os corpos de prova foram pesados individualmente e lavados com detergente neutro e enxaguados com água destilada. Em seguida, ficaram imersos em álcool 70% durante 15 minutos, foram secos e expostos em luz UV dentro do fluxo laminar, por 15 minutos.

5.4.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS (*Montville & Schaffner, 2003*)

As cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), foram utilizadas por serem produtoras de biofilme. Estavam conservadas em caldo nutriente e armazenadas em freezer, sendo reativadas separadamente inoculando-as em 10 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas.

Após 24 horas de incubação a cultura foi centrifugada a 3000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa obtida foi ressuspensa em 3,0mL de salina. A turvação da suspensão bacteriana foi acertada na escala 0,5 Mac Farland, estimada em 10⁸ UFC/mL.

Da suspensão bacteriana da ordem de 10⁸ UFC/mL, uma alíquota de 0,2mL de cada suspensão bacteriana foi transferida individualmente para tubos cônicos de poliestireno, esterilizados, contendo 10mL de caldo BHI e um corpo de prova foi introduzido assepticamente em cada tubo com o inóculo bacteriano. Os tubos foram incubados a 37°C sob

agitação constante de 100rpm por três períodos de incubação (1, 3 e 7 dias). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Após cada período de incubação, o meio de cultura foi descartado e o corpo de prova foi lavado com solução salina esterilizada.

5.4.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS CÉLULAS VIÁVEIS RECUPERADAS DO BIOFILME BACTERIANO (*Miyano et al., 2003*)

Após os tempos de incubação designados para a formação e desenvolvimento do biofilme, foram realizados os procedimentos de lavagem dos corpos de prova, desagregação do biofilme e sua avaliação quantitativa através da contagem de UFC. Para cada tempo foram realizados os mesmos procedimentos.

Para a lavagem dos materiais, após passado o tempo de incubação desejado, foi descartado o meio (conteúdo de 10 mL) de cada tubo, e adicionado salina estéril, e lavados três vezes. Em seguida os corpos de prova foram transferidos individualmente, com ajuda de uma pinça estéril, para novos tubos de vidro contendo salina esterilizada. Estes tubos foram colocados imersos em água dentro de uma cuba ultrassônica (Figura 11), para a desagregação do biofilme aderido ao polímero por 8 minutos (*Digital Ultrasonic Cleaner*, produzida pela Kondortech, com força de limpeza de 160 W).



Figura 11. Cuba de ultrassom (Digital Ultrasonic Cleaner) usada para provocar a desagregação do biofilme bacteriano aderido aos corpos de prova.

Para a contagem das células recuperadas, foram enumerados cinco tubos e em cada tubo distribuídos 9,0mL de salina. Partindo do tubo inicial, que continha a suspensão bacteriana recuperada por lavagem ultrassônica do biofilme, foi feita diluição de base 10 até 10^{-5} .

A seguir, uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi colocada dentro da placa de Petri em seguida despejado 15mL de PCA, homogeneizadas delicadamente para dispersar as bactérias e foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. As colônias crescidas foram contadas, entre 30 e 300, multiplicadas pelo valor da diluição e o número total de colônias expresso em UFC/mL.

5.5 BIODEGRADAÇÃO

Seguindo as normas ASTM D6003 e ASTM G160 foi realizado o estudo da biodegradação natural em solo, onde a biodegradabilidade foi avaliada comparando a massa inicial com a massa final e os aspectos físicos dos corpos de prova.

Primeiramente as amostras retangulares foram pesadas individualmente e seus valores da massa inicial foram anotados. Após a pesagem os corpos de prova foram pendurados em uma madeira e suspensos em um aquário de vidro com um sistema de passagem de água e ar para favorecer o desenvolvimento dos microrganismos.

Foram suspensos 5 corpos de prova para cada composição: PLA sem prata, PLA 0,3%, PLA 0,5% , PLA 1% e PLA1,5%, como mostra a Figura 12.

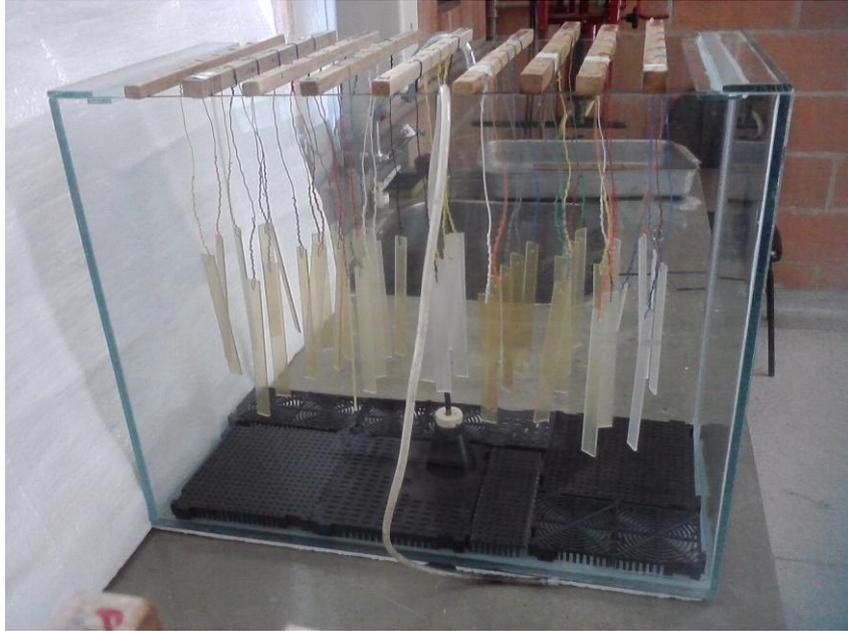


Figura 12. Instalação para a biodegradação contendo os corpos de prova e sistema de passagem de água e ar.

Após a suspensão do material no aquário, foi adicionado o solo orgânico umificado à base de esterco de aves e materiais orgânicos de origem vegetal (especificações no Apêndice 5) até todos os corpos de prova ficarem completamente cobertos, como pode ser observado na Figura 13, e só foram retirados de acordo com seu período (Quadro5), para avaliação da perda de massa.



Figura 13. Corpos de prova enterrados no solo.

Biodegradação		
Amostras	Início	Retirada após
PLA	5/4/2011	60 dias
0.3%		90 dias
0,5%		120 dias
1%		150 dias
1,5%		180 dias
		328 dias

Quadro 5. Período de retirada para os corpos de prova enterrados em solo.

Para cada período de retirada foi removido os 5 corpos de prova do material puro (PLA sem nanopartícula) e de cada concentração, somente a concentração de 1,5% a retirada foi feita em 90 e 180 dias.

Após cada período os corpos de prova foram retirados do solo, lavados em água corrente e secos em estufa de secagem e esterilização TECNAL TE-393/2 por 24 horas a 60°C. Passado o período de secagem, os materiais foram pesados e a massa final foi anotada, comparando assim com a massa inicial.

Para complementar este trabalho foi realizado a avaliação da viscosidade intrínseca do polímero, Fluorescência de Raios X e Microscopia Eletrônica de Varredura.

5.6 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR VISCOSIMÉTRICO MÉDIO (OU MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA) EMPREGANDO O MÉTODO DAS VISCOSIDADES DE SOLUÇÕES DILUÍDAS

A influência da biodegradação no peso molecular do polímero (PLA) pode ser avaliada através do método de viscosidade de soluções. A viscosidade é uma medida do tamanho ou extensão no espaço das moléculas poliméricas. Soluções viscosas são produzidas por

polímeros em solventes, devido ao enrolamento aleatório das cadeias poliméricas em solução. O enrolamento é em virtude das forças de interação polímero / solvente (*Nascimento, 2010*).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Polímeros, do Departamento de Engenharia de Materiais - Universidade Federal de São Carlos (DEMa - UFSCar).

5.6.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Viscosímetro: Ubbelohde, tipo 1C, com constante do viscosímetro igual a 0,003 cSt/s, ASTM D446, operando no interior do Banho Térmico Químico, como apresentado na Figura 14.



Figura 14. Viscosímetro e Banho Térmico empregados no experimento de Viscosidade de Soluções Diluídas

Parâmetros da Equação de Mark-Houwink (Polymer Data Handbook, Oxford University Press, Inc., 1999, p. 629):

Polímeros : PLA matéria-prima de partida (polímero padrão); PLA enterrado em solo no tempo 328 dias; PLA contendo 0,3% de nanopartículas e enterrado em solo no tempo 328 dias; PLA contendo 0,5% de nanopartículas e enterrado em solo no tempo 328 dias; PLA contendo 1,0% de nanopartículas e enterrado em solo no tempo 328 dias.

solvente: clorofórmio

temperatura: 30°C

parâmetros: $K = 5,45 \cdot 10^{-4}$ dL/g e $a = 0,73$

As medidas dos diferentes tipos de Viscosidades de Soluções foram realizadas por comparação do **Tempo de Escoamento t**, tempo requerido para que um volume determinado de uma solução do polímero em um solvente previamente escolhido passe através de um tubo capilar, e do **Tempo de Escoamento t₀**, tempo de escoamento do solvente nas mesmas condições experimentais. A partir de **t** e **t₀**, determinados para 4 concentrações de soluções (0,05 g/dL; 0,10 g/dL; 0,25 g/dL; 0,50 g/dL), foram obtidas as várias viscosidades, aplicando-se as equações que estão listadas a seguir:

1. **Viscosidade Relativa** (adimensional): $\eta_r = \frac{t}{t_0} = \frac{\eta_{\text{solução}}}{\eta_{\text{solvente}}}$ sendo

t₀ : tempo de escoamento do solvente puro

t : tempo de escoamento da solução polimérica com concentração (C); C em g/dL

2. **Viscosidade específica** (adimensional): $\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \frac{(t-t_0)}{t_0}$

3. **Viscosidade reduzida** (ou número de viscosidade): $\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}$ (em dL/g)

4. **Viscosidade intrínseca** (ou limite do número de viscosidade): $[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{red}$ (em dL/g)

5. **Peso Molecular Viscosimétrico Médio:** \overline{M}_v

6. **Equação de Mark-Houwink:** $[\eta] = K \times \overline{M}_v^a$, onde K e a são parâmetros que dependem do polímero, do solvente e da temperatura.

5.7 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

A fluorescência de raios X é uma técnica de análise qualitativa (identificação dos elementos presentes numa amostra) e quantitativa, permitindo estabelecer a proporção em que cada elemento se encontra presente. Usa-se uma fonte de radiação para provocar a excitação e detecção da radiação fluorescente resultante da interação da radiação com os átomos da substância da amostra que pretendemos analisar (*Belmonte, 2005*). Essa análise teve como objetivo a observação quantitativa da prata e sílica em toda a amostra e somente na superfície de PLA com nanopartícula de prata, sendo utilizado o aparelho Rayny EDX- 720, produzido

por Shimadzu (Figura 15), do Laboratório de Caracterização Estrutural do DEMa (LCE-DEMa), UFSCar.

As amostras de PLA 0,5% e 1% foram analisadas em dois momentos:

No primeiro momento foram analisados os elementos químicos em toda a amostra. No segundo momento as amostras sofreram tratamento com a finalidade de ficarem opacas, pois assim o feixe de elétrons não ultrapassa a amostra, sendo analisado o valor superficial da sílica e prata. Para as amostras ficarem opacas, elas foram colocadas em estufa de secagem por 48 horas a 70°C, temperatura de transição vítrea do PLA onde ocorre a cristalização e consequentemente a opacidade.



Figura 15. Fluorescência de raios x através do Aparelho Rayny EDX- 720, produzido por Shimadzu.

5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a observação da superfície das amostras de PLA com nanopartícula de prata, que foram submetidas à degradação natural em solo, foi utilizado o MEV. As amostras foram colocadas em um suporte metálico (Figura 16) e por não apresentarem condutividade elétrica, foi necessário tratá-las empregando um adesivo condutor. Em seguida as amostras foram metalizadas, cobertas com ouro, com o objetivo de torná-las condutivas.

Na observação por MEV foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, MEGALLAN 400L produzido pela FEI Company, do Laboratório de Caracterização Estrutural do DEMa (LCE-DEMa),UFSCar Figura 17.

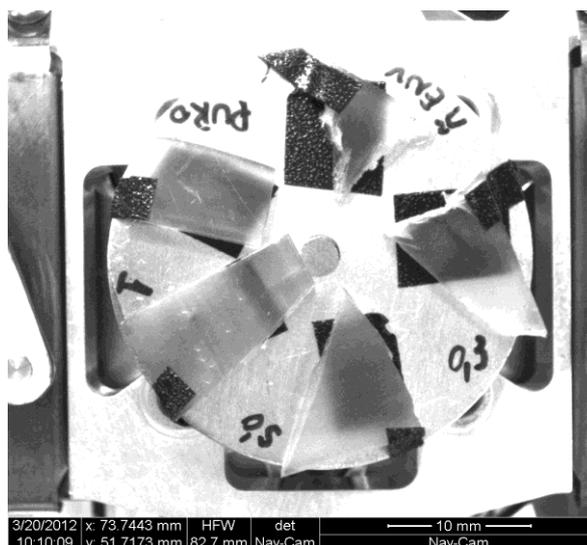


Figura 16 .Suporte metálico contendo as amostras de PLA com nanopartícula de prata.



Figura 17 . Microscópio eletrônico de varredura

5.9 ANÁLISE QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE PLA COM NANOPARTÍCULA DE PRATA.

Foi feita a análise química das amostras para a observação da prata e sílica, através do microscópio eletrônico de varredura. Esta análise possibilitou a visualização superficial desses elementos químicos presentes nas amostras, com a finalidade de observar a dispersão e distribuição das partículas.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise estatística dos resultados através da análise de variância (ANOVA) e análise de variância de dois critérios fixos (ANOVA-TWO WAY). Os resultados que apresentaram diferença significativa $p < 0,05$ foram submetidos ao teste de comparação de média de Tukey, pelo programa Origin versão 8.5.1.

6 RESULTADOS

6.1 TESTE ANTIMICROBIANO (*Norma JIS Z 2801:2000*)

A partir da média e desvio padrão dos dois experimentos independentes de contagem de células viáveis realizados para os dois microrganismos em estudo, onde foram realizados em triplicata, foram feitos os gráficos (Figura 18 e 19), para permitir a comparação da ação antibacteriana entre os materiais testados. A porcentagem indicada é a concentração de nanopartículas de prata incorporadas nos corpos de prova e as barras representam o desvio padrão referente a cada média do resultado. Pode-se observar que não houve redução na população inicial de *Staphylococcus aureus* e houve a redução de 70% em *Escherichia coli* em PLA com 1,0% de nanopartícula de prata após 24 horas de contato.

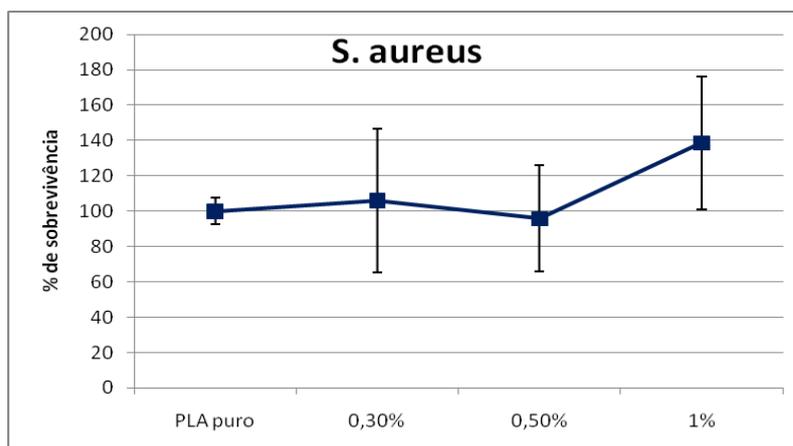


Figura 18 . Porcentagem de Sobrevivência de *Staphylococcus aureus* após 24 horas de incubação para as três concentrações de nanopartícula de prata. No teste de ANOVA não mostrou diferença estatisticamente significantes ($P < 0,05$).

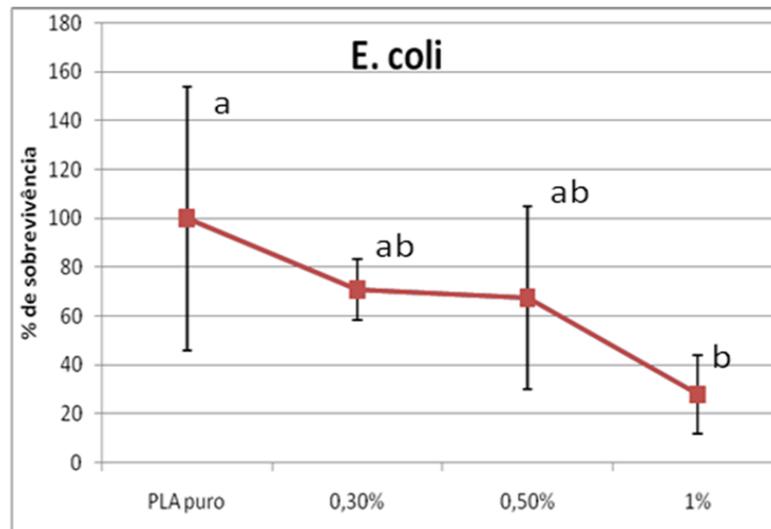


Figura 19 . Porcentagem de Sobrevivência de *Escherichia coli* após 24 horas de incubação para as três concentrações de nanopartícula de prata. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante ($P < 0,05$).

6.2 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS CÉLULAS VIÁVEIS RECUPERADAS DO BIOFILME BACTERIANO

A partir da média e desvio padrão dos dois experimentos independentes de contagem de células viáveis realizados em triplicata para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram feitos os gráficos (Figura 20, 21 e 22), para permitir a comparação da ação antibacteriana entre os materiais testados. A porcentagem indicada é a concentração de nanopartículas de prata incorporadas nos corpos de prova e as barras representam o desvio padrão referente a cada média do resultado. Pode ser observado que houve uma melhor ação para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em 3 dias na concentração de 1% de nanopartícula de prata.

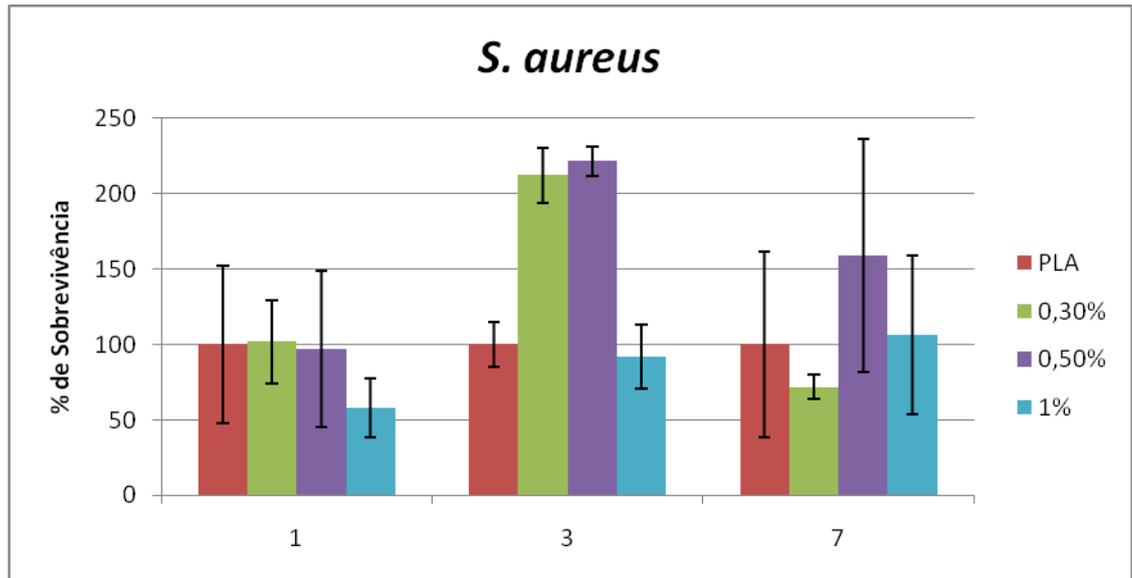


Figura 20 . Porcentagem de Sobrevivência de *Staphylococcus aureus* após 1, 3 e 7 dias de incubação para as três concentrações de nanopartícula de prata.

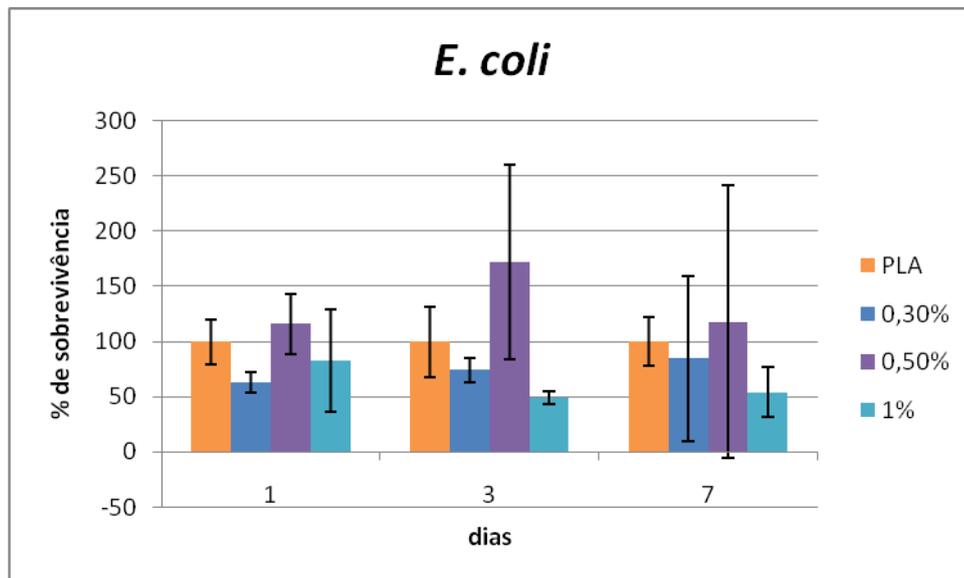


Figura 21 . Porcentagem de Sobrevivência de *Escherichia coli* após 1, 3 e 7 dias de incubação para as três concentrações de nanopartícula de prata.

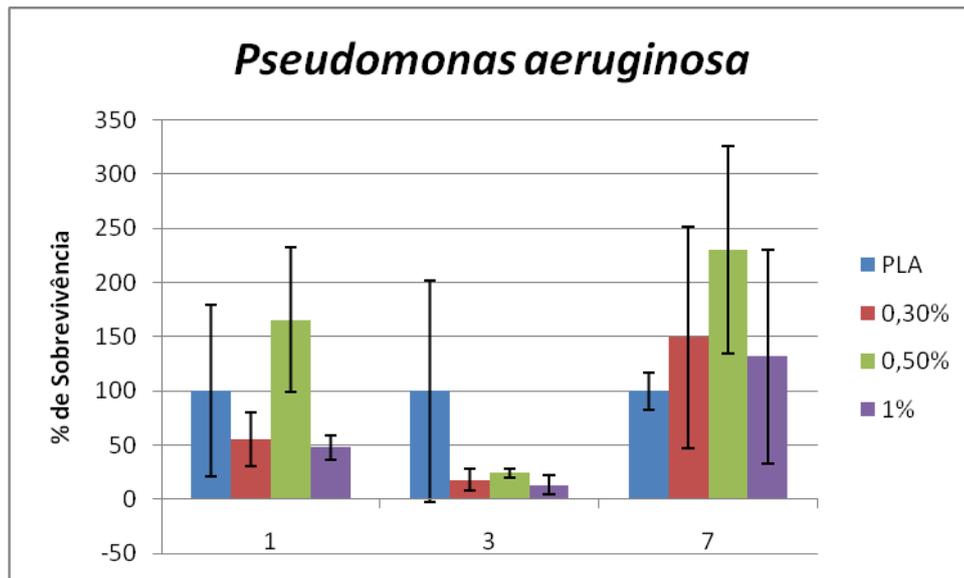


Figura 22 . Porcentagem de Sobrevivência de *Pseudomonas aeruginosa* após 1, 3 e 7 dias de incubação para as três concentrações de nanopartícula de prata.

6.3 BIODEGRADAÇÃO NATURAL EM SOLO ORGÂNICO

As massas obtidas após secagem foram comparadas com as massas dos corpos de prova antes de serem submetidos à biodegradação. A Figura 23 mostra que a biodegradação manteve-se estável ao longo dos períodos de retirada dos materiais. Até 180 dias não foi possível observar diferença macroscópicas de degradação do material. Com 328 dias já foi possível verificar uma maior fragilidade do material ao ser manuseado, quando foi removido do suporte de madeira. Verifica-se também que houve uma diminuição na perda de massa, por esse motivo foi realizado o teste de viscosidade intrínseca para determinação da massa molar.

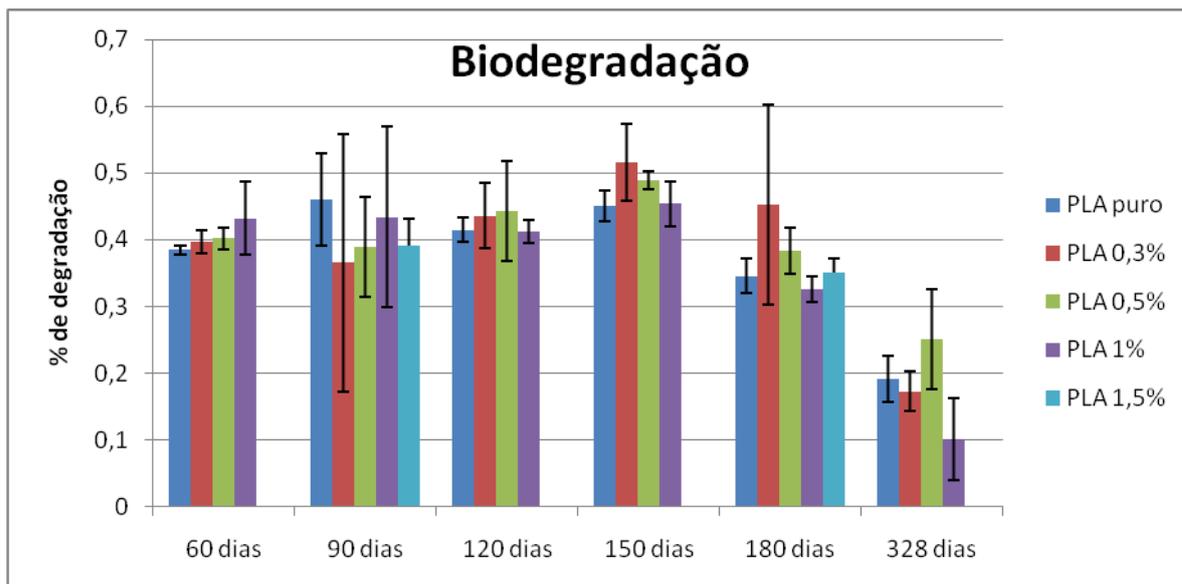


Figura 23. Porcentagem de degradação do PLA nos difentes tempo de retirada.

6.4 MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA

O Apêndice 6 apresenta, de modo ilustrativo, todos os resultados obtidos nos experimentos de Viscosidade de Soluções Diluídas para a amostra do PLA, matéria-prima de partida (polímero padrão). Para as outras 4 amostras foi aplicado o mesmo procedimento de cálculo.

A análise dos resultados do Método das Viscosidades de Soluções Diluídas foi direcionada para a avaliação do parâmetro Peso Molecular Viscosimétrico Médio (\overline{M}_v) do polímero PLA, em 5 situações, como mostrado no Quadro 6: como polímero padrão (amostra sem nanopartículas e não submetido a biodegradação), polímero sem nanopartícula e submetido a biodegradação, amostra contendo 0,3% de nanopartículas, amostra contendo 0,5% de nanopartículas, amostra contendo 1,0% de nanopartículas. As amostras analisadas foram no tempo de 328 dias.

Amostra	Peso Molecular Viscosimétrico Médio, \overline{M}_v (em g/mol ou Daltons)
PLA, matéria-prima de partida (polímero padrão)	294.000
PLA da amostra sem nanopartículas e enterrada em solo no tempo 328 dias	236.850
PLA da amostra contendo 0,3% de nanopartículas e enterrada em solo no tempo 328 dias	243.220
PLA da amostra contendo 0,5% de nanopartículas e enterrada em solo no tempo 328 dias	241.190
PLA da amostra contendo 1,0% de nanopartículas e enterrada em solo no tempo 328 dias	238.730

Quadro 6: Resultados do Peso Molecular Viscosimétrico Médio (\overline{M}_v) para o PLA das 5 amostras avaliadas

O valor inicial do Peso Molecular Viscosimétrico Médio (\overline{M}_v) é uma característica intrínseca do polímero PLA, como matéria-prima padrão empregada na Dissertação de Mestrado. No Quadro 6 observa-se uma redução expressiva do (\overline{M}_v) do polímero PLA das 4 amostras enterradas em solo no tempo 328 dias. Isto é, houve efetivamente um processo de biodegradação do polímero PLA para o tempo 328 dias. Esta redução do tamanho médio das macromoléculas do polímero PLA, constatada nas amostras enterradas 328 dias, é uma etapa vital do processo de biodegradação, que em tempos superiores deverá ser acompanhada de outros eventos, tais como, presença de fissuras e trincas, aumento da rugosidade das amostras e redução drástica da massa das amostras.

Na análise dos resultados do Quadro 6 também pode ser observado que, nas condições do experimento de biodegradação realizado, não houve influência da incorporação das nanopartículas na biodegradação do polímero PLA.

6.5 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Os resultados físicos das amostras de PLA 0,5% e PLA 1% ,após serem submetidos ao tratamento térmico, mostraram diferença no comportamento do PLA modificado com nanopartícula de prata. As amostras de PLA 0,5% ficaram cristalizada, com aspecto opaco (Figura 24A), diferentemente das amostras de PLA 1% que não ficaram tão opacas (Figura 24B), mas ambas amostras apresentam-se com uma boa distribuição das nanopartículas; apresentam-se uniformes visualmente.

Os resultados quantitativos da sílica e a prata em toda a amostra e somente superficial estão apresentadas respectivamente nos Quadros 7 e 8 .

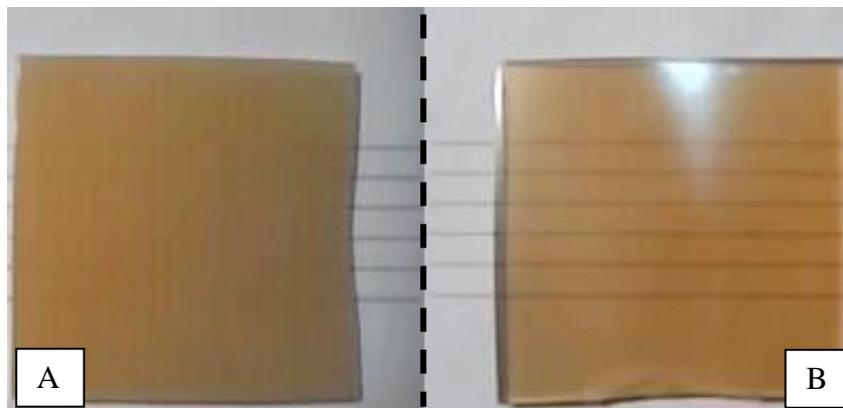


Figura 24. Amostras de PLA com tratamento térmico: (A) PLA 0,5% opaco (B) PLA 1% não opaco.

Geral			
0,5%		1,0%	
Si	Ag	Si	Ag
63,9	36,1	81,8	18,2
64,3	35,6	80,8	19,2
62,8	37,2	81,0	19,0

Quadro7 . Resultado quantitativo das amostras não tratada. Análise da Si (Sílica) e Ag (Prata) em toda a amostra de PLA 0,5% e 1% de nanopartícula de prata.

Superficial			
0,5%		1,0%	
Si	Ag	Si	Ag
68,8	31,2	87,0	13,0
70,0	29,0	83,0	16,1
68,1	31,9	83,0	16,8

Quadro 8 .Resultado quantitativo das amostras tratadas termicamente. Análise da Si (Sílica) e Ag (Prata) somente na superfície das amostras de PLA 0,5% e 1% de nanopartícula de prata.

6.6 VISUALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS AMOSTRAS DE PLA SEM NANOPARTÍCULA DE PRATA ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens apresentadas nas Figuras 25 e 26 , mostram a superfície da amostra de PLA sem nanopartícula de prata não submetido a biodegradação natural em solo e a superfície da amostra de PLA sem nanopartícula de prata submetido a degradação natural em solo, respectivamente. Na figura 26 pode ser observado pequenos depósitos de partículas na superfície do PLA.

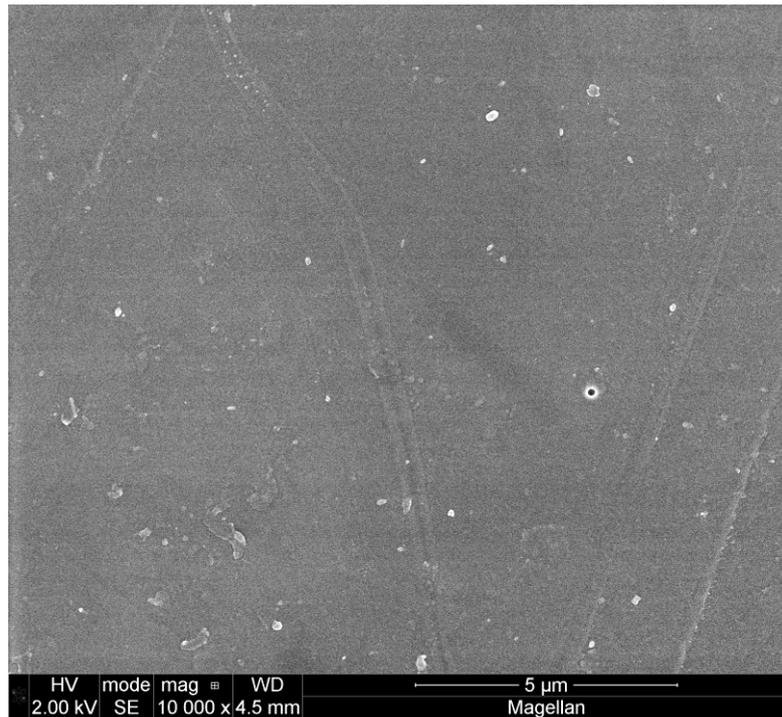


Figura 25 .Imagem da superfície do PLA sem nanopartícula de prata e não submetido a degradação natural em solo.

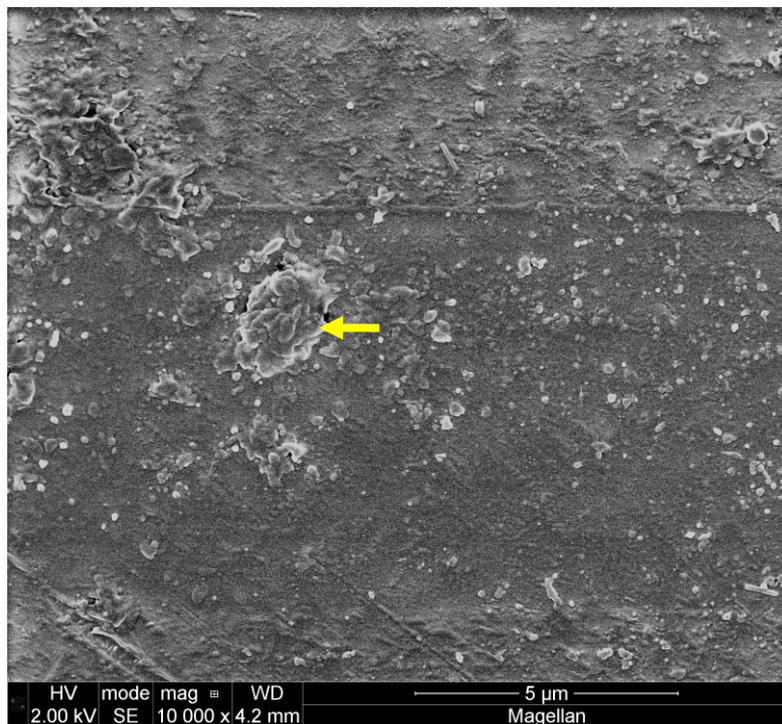


Figura 26. Imagem da superfície da amostra de PLA sem nanopartícula de prata e submetida a degradação natural em solo. Observar depósito na superfície (seta)

6.7 ANÁLISE QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DAS AMOSTRAS DE PLA TRATADAS COM NANOPARTÍCULA DE PRATA.

Na Figura 27, mostra as nanopartículas de prata acima e abaixo da superfície do polímero, sendo indicadas por flechas. As flechas 1, 2 e 3 mostram as nanopartícula de prata na superfície do PLA e as flechas 4 e 5 mostram as nanoartículas abaixo da superfície do polímero (são mais opacas).

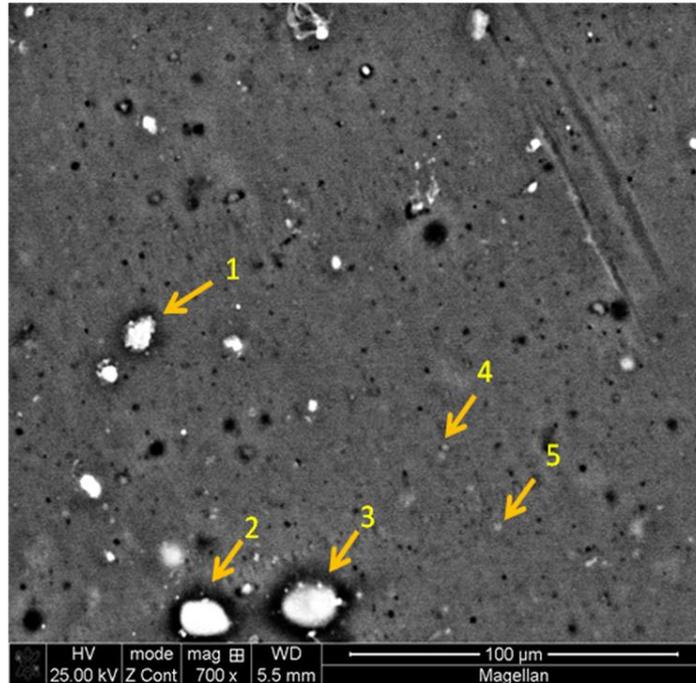


Figura 27. Imagem da superfície do PLA tratado com nanopartícula de prata, sendo observado a distribuição e dispersão da nanopartícula de prata. Seta de 1 a 3 superficiais e 4 e 5 incorporadas no material.

7. DISCUSSÃO

Poucos estudos foram publicados sobre nanopartícula de prata incorporadas no PLA, com a finalidade de avaliar a ação antibacteriana e a redução do número de bactérias aderidas ao material, portanto isso faz deste trabalho um estudo inovador em alguns pontos. Um desses pontos foi a avaliação da ação antibacteriana desse material incorporado com a nanopartícula e o estudo da biodegradação natural em solo.

Discutindo os dados do preparo dos corpos de prova, onde não foi possível injetar as amostras na concentração de 1,5% de nanopartícula de prata, mostra que a alta concentração de nanopartícula de prata modifica a estrutura do polímero ao ponto do mesmo apresentar maior viscosidade, levando ao travamento da injetora ROMI® Prática 130.

Os resultados para a ação antibacteriana foram melhores para *Escherichia coli* do que para *Staphylococcus aureus* na concentração de 1%. Segundo Kawahara et al. (2000); Kim et al. (2007); Rhim et al. (2006) explicam que as bactérias Gram-positivas são menos suscetíveis a atividade da prata do que as Gram-negativas. Kawahara et al. (2000) justifica que isso ocorre devido a diferença na parede celular. Bactérias Gram-positivas apresentam múltiplas camadas de peptidoglicano, onde muitas vezes apresentam ácidos teicóico ou ácidos lipoteicóico que têm carga negativa, contribuindo assim para o sequestro de íons livres de prata.

Outro fator que pode ter contribuído para a baixa eficácia da atividade antimicrobiana observada neste trabalho é o tamanho da nanopartícula de prata utilizado. Para os seguintes autores, Kim et al. (2007); Panacek et al. (2006); Pal et al. (2007), as propriedades da nanopartícula de prata podem variar de acordo com o tamanho, forma e superfície.

Outro estudo que aponta uma melhor eficácia para *Escherichia coli* do que para *Staphylococcus aureus* é o de Shameli (2010), que também trabalhou com PLA e nanopartículas de prata, entre 3,27; 3,83 e 7,77nm, nas concentrações 8, 16 e 32% , mas em filme. E através da técnica de difusão em disco avaliaram uma melhor ação antibacteriana com a concentração de 32%.

Kim et al. (2007) também relatou que a concentração inibitória mínima de nanopartículas de prata para *Escherichia coli* (entre 3,3nM e 6,6nM) foi menor do que para *Staphylococcus aureus* (33nM), pois bactérias Gram-negativas tem paredes celulares relativamente finas e, portanto, são mais propensas a destruição física. A atividade

antibacteriana diminui com o aumento do tamanho da partícula. A maior área de superfície de nanopartículas com tamanhos menores aumentam a oportunidade para a interação com a superfície bacteriana e promove um maior efeito antibacteriano. Comparado com o presente trabalho, as nanopartículas de prata apresentam de 20 a 50nm, sendo uma grande área de superfície, portanto explica o baixo efeito antibacteriano.

Nossos resultados para *Staphylococcus aureus*, assim como o de *Kim et al. (2007)*, mostraram que não houve diferença estatisticamente do efeito inibitório em comparação com o controle.

Também observamos baixa eficácia na inibição da formação do biofilme. Acreditamos serem os mesmos motivos apresentados anteriormente.

Outro ponto importante e inovador foi o estudo da biodegradação desse material. Pode ser observado que a perda de massa foi estável e não apresentou alterações visuais evidentes, como também é relatado por *Nascimento (2010)*.

Nascimento (2010) também mostra a estabilidade na biodegradação das amostras, PLA puro, nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias. Para o PLA modificado com amido, a perda de massa chegou a 7,0% aos 120 dias. Observou-se também um aumento acentuado na taxa de biodegradação ocorrido em 60 dias de ensaio. O amido, sendo um polímero biodegradável, contribuiu para a perda de massa das amostras ao longo do período de 120 dias e na análise viscosimétrica houve uma redução de 25% comparada com o polímero antes da biodegradação, enquanto o presente estudo apresentou redução de 20% nas amostras biodegradadas em 328 dias. Redução importante do tamanho médio das macromoléculas do polímero PLA, que indica que em tempos superiores ocorrerá o ataque bacteriano, surgimento de trincas e fissuras e uma drástica redução da massa das amostras.

A cinética deste processo de biodegradação depende fundamentalmente do polímero, da espessura da amostra, do tipo de solo e das condições experimentais em que a amostra é submetida ao contato com este solo (umidade e temperatura).

Na fluorescência de raios X foi observada uma diferença física do material. Observou-se que ocorreu uma diferença na cristalização entre o PLA 0,5% e 1%, onde o 0,5% apresentou-se mais opaco do que o 1%. Isso é explicado porque o tamanho dos cristais de 1% são menores do que os de 0,5%, dificultando sua cristalização, outro fator é a concentração da nanopartícula, quanto maior a concentração mais difícil é a cristalização do material. Os dados gerais e superficiais da sílica e da prata presente na amostra revelaram que quanto

maior a concentração maior são os valores de sílica e menor o de prata, assim a sílica pode estar cobrindo a prata, ocasionando uma má exposição das partículas, interferindo em sua ação antibacteriana.

Só foi possível uma imagem da superfície da amostra através da MEV, pois as mesmas perderam massa molar, tornando-as mais frágeis e o feixe de elétrons ao incidir na amostra provocava seu derretimento, impossibilitando a observação da superfície. Pode ser observado aglomerados na superfície do polímero. Após a perda molar ocorre o ataque bacteriano, o que justifica tal aglomeração que interferiu no peso final das amostras.

Liu et al. (2010) mostraram que a boa exposição da partícula é fundamental para a inibição no crescimento bacteriano, comparando com o presente estudo foi observado na análise química, através da MEV, uma má dispersão das partículas, pois apresentam-se aglomeradas na superfície do polímero e há partículas abaixo da superfície, o que dificulta a interação com a bactéria. Essa má dispersão das partículas pode ser justificada pelo processo de extrusão do material, pois ele é responsável em misturar e fundir as nanopartículas no polímero, mas não garante a distribuição e dispersão das partículas na amostra.

Seguindo o pensamento de dispersão e distribuição as nanopartículas incorporadas nas amostras do presente estudo mostraram-se distribuídas; uniformes; mas não dispersas, pois ficaram aglomeradas.

Portanto novos estudos devem ser realizados visando a obtenção de PLA com melhor distribuição e dispersão das nanopartículas, promovendo sua melhor exposição na superfície do polímero e conseqüentemente maior atividade antimicrobiana.

8. CONCLUSÕES

A alta concentração de nanopartícula de prata adicionada ao polímero provoca uma mudança na estrutura do material, apresentando-se mais viscoso, por isso impediu a injeção da amostra de 1,5% de nanopartícula de prata.

Quanto à atividade antibacteriana houve apenas uma redução de aproximadamente 70% observada em *Escherichia coli*. As nanopartículas não se mostraram eficazes na inibição do biofilme microbiano.

No período estudado somente foi possível detectar a etapa inicial de biodegradação do PLA com a redução de massa molar, em relação ao PLA padrão inicial. As nanopartículas não interferiram no processo.

O processo de extrusão do material interferiu na dispersão das nanopartículas e também favoreceu a aglomeração das mesmas, apesar do material apresentar uma boa distribuição, visualmente uniforme.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIPLAST. Perfil plástico, 2010. Disponível em http://file.abiplast.org.br/download/estatistica/perfil_2010.pdf, consultado em 19/3/2012.
2. Allaker, R. P. The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. *J Dent Res.*, v.89, p.1175, 2010.
3. ASTM D6003 - “Standard method for determining weight loss from plastic materials exposed to simulated municipal solid-wast (MSM) aerobic compost environment”. Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (1996).
4. ASTM G160 - “Standart practice for evaluating microbial susceptibility of nonmetallic materials by laboratory soil burial”. Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (1998).
5. Barth, E.; Myrvik, Q.M.; Wagner, W.; Gristina, A.G. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopedic implante materials. *Biomaterials*, v.10, p.325-328, 1989.
6. Bellinger, C.G.; Conway, H. Effects of silver nitrate and sulfamylon on epithelial regeneration. *Plast Reconstr Surg*, v.45, n.6, p. 582–585, 1970.
7. Belmonte, E.P. Espectrometria por fluorescência de raios x por reflexão total: um estudo simulado utilizando o método de Monte Carlo. Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro- RJ, Brasil, 2005.
8. Castellano, J.J.; Shafii ,S.M.; Ko, F.; Donate, G.; Wright ,E.T.; Mannari, R.J.; Payne, W.G.; Smith, D.J.; Robson, M.C. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *J International Wound.*, v.4, p.114-122, 2007.
9. Caixeta, D.S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. Dissertação (mestrado) apresentada na Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil, em 2008.
10. Chandra, R., Rustgi, R. Biodegradable polymers. *Polymers science*, v.23, p. 1273-1335, 1998.
11. Costerton, J.W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v.284, p.1318-1322, 1999.
12. De Munk, J.; Van Meerbeek, B.; Yoshida, Y., et al. Four-year water degradation of totaletch adhesives bonded to dentin. *J. Dent. Res.*, v.82, p.136-140, 2003.
13. Dukalska, L.; Muizniece-Brasava, S.; Kampuse, S.; Seglina, D.; Straumite, E.; Galoburda, R.; Levkane, V. Studies of biodegradable polymer material suitability for food packaging

- applications. Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology Department of Food Technology, 2008.
14. Duran, N.; Morais, C.; Mattoso, L.H.C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. Primeira edição. São Paulo-SP, Brasil, Editora Artliber, 2006, 208 p.
 15. Egger, S.; Lehmann, R.P.; Height, M.J.; Loessner, M.J.; Schuppler, M. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Appl Environ Microbiol.*, v.75, n.9, p.2973-2976, 2009.
 16. Fortunati, E.; Latterini, L.; Rinaldi, S.; Kenny, J.M.; Armentano, I. PLGA/Ag nanocomposites: in vitro degradation study and silver ion release. *J Mater Sci Mater Med.*, 2011.
 17. Garlotta, D. A literature review of Poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, New York, v. 9, n. 2, p. 63-84, abr.2002.
 18. Gemmell, C.G.; Edwards, D.I.; Frainse, A.P.; Gould, F.K.; Ridgway, G.L.; Warren, R.E. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *J Antimicrobial Chemother*, v.57,n.4, p. 589–608, 2006.
 19. Gogoi, S.K.; Gopinath, P.; Paul, A.; Ramesh, A.; Ghosh, S.S.; Chattopadhyay, A. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir*, v.22, n.22, p. 9322–9328, 2006.
 20. Gong, P.; Li, H.; Ele, X.; Wang, K.; Hu, J.; Tan, W.; Zhang, S.; Yang, X. Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, v.18 ,n.28, p. 604–11, 2007
 21. Gupta, A.P.; Kumar, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique, *European Polymer Journal*, v. 43, p. 4043 – 4074, 2007.
 22. Jain, P.; Pradeep, T. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol Bioeng.*, v.90 ,p. 59-63, 2005.
 23. JIS Z 2801:2000. Antimicrobial products—test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Standards Association, Tokyo, Japan, 2000.
 24. Jung, W.K.; Koo, H.C.; Kim, K.W.; Shin, S.; Kim, S.H.; Park, Y.H. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.*, v.74,n.7, p. 2171-2178, 2008.
 25. Kasnowski, M.C.; Mantilla, S.P.S.; Oliveira, L.A.T.; Franco, R.M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.15, p.1-23, 2010. Disponível em

- <http://www.revista.inf.br/veterinaria15/revisao/ANOIIIEDI15RL07.pdf>, consultado em 14/11/2011.
26. Karlsson, S., Albertson, A.C. *Polymer Engineering and Science*, v.38, p.1251, 1998.
 27. Kawahara, K.; Tsuruda, K.; Morishita, M.; Uchida, M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental Materials*, p.452-455, 2000.
 28. Klasen, H.J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*, v. 26, p.131-138, 2000.
 29. Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J-H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S.H.; Park, Y. K.; Park, Y. K.; Hwang, C.-Y.; Kim, Y-K.; Lee, Y.-S.; Jeong, D.H.; Cho, M.-H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v.3, p.95-101, 2007.
 30. Kreyenschmidt, J.; Stamminger, R.; Petersen, B. Assessment of sustainable antimicrobial methods with regard to their ability to reduce airborne and surface bacteria in the food supply chain, 2010. Disponível em <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2010/2211/2211.pdf>, consultado em 08/12/2011.
 31. Landsdown, A.B.G. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*, v.11, p.125-130, 2002.
 32. Li, Q.; Mahendra, S.; Lyon, D.Y.; Brunet, L.; Liga, M.V.; Li, D.; Alvarez, P.J.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, v. 42, p. 4 5 9 1 – 4 6 0 2, 2008.
 33. Liu, H.L.; Dai, S.A ;Fu, K.Y.; Hsu, S.H. Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. *International Journal of Nanomedicine*, v.5, p. 1017-28, 2010.
 34. Lunt, J. Large scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers, *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, p. 145 – 152, 1998.
 35. Matsumura, Y.; Yoshikata, K.; Kunisaki, S.; Tsuchido, T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied Environmental Microbiology*, v. 69, n.7, p.4278–4281, 2003.
 36. Montville, R.; Schaffner, D.W. Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.7188-7193, 2003.
 37. Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramirez, J.T.; Yacaman, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v.16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.
 38. Miyano, N.; Oie, S.; Kamiya, A. Efficacy of disinfectants and hot water against biofilm cells of *Burkholderia cepacia*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.26, p.671-674, 2003.

39. Nascimento, M.S. Estudo da influência de cargas minerais e amido na biodegradação do PLA. Dissertação (o) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos–SP,Brasil, em 2010.
40. Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbio.*, v.73, n.6, p. 1712-20,2007.
41. Panecek, A.; Kvittek, L.; Pucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizúrova, N.; Shrama, VK.; Necna, T.; Zboril, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B.*, v.110, n.33, p.16248-53, 2006.
42. Panacek, A.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pucek, R. Soukupova, J.; Krystof, V. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, v.30, p.6333-6340, 2009.
43. Rai, M., Yadav, A., Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, v.27, p.76-83, 2009.
44. Reddy, M.P.; Venugopal, A.; Subrahmanyam, M. Hydroxyapatite-supported Ag–TiO₂ as *Escherichia coli* disinfection photocatalyst. *Water Res.*, v. 41, p. 379–386, 2007.
45. Rhim, J.W.; Hong, S.I.; Park, H.M.; Perry, K.W. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.*,v.54,p.5814-5822,2006.
46. Rudinik, E.; Briassoulis, D. Degradation behaviour of poly(lactic acid) films and fibres in soil under Mediterranean field conditions and laboratory simulations testing. *Industrial Crops and Products*, p.648-658, 2011.
47. Samuel, U.; Guggenbichler, J.P. Prevention of Catheter-Related Infections: The Potencial of a New Nano-Silver Impregnated Catheter. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 23S1, p. S75-S78, 2004.
48. Sayes, C.M.; Fortner, J.D.; Guo, W.; Lyon, D.; Boyd, A.M.; Ausman, K.D.; Tao, Y.J.; Sitharaman, B.; Wilson, L.J.; Hughes, J.B.; West, J.L.; Colvin, V.L. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett.*,v.4, n.10, p. 1881–1887, 2004.
49. Shameli, K.; Ahmad, M.B.; Yunus, W.M.; Ibrahim, N.A.; Rahman, R.A.; Jokar, M.; Darroudi, M. Silver/poly (lactic acid) nanocomposites: preparation, characterization, and antibacterial activity. *International Journal of Nanomedicine*, v.5, p.573-9, 2010.
50. Shawaphun, S.; Manangan, T. Paper Coating with Biodegradable Polymer for Food Packaging. *Science Journal Ubonratchathani University*, v.1, n.1, p.51-57, 2010.

51. Simon, P.; Chaudhry, Q.; Bakos, D. Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food – a physiochemical view. *Journal of Food and Nutrition Research*, v.47, n.3, p.105-113, 2008.
52. Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, v.275, p.177-182, 2004.
53. Sutherland, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, n.5, v.9, p. 222-227, 2001.
54. Travan, A.; Pelillo, C.; Donati, I.; Marsich, E.; Benincasa, M.; Scarpa, T.; Semeraro, S.; Turco, G.; Gennaro, R.; Paoletti, S. Non-cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide Nanocomposites with Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*, v.10, n.6, p.1429-45, 2009.
55. VD Plast. Nobreza do plástico. Jul. 2003. Disponível em: http://www.vdplast.com.br/artigo_01072003.asp, consultado em: 02/04/2011.
56. Yudovin-Farber, I.; Beyth, N.; Nyska, A.; Weiss, E.I.; Golenser, J.; Domb, A.J. Surface characterization and biocompatibility of restorative resin containing nanoparticles. *Biomacromolecules*, v.9, p.3044-3050, 2008.

10. Apêndice 1

Apêndice 1

Tabela 1. Especificação do PLA utilizado

	ASTM	PLA 2002 D
Índice de fluidez	D 1238 (210°C/ 2,16 kg)	6 g/10min
Tensão de tração na ruptura	D 882	53 MPa
Resistência máxima à tração	D 882	60 MPa
Módulo de elasticidade	D 882	3,5 GPa
Alongamento na ruptura	D 882	6,0 %
Resistência ao Impacto Izod, com entalhe	D 256	12,8 J/m

Apêndice 2

- As nanopartículas de prata foram fabricadas e fornecidas pela empresa Nanox® Tecnologia S. A., (São Carlos – SP, Brasil). Há uma matriz de óxido, com sílica amorfa (SiO₂), na qual o metal, a prata, fica adsorvida. O diâmetro médio das partículas é 10 a 12 µm para a sílica, e de 20 a 50nm para a prata, que se apresenta adsorvida nela.

Apêndice 3

- **Quadro 1.** Condições utilizadas na extrusão do PLA + nanopartículas

Parâmetro de extrusão	
Dosador (rotações por minuto)	4
Rosca (rotações por minuto)	200
Torque (%)	50

- **Quadro 2.** Perfil de temperatura utilizado na extrusão do PLA + nanopartículas

	Perfil de temperatura (°C)										
Zonas de aquecimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	bico
Temperatura (°C)	93	110	170	180	187	195	195	195	190	190	200

Apêndice 4

- **Quadro 3.** Perfil de temperatura para o processo de injeção dos corpos de prova para a biodegradação

Amostra	Zona 1 (°C)	Zona 2 (°C)	Zona 3 (°C)	Zona 4 (°C)
PLA	165	180	185	190
PLA/0,3%	175	185	190	190
PLA/0,5%	175	185	185	185
PLA/1%	177	187	190	190

- **Quadro 4.** Perfil de temperatura para o processo de injeção dos corpos de prova, (placas), para o teste antimicrobiano.

Amostra	Zona 1 (°C)	Zona 2 (°C)	Zona 3 (°C)	Zona 4 (°C)
PLA	160	175	180	185
PLA/0,3%	160	175	180	185
PLA/0,5%	160	178	183	190
PLA/1%	165	178	183	195

Apêndice 5

Solo: Fornecido pela Empresa Provaso Indústria e Comércio de Fertilizantes Orgânicos S/S Ltda. com a seguinte especificação: matéria orgânica mínima 40%, nitrogênio mínimo 1%, umidade máxima 45%, pH 6, relação C/N máxima 18/1. Este solo é um composto orgânico unificado à base de esterco de aves e materiais orgânicos de origem vegetal.

Apêndice 6

Apresenta de modo ilustrativo, todos os resultados obtidos nos experimentos de Viscosidade de Soluções Diluídas para a amostra do PLA, matéria-prima de partida (polímero padrão). Os dados da Tabela 2 e da Tabela 3 resultaram no valor de Peso Molecular Viscosimétrico Médio: $\overline{M}_v = 294.000$ g/mol (ou Daltons) para o polímero PLA, matéria-prima de partida (polímero padrão). A Figura 28 mostra o valor da Viscosidade intrínseca ($[\eta]$) obtido por extrapolação do gráfico com pontos experimentais para a Concentração tendendo a zero.

Tabela 2. Medidas para o Poli (ácido láctico) - PLA, matéria-prima de partida (polímero padrão): Tempo de escoamento t_0 para o solvente puro (clorofórmio) e Tempos de escoamento t para as soluções diluídas (PLA/Clorofórmio) em 4 concentrações diferentes, a 30°C

Medida	t_0 (s)	t (s) C=0,05 g/dL	t (s) C=0,10 g/dL	t (s) C=0,25 g/dL	t (s) C=0,50 g/dL
1	68,5	86,5	104,2	162,0	252,8
2	69,3	87,0	104,9	159,3	254,0
3	68,2	86,2	105,3	159,6	252,5
4	68,1	86,5	105,8	160,5	253,2
5	67,3	86,8	104,8	162,1	253,0
Média	68,3	86,6	105,0	160,7	253,1

Tabela 3. Medidas para o Poli (ácido láctico) - PLA, matéria-prima de partida (polímero padrão): Viscosidades de solução em função da concentração (C)

C (g/dL)	Viscosidade relativa η_r	Viscosidade específica η_{sp}	Viscosidade reduzida η_{red} (dL/g)
0,5	3,706	2,706	5,41
0,25	2,353	1,353	5,41
0,1	1,537	0,537	5,37
0,05	1,268	0,268	5,36

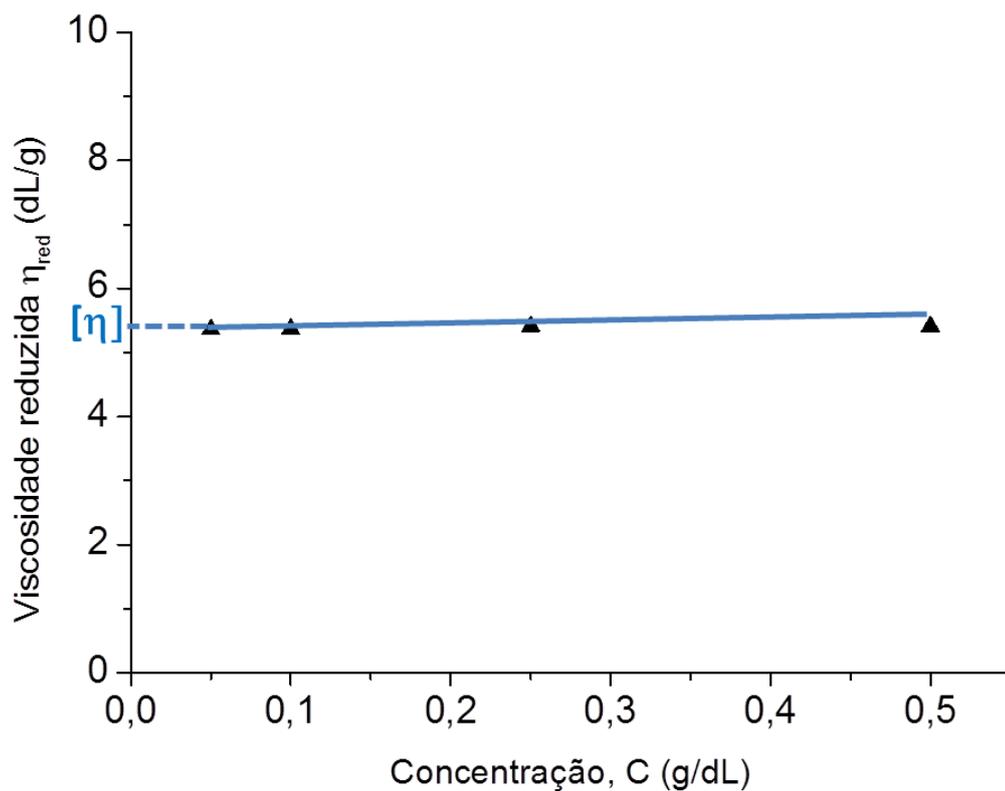


Figura 28. Viscosidade reduzida (η_{red}) em função da Concentração (C) da Solução; valor da Viscosidade intrínseca ($[\eta]$) obtido por extrapolação do gráfico com pontos experimentais para a Concentração tendendo a zero.

Cálculo do Peso Molecular Viscosimétrico Médio (\overline{M}_v):

$$[\eta] = K \times \overline{M}_v^a$$

$$[\eta] = 5,35 \text{ dL/g (valor obtido graficamente)}$$

$$K = 5,45 \cdot 10^{-4} \text{ dL/g e } a = 0,73$$

$$5,35 = 5,45 \cdot 10^{-4} \times \overline{M}_v^{-0,73}$$

$\overline{M}_v = 294.000 \text{ g/mol (ou Daltons)}$ para o polímero PLA, matéria-prima de partida (polímero padrão)

Apêndice 7

Composição dos meios de cultura e soluções

Os meios de cultura utilizados foram: TSB (Tryptic Soy Brot), PBS (Tampão Fosfato), PCA (Plate Count Agar), Caldo de carne SCDLP.

•Composição do PBS (solução salina tamponada fosfatada, pH 7.4):

· NaCl –	8 g
· KCl –	0,2 g
· Na ₂ HPO ₄ –	1,15 g
· KH ₂ PO ₄ –	0,2 g
· Água destilada –	1000 mL

•Composição do caldo de carne SCDLP

· TSB –	30g
· Lecitina –	1,0g
· Tween 80 –	7g
· Água destilada –	1000mL