

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

**“DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE
CARBOXIMETILCELULOSE COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA E AVALIAÇÃO DE
SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
TOXICIDADE”**

Maria Célia Siqueira Furlanetto*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso

*bolsista CAPES

São Carlos- SP

2014

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

F985df Furlanetto, Maria Célia Siqueira.
Desenvolvimento de filmes de carboximetilcelulose com nanopartículas de prata e avaliação de sua atividade antimicrobiana e toxicidade / Maria Célia Siqueira Furlanetto. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
147 f.

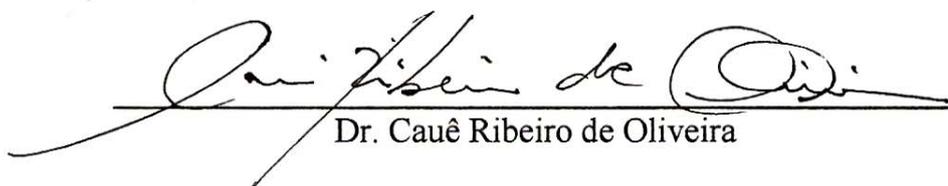
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

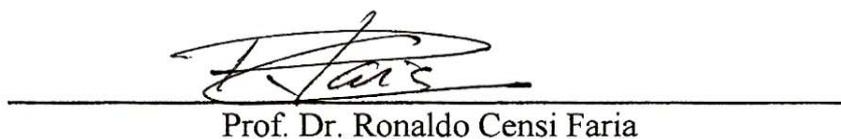
1. Química. 2. Nanopartículas de prata. 3. Carboximetilcelulose. 4. Nanotoxicidade. 5. Antimicrobiana. 6. Embalagens. I. Título.

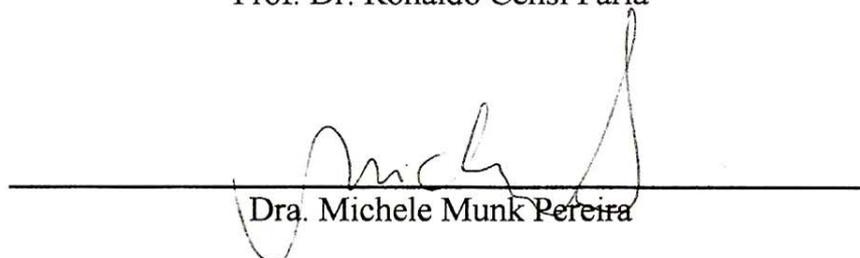
CDD: 540 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

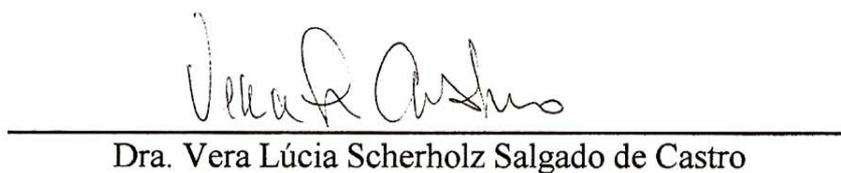
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado da candidata Maria Celia Siqueira Furlanetto, realizada em 25 de agosto de 2014:


Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira


Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria


Dra. Michele Munk Pereira


Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva


Dra. Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro

À Deus pela nova chance de vida e possibilidade desse aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por sempre estar comigo;

À Equipe do Fígado do Hospital Israelita Albert Einstein pela minha nova vida;

Ao meu marido Ciro, pelo apoio, companheirismo e amor sempre;

Aos meus pais e irmão, Márcio, Sílvia e Lucas pelo apoio em todas as horas;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso, pela oportunidade e orientação;

Ao Dr. José Manoel Marconcini, pela parceria e oportunidade;

Aos amigos da Embrapa Instrumentação pela ajuda e companheirismo em todas as horas, em especial à Dra. Márcia Regina Aouada;

À Embrapa Meio Ambiente, Embrapa Gado de Leite e Embrapa Suínos e Aves pela parceria nas análises;

À Dra. Renata Lima (UNISO) pela disponibilidade de treinamento e Dra. Jaqueline Bianchi;

À Luzia Oliveira, pelo auxílio estatístico;

Ao Programa de Pós Graduação em Química (UFSCar);

À Capes pela bolsa de doutorado.

LISTA DE ABREVIATURAS

a*: intensidade vermelho-verde

A. cepa: *Allium cepa*

AC: Alterações Cromossômicas

ANCOVA: Análise de Covariância

ANOVA: Análise de Variância

b*: intensidade amarelo-azul

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%

CMC: Carboximetilcelulose

D. similis: *Daphnia similis*

EPA: Environmental Protection Agency

FT-IR: Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier

IAC: Índice de Alterações Cromossômicas

IACR: Índice de Alterações Cromossômicas Relativo

IM: Índice Mitótico

IMR: Índice Mitótico Relativo

LB: Luria-Broth

L*: Luminosidade

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MIC: Minimum Inibitory Concentration

NPAg-PVA: Nanopartículas de prata

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

PVA: Poli (álcool vinílico)

TG: Termogravimetria

WVP: Water Vapour Permeability

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1: Resistência à tração de alguns filmes, comestíveis ou não, utilizados na embalagem de alimentos.	9
TABELA 2.2: Comparativo entre os métodos do citrato e do borohidreto na síntese de nanopartículas de prata-PVA.	16
TABELA 3.1: Volume e concentração das soluções-teste CMC/(NPAg-PVA) no teste MIC.	54
TABELA 4.1: Valores médios obtidos no ensaio tensão-deformação para filmes CMC e CMC/(NPAg-PVA).	70
TABELA 4.2: Solubilidade em água de filmes: CMC e CMC/(NPAg-PVA).	72
TABELA 4. 3: Atribuições das bandas no espectro de FT-IR relacionadas ao PVA e CMC/(NPAg-PVA).	73
TABELA 4.4: Dependência da Permeabilidade ao Vapor de Água de filmes de CMC sem e com a adição de nanopartículas de prata.	75
TABELA 4.5: Composição de voláteis, orgânicos e resíduos dos filmes.	77
TABELA 4.6: Leitura colorimétrica dos filmes de CMC.	79
TABELA 4.7: Concentração Mínima Inibitória (MIC) da solução CMC/(NPAg-PVA).	83
TABELA 4.8: IM e IMR de células meristemáticas de <i>A. cepa</i> para as duas concentrações da substância teste, Controle Negativo e Controle Positivo.	88
TABELA 4.9: IAC e IACR de células meristemáticas de <i>A. cepa</i> para as duas concentrações da substância teste, Controle Negativo e Controle Positivo.	89
TABELA 4.10: Concentrações médias e comparações múltiplas.	96
TABELA 4.11: Parâmetros de toxicidade aguda para <i>D. Similis</i> expostas a diferentes concentrações de solução filmogênica/nanopartículas de prata durante 24 e 48 horas.	112

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: Reação esquemática de obtenção da carboximetilcelulose de sódio.....	12
FIGURA 2.2: Esquema ilustrativo dos métodos de obtenção de nanopartículas: Top-down e bottom-up.	14
FIGURA 2.3: Mecanismo de formação de nanopartículas de prata-PVA por meio da redução química utilizando o agente redutor borohidreto de sódio.	17
FIGURA 2.4: Estrutura do PVA: x corresponde a 88-99 mol% e y a 1-12 mol%.	19
FIGURA 2.5: Estrutura celular de bactérias Gram-positiva e negativa.	27
FIGURA 2.6: Exemplos de células meristemáticas normais e alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> : A:Núcleo interfásico normal, A1:Micronúcleo na intérfase, B:Prófase normal, B:Prófase com micronúcleo, C:Metáfase normal, C1:Metáfase com aderência cromossômica, C2:C-metáfase, C3:Metáfase poliploide, C4:Metáfase com quebra cromossômica,D:Anáfase normal, D1:Anáfase com ponte cromossômica, D2: Anáfase multipolar, D3:Anáfase com perdas cromossômicas (setas), E:Telófase normal, E1: Telófase com atraso cromossômico, E2: Telófase com ponte cromossômica, E3: Telófase com ponte (cabeça de seta) e perda cromossômica (seta).....	32
FIGURA 3.1: Fluxograma contendo os ensaios realizados durante a execução do trabalho...	41
FIGURA 3. 2: (A) Síntese de NPAg-PVA e filme CMC/(NPAg-PVA) e (B) Filme CMC. ...	43
FIGURA 3.3: Parâmetros do sistema de cores da CIELAB.	52
FIGURA 3.4: Níveis de capacidade antibacteriana do composto em função da presença do halo de inibição.	54
FIGURA 4.1: Espectros de absorção UV-Vis para nanopartículas de prata estabilizadas com PVA e íons prata livres.....	63
FIGURA 4. 2:Distribuição do tamanho médio das nanopartículas de prata-PVA obtida pela técnica de espalhamento dinâmico de luz.	66
FIGURA 4.3: Dependência do potencial zeta com variação de pH em (A) solução filmogênica CMC e (B) Solução filmogênica CMC/(NPAg-PVA).	68
FIGURA 4.4: Micrografias de MEV/FEG: (A) Nanopartículas de prata-PVA e (B) filme de CMC/(NPAg-PVA).	69
FIGURA 4.5:Curvas típicas tensão-deformação obtidas nos ensaios de tração de filmes de CMC na presença e ausência de nanopartículas de prata.	70
FIGURA 4.6:Espectro de FTIR dos filmes CMC e CMC/(NPAg-PVA), Nanopartículas de prata-PVA e PVA puros.	74
FIGURA 4.7: Curvas TG: (A) Nanopartículas de prata-PVA; (B) Filme CMC e (C) Filme CMC/(NPAg-PVA) em atmosfera de ar sintético (80% N ₂ - 20% O ₂ v/v).....	77
FIGURA 4.8: Curvas de DSC: (A) Nanopartículas de prata-PVA, (B) Filme CMC/(NPAg-PVA).e (C) Filme CMC.	79
FIGURA 4.9: Teste do Halo de Inibição para as soluções filmogênicas de CMC e CMC/(NPAg-PVA).	81
FIGURA 4.10:Resultados obtidos visualmente nos ensaios para a determinação do valor da concentração mínima inibitória realizados para solução CMC/(NPAg-PVA) (A) <i>Escherichia coli</i> e (B) <i>Enterococcus Faecalis</i> . A= solução (CMC/NPAg-PVA) 0,06 µg mL ⁻¹ Ag., B=solução (CMC/NPAg-PVA) 0,12 µg mL ⁻¹ Ag, C=(CMC/NPAg-PVA) 0,24 µg mL ⁻¹ Ag, D=Controle positivo e E=Controle Negativo.....	83
FIGURA 4.11: Efeito dos diferentes tratamentos no Índice Mitótico Relativo (IMR) em células de <i>A. cepa</i>	88
FIGURA 4.12: Efeito dos diferentes tratamentos no Índice de Alterações Cromossômicas Relativo (IACR) em células de <i>A. cepa</i>	89

FIGURA 4.13: Alterações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após a exposição ao herbicida trifluralina e diferentes concentrações das soluções filmogênicas contendo nanopartículas de prata: A: Broto interfásico; B: C-metáfase; C: Anáfase com ponte; D: Anáfase poliplóide e E: Telófase com ponte.....	90
FIGURA 4.14: Concentrações médias de prata no íleo dos animais (machos e fêmeas) e seus respectivos desvios.....	94
FIGURA 4.15: Vista ventral da cavidade abdominal de rato Wistar: 1: fígado, 2: estômago, 3: ceco (removido), 4: baço, 5: pâncreas, 6: íleo, 7: cólon, 8: duodeno, 9: útero.....	94
FIGURA 4.16: Perfis individuais e médios das massas corpóreas dos animais.....	99
FIGURA 4.17: Perfis individuais e perfis médios ajustados pelo modelo reduzido.....	100
FIGURA 4.18: Relação massa do fígado dos machos e fêmeas com respectivas doses.....	101
FIGURA 4.19: Massas médias estimadas dos fígados de machos por dose e respectivos intervalos de confiança.....	102
FIGURA 4.20: Massas médias estimadas dos fígados de fêmeas por dose e respectivos intervalos de confiança.....	104
FIGURA 4.21: Relação da massa do intestino e doses.....	104
FIGURA 4.22: Massas médias estimadas dos intestinos dos machos por dose e respectivos intervalos de confiança.....	105
FIGURA 4.23: Massas médias estimadas dos intestinos das fêmeas por dose e respectivos intervalos de confiança.....	106
FIGURA 4.24: Relação entre a massa do cérebro dos animais e doses.....	107
FIGURA 4.25: Massas médias estimadas dos cérebros dos machos por dose e respectivos intervalos de confiança.....	108
FIGURA 4.26: Massas médias estimadas dos cérebros das fêmeas por dose e respectivos intervalos de confiança.....	109
FIGURA 4.27: Relação entre as massas do íleo dos animais e doses.....	109
FIGURA 4.28: Massas médias estimadas dos íleos dos machos por dose e respectivos intervalos de confiança.....	110
FIGURA 4.29: Massas médias estimadas dos íleos das fêmeas por dose e respectivos intervalos de confiança.....	111
FIGURA 4.30: (A) <i>Daphnia</i> do grupo controle e (B) <i>Daphnia</i> exposta a solução contendo nanopartículas de prata.....	112

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE FILMES DE CARBOXIMETILCELULOSE COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE: Uma alternativa para embalagens é o uso de materiais renováveis como matéria-prima no desenvolvimento de filmes, com o desafio de manter a qualidade do produto. Polissacarídeos são abundantes e de origem renovável, e seus derivados, como a carboximetilcelulose, muito utilizada na indústria alimentícia, tem potencial de uso como novos materiais na forma de filmes. Porém, há desafios de adequação de propriedades mecânicas e incorporação de novas funcionalidades (como antimicrobiano) a filmes de carboximetilcelulose para tornar seu uso adequado a embalagens. Um sistema promissor para a modificação das características desses filmes é a incorporação de nanoestruturas aos mesmos. Contudo, no Brasil ainda não há uma legislação para nanomateriais e com o maior uso dessa tecnologia, torna-se importante avaliar o impacto destes novos materiais desde o seu desenvolvimento até o consumidor final, visando direcionar melhor as pesquisas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes de carboximetilcelulose com PVA-nanopartículas de prata e avaliar a sua atividade antimicrobiana e a toxicidade. Nanopartículas de prata foram sintetizadas e incorporadas em carboximetilcelulose, via solução, obtendo-se filmes por *casting*. As seguintes técnicas de caracterização dos filmes/soluções filmogênicas foram utilizadas: Espectrofotometria na região do UV-Vis, Análise do Tamanho das Partículas, Potencial Zeta, Permeabilidade ao Vapor de Água, Espectrofotometria de Infravermelho, Termogravimetria, Calorimetria Exploratória Diferencial, Ensaio Mecânico de Tração, Solubilidade dos filmes em Água, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/FEG) e Colorimetria. Em geral, a adição das nanopartículas modificou as características dos filmes de CMC, aumentando as propriedades mecânicas em 66,7%. Avaliou-se a atividade antimicrobiana do

sistema nanoestruturado por meio da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e halo de inibição, utilizando-se bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*). Valores de MIC mostraram a alta efetividade da incorporação de nanopartículas de prata em filmes de CMC ($0,12\mu\text{g mL}^{-1}$), mostrando seu potencial para o uso em embalagens antimicrobianas. Na avaliação da toxicidade desse sistema nanoestruturado, foram realizados testes *in vivo* em cultura de células (cito e genotoxicidade em *Allium cepa*), ingestão em ratos Wistar e ecotoxicidade em microcrustáceo *Daphnia Similis*. Em células meristemáticas de *A. Cepa*, nenhum resultado decitotoxicidade foi verificado. A análise das alterações cromossômicas indicou uma predominância de alterações como pontes cromossômicas em anáfase, verificando-se uma ação clastogênica do PVA-nanopartículas de prata. Testes com ratos Wistar sugeriram toxicidade do sistema nanoestruturado, causando uma vacuolização no fígado e dilatação difusa das criptas no intestino, com acúmulo de nanopartículas de prata no íleo. Resultados de ecotoxicidade sugeriram um potencial tóxico das nanopartículas de prata para invertebrados aquáticos (CE_{50} 24 e 48 horas iguais a $0,0015$ e $0,0012\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Os resultados deste trabalho indicam que, mesmo em baixas concentrações, nanopartículas de prata podem induzir a danos celulares em organismos expostos. Devido ao seu crescente uso, estes dados reforçam a importância da realização de estudos adicionais para nanopartículas de prata como parte de sistemas nanoestruturados.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CARBOXYMETHYLCELLULOSE FILMS WITH SILVER NANOPARTICLES AND EVALUATION OF THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND TOXICITY: One alternative for new packagings is the use of renewable materials as raw material in the development of films, with the challenge of maintaining the quality of the product. Polysaccharides are abundant and renewable origin, and its derivatives, such as carboxymethylcellulose, widely used in the food industry, have potential use as new materials in the form of films. However, there are challenges adequacies of mechanical properties and incorporation of new features (as antimicrobial) in carboxymethylcellulose films to make her suitable for packaging use. A promising system to modify the characteristics of these films is the incorporation of nanostructures. However, in Brazil there is no legislation to nanomaterials and the increased use of this technology, it is important to value the impact of these new materials from development to the final consumer, to better direct the search. In this context, the objective of this study was to develop carboxymethylcellulose films with PVA-silver nanoparticles and evaluate their antimicrobial activity and toxicity. Silver nanoparticles were synthesized and incorporated in carboxymethylcellulose, via solution, obtaining films by *casting*. The following techniques to characterize films/solutions were used: spectrophotometry UV-Vis, Analysis of Particle Size, Zeta Potential, Water Vapor Permeability, Infrared Spectrophotometry, Thermal Analysis (Thermogravimetry and Differential Scanning Calorimetry), Mechanical Testing Tensile, Film Solubility in Water, Scanning Electron Microscopy (SEM / FEG) and Colorimetry. Generally, the addition of nanoparticles modified the characteristics of films, increasing mechanical properties at 66.7%. Evaluated the antimicrobial activity of the nanostructured system by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and inhibition zone, using Gram-positive bacteria

(*Enterococcus faecalis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*). MIC values showed the high effectiveness of the incorporation of the nanoparticles of CMC films ($0,12\mu\text{g mL}^{-1}$), demonstrating the potential of this material for use in antimicrobial packages. In valuation of the toxicity of this nanostructured system, in vivo tests were performed in cultured cells (cyto and genotoxicity in *Allium cepa*), ingestion in Wistar rats and ecotoxicity in microcrustacean *Daphnia similis*. In meristematic cells of *A. cepa*, no result of cytotoxicity was verified in *A. cepa*. The analysis of chromosomal aberrations indicated predominance of abnormalities such as bridges chromosome in anaphase, verifying a clastogenic action of PVA-silver nanoparticles. Tests with rats have suggested the toxicity of nanostructured system, causing vacuolation in the liver and intestine crypt dilation, with accumulation of PVA-silver nanoparticles in ileum. Results of ecotoxicity have suggested a toxic potential of silver nanoparticles to aquatic invertebrates (CE_{50} 24 and 48 h equal to $0,0015$ e $0,0012\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). The results of this study indicate that, even at low concentrations, PVA-silver nanoparticles can induce cellular damage in exposed organisms. Due to its increasing use, these data reinforce the importance of performing studies with silver nanoparticles as part of nanostructured systems.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. JUSTIFICATIVA	1
1.2. OBJETIVOS	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA	5
2.2. NANOTECNOLOGIA NA APLICAÇÃO DE EMBALAGENS	6
2.3. MATRIZES POLISSACARÍDEAS	8
2.3.1. Carboximetilcelulose sódica (CMC)	10
2.4. NANOPARTÍCULAS	13
2.4.1. Conceitos “top-down” e “bottom-up”	13
2.4.2. Nanopartículas metálicas	14
2.4.3. Síntese de nanopartículas de prata	16
2.5. FORMAÇÃO DE FILMES	20
2.5.1. Propriedades dos filmes	22
2.6. NANOCOMPÓSITOS ANTIMICROBIANOS	25
2.7. NANOTOXICIDADE	28
2.7.1. Testes <i>in vivo</i> : utilização de sementes de <i>Allium cepa</i>	30
2.7.2. Testes <i>in vivo</i> : utilização de ratos Wistar	34
2.7.3. Ecotoxicidade em organismo aquático	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. MATERIAIS	39
3.1.1. Síntese de Nanopartículas de prata e soluções filmogênicas	39
3.1.2. Avaliação da atividade antimicrobiana	40
3.1.3. Genotoxicidade e citotoxicidade em células de <i>Allium cepa</i>	40
3.1.4. Toxicidade em ratos Wistar	41
3.1.5. Ecotoxicidade em microcrustáceo <i>Daphnia Similis</i>	41
3.2. MÉTODOS	41
3.2.1. Preparação da solução de Nanopartículas de Prata-PVA e soluções filmogênicas	42
3.2.2. Preparação dos Filmes	43
3.2.3. Caracterização das Nanopartículas de Prata-PVA e das Soluções filmogênicas	44
3.2.3.1. Espectroscopia UV-Visível (UV-Vis)	44
3.2.3.2. Análise do Tamanho médio das partículas	44
3.2.3.3. Análise do Potencial Zeta	45
3.2.4. Caracterização dos filmes	46
3.2.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/FEG)	46
3.2.4.2. Solubilidade dos filmes em água	47
3.2.4.3. Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier FT-IR	47
3.2.4.4. Permeabilidade ao vapor de água	48
3.2.4.5. Propriedades mecânicas	49
3.2.4.6. Análises Térmicas	50
3.2.4.7. Colorimetria	51
3.2.4.8. Análise estatística	52
3.2.5. Avaliação da Atividade Antimicrobiana	52
3.2.6. Avaliação da Toxicidade	55
3.2.6.1. Testes <i>in vivo</i> utilizando sementes de <i>Allium cepa</i>	55
3.2.6.2. Testes <i>in vivo</i> utilizando ratos Wistar	56
3.2.6.3. Ecotoxicidade em <i>Daphnia similis</i>	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA-PVA E SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS	61
4.1.1. Síntese de nanopartículas de prata-PVA e soluções filmogênicas	61
4.1.2. Análise de espectroscopia UV-visível da dispersão coloidal de nanopartículas de prata-PVA	62
4.1.3. Análise do tamanho das nanopartículas de prata-PVA	65

4.1.4. Análise do Potencial Zeta.....	67
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	68
4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/FEG).....	68
4.2.2. Propriedades Mecânicas.....	69
4.2.3. Solubilidade do filme em água	71
4.2.4. Análise de FT-IR	73
4.2.5. Permeabilidade ao Vapor de Água.....	75
4.2.6. Análises térmicas.....	76
4.2.7. Colorimetria	79
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	80
4.4. NANOTOXICIDADE.....	87
4.4.1. Testes <i>in vivo</i> utilizando sementes de <i>Allium cepa</i>	87
4.4.1.1. Efeitos citotóxicos	87
4.4.1.2. Efeitos genotóxicos	89
4.4.2. Testes <i>in vivo</i> utilizando ratos <i>Wistar</i>	92
4.4.2.1. Análises histopatológicas	92
4.4.2.2. Análise da concentração de prata nos órgãos.....	93
4.4.2.3. Análise da massa corpórea dos animais	98
4.4.2.4. Análise da massa dos órgãos.....	101
4.4.3. Ecotoxicidade em <i>Daphnia similis</i>	111
5. CONCLUSÕES.....	115
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
8. PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS.....	143
APÊNDICE 1.....	145

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

O revestimento de frutas e legumes com filmes tem chamado a atenção do seguimento de embalagens, principalmente como uma oportunidade promissora para a criação de novos mercados no setor. O desenvolvimento de embalagens a partir de materiais renováveis tem sido norteado por uma crescente conscientização ambiental devido às preocupações ambientais com seu descarte e acúmulo (RAHEEM, 2012). Uma das soluções encontradas para amenizar este problema, particularmente na área de embalagens de alimentos, é o desenvolvimento de filmes com fontes renováveis, com o desafio de manter a qualidade do produto, aumentando seu tempo de prateleira por meio do controle de suas propriedades mecânicas e de permeabilidade (SRINIVASA *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2009).

As embalagens são imprescindíveis para conservação de alimentos, retardando a deterioração do produto, estendendo seu tempo de prateleira e mantendo a qualidade e segurança dos alimentos. Ao fazer isso, a embalagem proporciona proteção contra três principais classes de influências externas: químicos, biológicos e físicos (MARSH e BUGUSSU, 2007).

Um dos sistemas promissores para a modificação das características de filmes poliméricos na conservação de alimentos é a incorporação de nanoestruturas aos filmes (MOURA *et al.*, 2009). Há disponíveis no mercado vários produtos com a aplicação de nanopartículas metálicas, envolvendo diversas áreas como: produtos com atividade antimicrobiana, catálise, tecnologia de displays, armazenamento de dados, detecção e obtenção de imagens de células cancerígenas e tumores entre outras (RAO e CHEETHAM, 2001; TEMPLETON *et al.*, 2000; PITKENTHLY, 2003).

Dentre as nanopartículas metálicas, as de ouro e prata são as mais estudadas, apresentando características intrínsecas, como estabilidade química (NOGUEIRA et al., 2004; VANDEN, 2002; PAN et al., 2005; IMAI et al., 1998). As nanopartículas de prata merecem destaque devido ao seu efeito bactericida para uma vasta gama de microrganismos (MANEERUNG et al., 2008; SAVI et al., 2013; RAI et al., 2012; DURAN et al., 2007), possuem propriedades antissépticas, sua relativa facilidade em formar estruturas pouco convencionais, como nanoprismas (ANJANA SARKAR et al., 2005; JIN et al., 2001; SUN et al., 2003), bem como a possibilidade do controle de novas morfologias, sendo alvo de estudo no desenvolvimento de aplicações que previnam a ação de microrganismos.

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), em parceria com o movimento ‘Save Food’, ambos com o objetivo de redução de perdas de alimentos e apoio a sustentabilidade, estimam que cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos se perdem ou são desperdiçados a cada ano, o que corresponde a um bilhão de dólares. Infraestrutura, embalagem, transporte e armazenamento deficientes são os responsáveis pelas perdas pós-colheita. As novas tecnologias, melhores práticas, a coordenação e os investimentos em infraestrutura - desde a produção de alimentos até o consumidor final - são fundamentais para a redução das perdas e do desperdício de alimentos (SOLEIMANPOUR et al., 2013).

Muita pesquisa tem sido realizada a fim de explorar o potencial de filmes, comestíveis ou não, para manter e estender a qualidade e a vida útil de produtos frescos. Os filmes são uma fina película formada separadamente do alimento e depois aplicada sobre ele. Esses filmes podem sofrer modificações com o intuito de melhorar suas propriedades e desempenho (KROCHTA e DEMULDER, 1997).

Nesse contexto, o desenvolvimento da nanotecnologia tem sido apontado como uma nova revolução tecnológica, que, em ritmo acelerado de

crescimento, está modificando a aplicação de diversos produtos e têm levado a eventos de contato de nanopartículas e nanoestruturas com organismos vivos, em situações ainda não compreendidas plenamente. Muitos destes eventos podem potencialmente ocorrer no meio agrícola, devido ao grande número de aplicações da Nanotecnologia desenvolvido neste enfoque. Atualmente, a Embrapa Instrumentação coordena uma Rede de Pesquisa em Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio (Rede AgroNano), cujo objetivo é explorar as aplicações da nanotecnologia no agronegócio em vários estágios, desde a produção agrícola até o beneficiamento e desenvolvimento de produtos para o consumo.

Assim, o presente trabalho busca a alteração das propriedades de filmes polissacarídeos com potencial uso na indústria de embalagens de alimentos pela inserção de materiais nanoestruturados. Além disso, é importante avaliar a atividade antimicrobiana desses filmes, sendo o crescimento microbiano na superfície do alimento sua causa mais comum de deterioração. Torna-se importante também avaliar o impacto desses novos materiais em organismos vivos, tanto em modelos animais quanto vegetais, colaborando com metodologias de avaliação e com o conhecimento do potencial impacto destes materiais após o descarte.

1.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes de carboximetilcelulose com nanopartículas de prata e avaliar se, mesmo em baixas concentrações, a incorporação dessas nanopartículas na CMC apresenta atividade antimicrobiana e toxicidade.

Para isto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Sintetizar de nanopartículas de prata e incorporação em matriz polimérica de carboximetilcelulose obtendo-se soluções filmogênicas e filmes (casting);
- Caracterizaras nanopartículas e os filmes incorporados com as mesmas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das soluções e filmes de carboximetilcelulose com e sem nanopartículas de prata, através dos testes de halo de inibição e Concentração Mínima Inibitória (MIC);
- Avaliar a toxicidade dos sistemas nanoestruturados em modelo vegetal, através da investigação das potencialidades citotóxicas (morte celular e índice mitótico) e genotóxicas (presença de alterações cromossômicas) de soluções filmogênicas de carboximetilcelulose incorporadas com nanopartículas de prata, em células meristemáticas de *Allium cepa*;
- Avaliar a toxicidade dos sistemas nanoestruturados em modelo animal, através da Concentração Efetiva 50% em microcrustáceo *Daphnia Similis*, e do estudo histopatológico e quantificação de prata em ratos Wistar através da ingestão em doses repetidas durante 28 dias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nanociência e Nanotecnologia

Na década de 90, na maioria dos países ricos, a nanotecnologia destacou-se como área estratégica de investimentos e avanços em pesquisas e aplicações industriais, sendo suscetível ao impacto de várias áreas da ciência, tais como química, física, biologia e engenharia (MONCADA, 2007).

Os conceitos de nanociência e nanotecnologia foram propostos pela Royal Society and Royal Academy of Engineering (2004): nanociência é o estudo dos fenômenos envolvendo moléculas e materiais com tamanho entre 1 e 100 nm; nanotecnologia baseia-se na utilização desses materiais de modo a obter estruturas com propriedades e funções específicas.

Um nanomaterial é definido como um material com uma ou mais dimensões externas em nanoescala (1 a 100 nm), podendo variar em relação ao seu tamanho, forma, área superficial e composição química (DURAN et al., 2006). De acordo com a ABDI- Agência Brasileira do Desenvolvimento Industrial (2010) existem diferentes classes de nanomateriais: Nanomateriais estruturais (nanocompósitos); Nanobjetos (nanotubos, nanofios, nanopartículas); Revestimentos nanoestruturados (filmes finos) e Nanomateriais semicondutores e magnéticos (micro-filme) (CHAUDHRY et al., 2010).

Em relação ao termo 'nanopartícula', o "*Chemical Selection WorkingGroup*", pertencente à Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration – FDA*), atualmente define nanopartículas como "partículas com dimensões menores que um micrômetro que exibem propriedades não reconhecidas em partículas maiores" (SCOTT e CHEN, 2012).

Os materiais em escala nanométrica apresentam dificuldades de caracterização em relação ao seu pequeno tamanho e homogeneidade. Com isso,

o desenvolvimento da Nanociência e Nanotecnologia envolve domínio científico e tecnológico de ferramentas de pesquisa que possam medir e manipular a matéria na escala nanométrica, onde podemos destacar técnicas como microscopia eletrônica, espectroscopia, difração de raios-X, entre outras (VINCENZO, 2005).

A descoberta de materiais com novas propriedades ou mesmo a melhoria de propriedades já existentes em materiais convencionais abriram um imenso campo de aplicações tanto industriais, quanto tecnológicas e científicas, tornando-se cada vez maior a facilidade na obtenção de nanomateriais e no controle de suas propriedades.

2.2. Nanotecnologia na aplicação de embalagens

A aproximação cada vez mais estreita entre ciência e tecnologia reporta a imagem de que está por vir uma radical transformação no âmbito da agricultura e na indústria agroalimentar, com a introdução de novas práticas de manejo no campo, inovações na fabricação de insumos agroquímicos, melhoria nos processos de transporte e embalagens de produtos (MARTINS e RAMOS, 2009).

Os alimentos mantêm-se em constante atividade biológica, manifestada por alterações de natureza química, física ou microbiológica, que levam à sua deterioração. A perda de qualidade leva a um limite de aceitabilidade do produto, que está associado à sua vida de prateleira. Este termo pode ser definido como o período de tempo decorrido entre a produção e o consumo de um produto alimentício, no qual a aceitabilidade do produto pelo consumidor é mantida, verificando-se um nível satisfatório de qualidade no produto. Esta qualidade pode ser avaliada por características gerais de aparência e parâmetros organolépticos (sabor, odor, cor e textura) (SARANTOPOULOS et al., 2002). As embalagens de alimentos representam 50% do mercado mundial

de embalagens e são responsáveis por quase dois terços do total de resíduos de embalagens (MARSH e BUGUSU, 2007). Para atender às necessidades do mercado consumidor, estão sendo desenvolvidas as embalagens ativas, que mudam a condição do alimento embalado, de modo a estender seu tempo de vida, mantendo a qualidade do produto final.

Materiais de embalagens de alimentos é a maior categoria de aplicações e pesquisa da nanotecnologia para o setor alimentício. Os principais desenvolvimentos na área de embalagens/nanotecnologia incluem: embalagens ativas contendo nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas; incorporação de nanomateriais que modifiquem as propriedades da embalagem e embalagens inteligentes de alimentos com incorporação de nanosensores para monitoramento das condições do alimento (GREINER, 2009).

O uso de materiais naturais para a embalagem dos alimentos é uma alternativa ambientalmente correta, pois reduz a exigência de utilização de plásticos como materiais de embalagem, apresentando uma modificação das mesmas, protegendo o alimento e aumentando a sua vida útil (RAHEEM, 2012; CAO et al., 2009; YAKIMETS et al., 2007). Pesquisas na área nanotecnológica vêm sendo realizadas para melhoria das propriedades dos materiais para que os produtos desacelerem sua deterioração e as embalagens avisem quando os produtos estiverem em deterioração. Mas até o momento, o maior desafio é produzir em escala industrial e minimizar os custos com matéria-prima.

O setor de embalagens movimenta anualmente 500 bilhões de dólares, aproximadamente, e a estimativa de investimentos em pesquisa na área de nanotecnologia movimenta 385 milhões de dólares. Em 2015, estima-se que os investimentos na área da nanotecnologia ficarão em torno de 1 trilhão de dólares (GASPARIN, 2010).

Recentemente, tem aumentado a utilização de nanopartículas como aditivos para melhorar o desempenho e as propriedades de embalagens de alimentos. Entre os primeiros nanocompósitos a emergir no mercado foram

compósitos de polímeros contendo nanopartículas de argila (WANG et al., 2003; SCRINIS e LYONS, 2007; BAE et al., 2009), apresentando excelentes propriedades térmicas e mecânicas, estabilidade à umidade e resistência à água e ao calor.

Utilização de nanofibras de celulose (MOHANTY et al., 2013) e nanopartículas de quitosana em matriz polimérica (AOUADA, 2009) também têm sido estudadas. Segundo MOORE (2009), filmes de poliamidas já foram comercializados com propriedades de barreira a gás devido a aditivos em nanoescala.

2.3. Matrizes polissacarídeas

Embora o uso de revestimentos, comestíveis ou não, em produtos alimentícios possa parecer recente, sua aplicação vem ocorrendo há anos. Durante os séculos XII e XIII, realizou-se o recobrimento de frutos como limão e laranja com cera, na China, com a finalidade de retardar a perda de umidade (DONHOWE; FENNEMA, 1994). No século XIX, outro processo semelhante foi desenvolvido com o recobrimento de alimento com gelatina (GUILBERT, 1986).

São três as principais classes de componentes utilizadas como matrizes: polissacarídeos, proteínas e lipídios. Polissacarídeos incluem derivados de celulose, alginato, amido, pectina, entre outros. Os lipídios são compostos por ceras, glicerol e ácidos graxos (CAMPOS et al., 2010).

A indústria de alimentos é um dos principais consumidores de polissacarídeos, onde estes são aplicados primordialmente como espessantes ou agentes de suspensão e geleificantes. Os polissacarídeos são importantes também por seus efeitos secundários, que incluem emulsificação, estabilização de emulsões, controle de cristalização, inibição de sinerese, encapsulação e formação de filmes. Apresentando alta massa molecular, formam soluções

coloidais, quando em contato com o solvente apropriado, produzindo géis, mesmo em baixas concentrações, onde cada molécula do polissacarídeo liga-se a uma grande quantidade de água, graças ao alto número de grupos hidroxila presentes na molécula (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

Os polissacarídeos constituem uma matriz com propriedades mecânicas moderadas. Sendo hidrofílicos, apresentam uma barreira eficiente contra compostos de baixa polaridade, como lipídios. No entanto, apresentam baixa barreira à umidade (PINHEIRO, 2010). A fim de se resolver essa deficiência, diferentes estudos envolvem a mistura de diferentes polímeros, a modificação química da estrutura do polímero e a adição de materiais hidrofóbicos (TABELA 2.1).

TABELA 2.1: Resistência à tração de alguns filmes, comestíveis ou não, utilizados na embalagem de alimentos.

Tipo de filme	Resistência à Tração (MPa)	Autor
Polietileno de alta densidade	43	DOAK, 1986
Polietileno de baixa densidade	24	DOAK, 1986
Purê de manga	1,2	SOTHORNVIT e RODSAMRAN (2008)
Amido manga (50% glicerol)	19	ROMERO-BATISTA et al., 2005
Amido banana (50% glicerol)	25	ROMERO-BATISTA et al., 2005
Blenda Pectina/Amido	1,8	MOREIRA, 2010
Blenda Pectina/Amido/Nanofibras de celulose	4,6	MOREIRA, 2010

A utilização de lipídios em matrizes poliméricas deve-se à sua excelente barreira à umidade; entretanto, apresentam algumas desvantagens no que se refere a estabilidade (susceptibilidade a oxidação) e características sensoriais (sabor e textura, muitas vezes desagradáveis). Os revestimentos à base de proteínas têm geralmente boas propriedades mecânicas e de barreira; entretanto, a baixa resistência ao vapor de água limita a sua aplicação (BOURTOOM, 2009).

As matrizes sintéticas têm originado sérios problemas ambientais, devido a sua eliminação final, onde a produção mundial de plástico chegou aos 265 milhões de toneladas em 2010, sendo que o seu consumo continua a aumentar (PLASTICS EUROPE, 2011). Nesse contexto, as pesquisas em matrizes oriundas de materiais renováveis têm sido intensas.

Os polissacarídeos representam a fração de biopolímeros mais abundante, considerando-se o amido, a celulose e a quitina em proporções preponderantes (BRITO, 2011), além de serem disponíveis em todo mundo, acarretando baixo custo destas fontes renováveis se comparadas a outras matérias-primas. Essa classe de biomateriais é muito diversa e altamente versátil em virtude da facilidade em se fazer modificações nas suas moléculas naturais, apresentando melhoria na sua aplicação final.

A carboximetilcelulose (CMC) é um éter derivado de celulose, normalmente apresentada na forma de sal de sódio, sendo um polímero aniônico, solúvel em água em baixas concentrações, sendo fácil a obtenção de filmes. Nas concentrações nas quais é utilizada não causa interferência nas propriedades organolépticas do produto a ser embalado, sendo fisiologicamente inerte, atóxico e largamente aplicada nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

2.3.1. Carboximetilcelulose sódica (CMC)

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo normalmente considerado uma fonte quase inesgotável de matérias-primas (KOSCHELLA et al., 2012). A sua estrutura molecular forma-se pela união de moléculas de β -glicose, através de ligações β -1,4-D-anidroglicose, levando à formação de uma cadeia linear, na qual se estabelecem múltiplas ligações por pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila das unidades de glicose adjacentes. Estas ligações e a regularidade espacial dos grupos favorecem a coesão entre as cadeias, permitindo a formação de estruturas supramoleculares

altamente organizadas, traduzindo-se na insolubilidade da celulose (REDDY et al., 2013); WYMAN et al., 2005; KLEMM et al., 2005).

A modificação química da celulose permite obter derivados solúveis em solventes variados, de grande interesse e com inúmeras aplicações, como os éteres de celulose. Isto, aliado ao fato de ser obtida de fonte renovável, faz com que a celulose seja considerada por muitos como a matéria-prima do futuro, ampliando os usos já estabelecidos da área de papel e celulose (BARTHEL e HEINZE, 2006).

Os três grupos hidroxila presentes na unidade de anidroglicose podem ser parcialmente ou totalmente substituídos para a formação de derivados, fazendo com que o grau médio de substituição (GS) das hidroxilas varie de 0 a 3. Como exemplos de derivados de celulose têm-se os ésteres de celulose (acetato de celulose, triacetato de celulose, acetato de celulose e butirato) e éteres de celulose (metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, etilcelulose, hidroxietilmetilcelulose, carboximetilcelulose, e hidroxietilcelulose). Várias destas formas modificadas de celulose são importantes em embalagens de alimentos (PEELMAN et al., 2013; ALLSOPP et al., 2004).

A carboximetilcelulose apresenta as seguintes vantagens: pode ser produzida à pressão atmosférica (diferentemente da maioria dos éteres de celulose); a presença de grupos carboxilatos lhe confere solubilidade em água quando o grau médio de substituição (GS) é maior que 0,5 e pode ser obtida a partir de biomassa abundante e barata, como o bagaço da cana-de-açúcar proveniente de usinas de açúcar e álcool (MORAES e CAMPANA FILHO, 1999). A FIGURA 2.1 representa esquematicamente a obtenção da carboximetilcelulose (CMC).

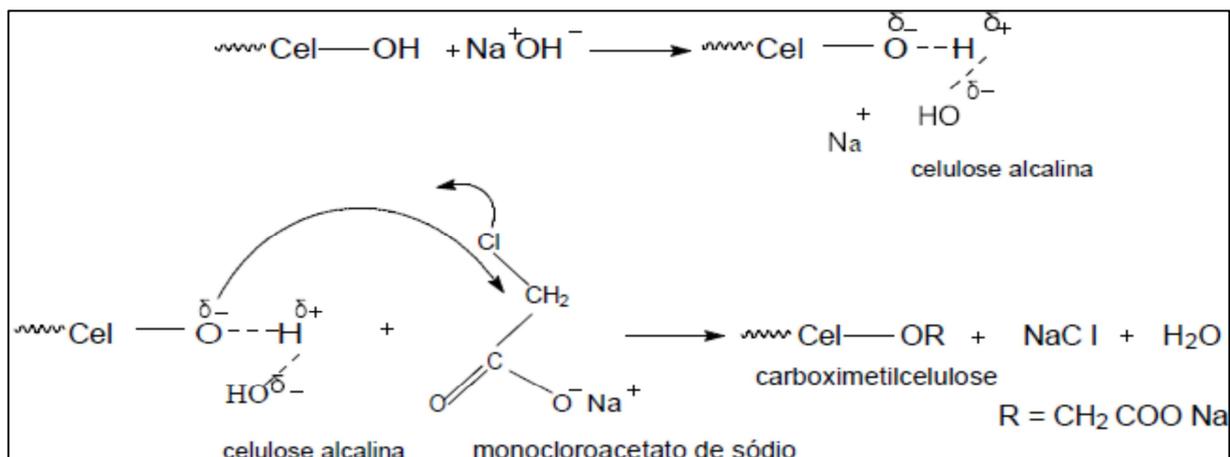


FIGURA 2.1: Reação esquemática de obtenção da carboximetilcelulose de sódio.
 Fonte: CERRUTI, 2010.

A CMC foi sintetizada pela primeira vez em 1918 por Jensen, sendo produzida comercialmente em 1920 na Alemanha, seguido pelo aperfeiçoamento do processo tecnológico com otimização das condições de síntese desse derivado (HEINZE e KOSCHELLA, 2005). No Brasil, a CMC é produzida comercialmente como sal de sódio pela empresa Denver (Grupo Formitex), sendo sua produção destinada especificamente à indústria alimentícia. Apresenta propriedades sensoriais neutras e geralmente é utilizada como espessante em sorvetes, sucos e molhos. A CMC comercial normalmente tem grau de substituição (GS) entre 0,4 e 1,0 e pureza superior a 99,5% (BARBA et al., 2002). Esse polímero pode ainda ser utilizado para confecção de filmes e revestimentos comestíveis.

BANKS (1984) aplicou um revestimento de éster de sacarose e carboximetilcelulose em bananas verdes, verificando redução da permeabilidade ao oxigênio e ao dióxido de carbono em 5 e 2 vezes, respectivamente, quando comparados com bananas não revestidas. Estes resultados indicam que o revestimento é diferencialmente permeável ao oxigênio e ao dióxido de carbono. Resultados semelhantes foram encontrados por BALDWIN *et al.* (1995) em laranjas e MEHERIUK & LAU (1988) em peras, com a utilização de filmes

comestíveis de CMC, retardando o amadurecimento dos frutos através da diminuição do transporte de gases.

GHANBARZADEH et al. (2010) estudaram os efeitos de adição de carboximetilcelulose sobre as propriedades físicas em filmes de amido. O filme composto por 15%, m/m, CMC/amido, mostrou uma redução na permeabilidade ao vapor de água e um aumento na resistência à tração em mais de 59% (11,2 mPa) quando comparado à película de amido puro (7 mPa), sem decréscimo significativo na deformação do filme.

SU et al. (2010) observaram a melhoria nas propriedades mecânicas e de barreira em blendas de proteína de soja/carboximetilcelulose em comparação a filmes contendo somente proteína de soja.

2.4. Nanopartículas

2.4.1. Conceitos “*top-down*” e “*bottom-up*”

Partículas de tamanho nanométrico, ao se comparar com partículas do mesmo elemento químico de tamanho micrométrico ou maiores, comportam-se de forma distinta em relação aos materiais em escala macroscópica, chamado de *bulk* (fase volume) (AHMADI et al., 2007). Devido ao tamanho e razão superfície/volume serem muito elevadas, em nanopartículas as propriedades dos materiais nesta escala são diferentes, como as propriedades óticas, resistência dos materiais, condutividade elétrica, etc (TIEDE, 2008; GREINER, 2009). Assim, o tamanho das partículas é de suma importância em relação aos efeitos que podem surgir: mudando a natureza das interações das forças entre as moléculas do material mudam os impactos que esses produtos podem causar ao meio ambiente e à sociedade como um todo.

Duas são as rotas de obtenção de nanopartículas, com variados níveis de qualidade e velocidade: *Top-down* (cima para baixo) e *bottom-up*

(baixo para cima)(FIGURA 2.2). A técnica *Top-down* envolve métodos físicos, como co-evaporação, sonólise, nanolitografia, entre outros, e tem por objetivo reproduzir algo, porém em menor escala que o original, quebrando-se as partículas até sua escala nanométrica (YU et al., 2013; PATTEKARI et al., 2011; NATH e CHILKOTI., 2004; SINGH et al., 2002; PYATENKO et al., 2004). Os métodos químicos ou coloidais (*bottom-up*) proporcionam a formação de nanopartículas átomo a átomo ou molécula a molécula, sendo os preferidos por serem mais simples, possibilitarem um maior controle sobre todo o processo e a possibilidade de obtenção de nanopartículas em tamanho inferior em relação ao processo *top-down*. Têm como base a ocorrência de reações químicas e utilizam precursores moleculares ou atômicos para a obtenção das nanopartículas desejadas (LELEUX e WILLIAMS, 2013; SINGH et al., 2011; ZHANG e HAM, 2003).

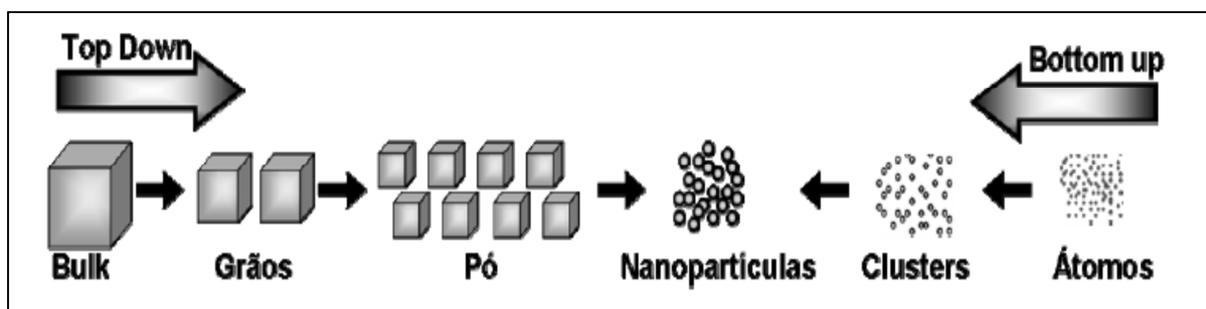


FIGURA 2.2: Esquema ilustrativo dos métodos de obtenção de nanopartículas: Top-down e bottom-up.

Fonte: GORUP, 2010.

2.4.2. Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas sintéticas encontram-se entre nós há muito tempo. Pesquisas mostram exemplos do seu uso como pigmentos decorativos em antigos artefatos, como o famoso cálice de Lycurgus e esculturas feitas pelos romanos. Estes continham pigmentos azuis provenientes de

nanopartículas de óxidos e metais, como ouro e prata (FREESTONE et al. 2007; YACAMAN et al., 1996; LIZ-MARZÁN, 2004).

Nanopartículas de alguns metais, como ouro, prata e cobre, mostram absorções bem definidas em regiões distintas do espectro visível, denominadas bandas *plasmon*. Estas bandas são decorrentes da alta razão superfície/volume destas nanopartículas e ocorrem devido à oscilação coletiva dos elétrons de condução em resposta à excitação óptica promovida pela aplicação de um campo eletromagnético. Os efeitos da forma, tamanho da partícula, distribuição do tamanho e o meio onde as nanopartículas estão dispersas afetam o comprimento de onda e a intensidade dessas bandas (WANG et al., 2010; GHOSH e PAL, 2007; MCCLARY et al., 2013).

Desde o século XIX, ocorreu um grande progresso na síntese, modificação e caracterização de nanopartículas usando-se uma ampla variedade de solventes e substratos. Os cientistas procuram compreender como a forma, tamanho e organização afetam as propriedades físicas e químicas das nanopartículas (SCHMID, 1992).

Um método utilizado na síntese de nanopartículas metálicas, como ouro, prata e platina é conhecido como o método do Citrato ou Método de Turkevich, reportado por alguns autores (GORUP et al., 2011; CASSAGNEAU e FENDLER, 1999; PILLAI e KAMAT, 2004; HE et al., 2013). TURKEVICH et al. (1951) propuseram este método para o preparo de colóides de ouro e foi rapidamente aplicado para síntese de outros metais como prata, ródio e platina. Este método tem como base uma reação de oxidação-redução em meio aquoso entre o citrato e o sal metálico. Para os sais de ouro, a reação pode ser realizada a temperatura ambiente, enquanto para os demais sais, como prata e platina, é necessário um incremento na temperatura. Na literatura outro método comumente utilizado na síntese de nanopartículas de prata é o método do borohidreto, em que este é utilizado como agente redutor de sais metálicos (SUCHOMEL et al., 2011; BEN MOSHE e MARKOVICH, 2011).

2.4.3. Síntese de nanopartículas de prata

No presente trabalho, utilizou-se na síntese de nanopartículas de prata o método *bottom-up* de redução química de um sal de prata (AgNO_3) com borohidreto de sódio (NaBH_4). A reação química pode ser expressa segundo a Equação 2.1.



Em geral, este método apresenta vantagens sobre o método do citrato, como podem ser observadas na TABELA 2.2.

TABELA 2.2: Comparativo entre os métodos do citrato e do borohidreto na síntese de nanopartículas de prata-PVA.

Método / Tópicos	Nível de Dificuldade (síntese)	Nível de controle de variáveis	Estabilidade em solução aquosa (pura)	Estabilidade em meios poliméricos de alta viscosidade	Tamanho das partículas
Citrato	Alto	Alto	Baixa	Alta	35-50 nm
Borohidreto	Baixo	Médio	Alta	Alta	5-15 nm

Dentre as inúmeras rotas de síntese de nanopartículas de prata, a mais simples e convencional é a feita em solução e envolve os seguintes componentes: metal precursor, agente redutor e agente estabilizante. O mecanismo de formação da solução coloidal, a partir da solução de íons prata (I) consiste em duas etapas: nucleação e crescimento (FIGURA 2.3). O tamanho e a forma das nanopartículas dependem da taxa relativa entre esses processos, que podem ser controlados por meio do ajuste de alguns parâmetros da reação: concentração dos reagentes envolvidos, temperatura do processo, relação estequiométrica e pH (GARCIA-BARRASA et al., 2011).

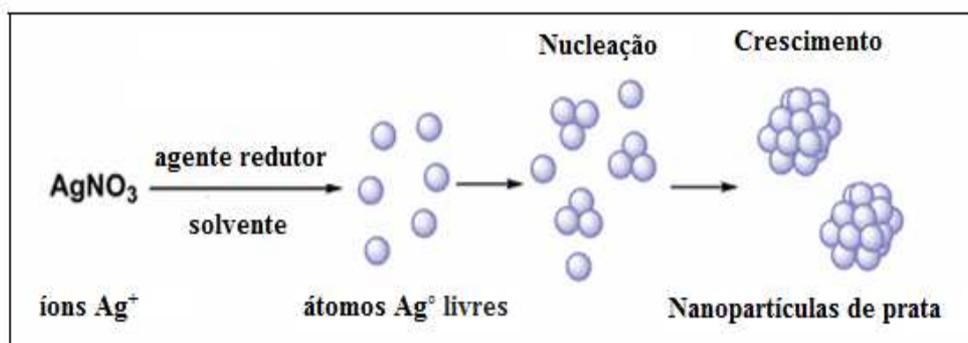


FIGURA 2.3: Mecanismo de formação de nanopartículas de prata-PVA por meio da redução química utilizando o agente redutor borohidreto de sódio.

Fonte: GARCIA-BARRASA et al., 2011.

A síntese de nanopartículas de prata em solução requer o uso de métodos que permitam um controle de tamanho e forma das nanopartículas para produzir um conjunto de nanopartículas monodispersas, apresentando uma propriedade específica. As nanopartículas dispersas em um solvente levam à formação de uma solução coloidal, onde a fase dispersa é formada pelas partículas em escala nanométrica (BRUST e KIELY, 2002; PILLAI e KAMAT, 2004; PILENI, 1998).

Na síntese de nanopartículas de prata, o processo de agregação pode competir com o crescimento, modificando a distribuição de tamanho das partículas do sistema. Pode-se observar que a aglomeração de pequenas partículas em uma solução é praticamente inevitável, mesmo a longas distâncias, estando sujeitas às forças de atração, como forças de Van der Waals. Este crescimento visa a diminuição da energia total do sistema. As diferentes interações entre a fase sólida dispersa (partículas) e a de fase líquida (solvente) constituem um dos pontos críticos da estabilidade dos colóides (GUOZONG, 2004; MAFUNE et al., 2000; SONDI et al., 2003).

Devido à dificuldade em se isolar cada etapa do mecanismo de formação da solução coloidal para seu estudo independente, seus mecanismos ainda não estão completamente elucidados. Dessa forma, a aglomeração de pequenas partículas de uma solução pode ser evitada com o uso de

estabilizantes, mantendo a estabilidade da solução (RATYAKSHI e CHAUHAN, 2009). Nanopartículas produzidas por diferentes processos e para diferentes propostas podem variar sua carga da superfície e seu estado de aglomeração (SANT et al., 2007).

A necessidade de uma maior estabilidade da solução tem impulsionado o desenvolvimento de alternativas de síntese. Dentre essas, destacam-se a utilização de tióis, devido às fortes ligações covalentes que se estabelecem entre a superfície metálica e estes ligantes, introduzida por SCHMID et al., (1981) que permitiram a obtenção de nanopartículas de ouro estabilizadas com fosfinas em reações de troca de ligantes.

Existem dois mecanismos de estabilização de dispersões coloidais, a fim de evitar o crescimento descontrolado das partículas e produzir nanopartículas com boa dispersão na fase líquida: estabilização de nanopartículas por interações eletrostáticas e por efeito estérico. No primeiro caso, as nanopartículas repelem-se por possuírem as superfícies eletricamente carregadas e no segundo há a presença de grandes moléculas ligadas à nanopartícula, conhecida como camada passivadora, evitando o contato das mesmas (CUSHING et al., 2004; HYNING et al., 2001).

No caso de nanopartículas metálicas, grande parte dos trabalhos nesta área utiliza-se da estabilização estérica, onde vários compostos podem ser utilizados como passivantes, incluindo polímeros, moléculas contendo grupos terminais -SH, -CN, -NH₂. A classe mais utilizada é a dos tióis de cadeia longa (MURRAY et al., 2000; YONEZAWA et al., 2001; TAN et al., 2003; MALLICK et al., 2004; PATAKFALVI et al., 2004). Alguns trabalhos mostram a síntese de nanopartículas sendo estabilizadas somente por meio de interações eletrostáticas (EVANOFF e CHUMANOV, 2004; Li et al., 2003), mas é importante ressaltar que esse método para inibição de aglomeração não é o mais indicado, sendo que tal inibição não é resistente a mudanças em uma ampla faixa de pH.

Neste trabalho, utilizou-se o poli (álcool vinílico) (PVA) como agente de estabilização. O PVA é um polímero de estrutura química relativamente simples com grupos hidroxila laterais, conforme a FIGURA 2.4. É muito utilizado nas indústrias alimentícias, farmacêutica e cosmética, devido às suas propriedades de barreira contra umidade, oxigênio e outros agentes externos e possuir risco nulo à saúde.

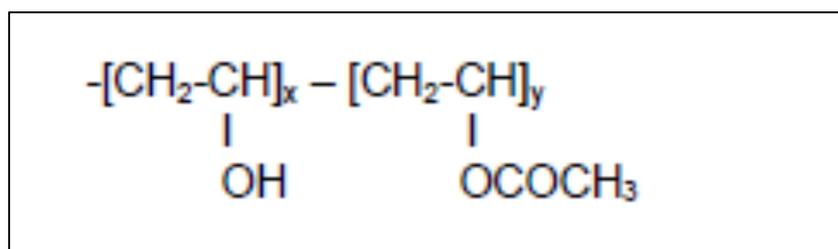


FIGURA 2.4: Estrutura do PVA: x corresponde a 88-99 mol% e y a 1-12 mol%.

Alguns autores utilizaram o PVA como agente estabilizante na síntese de nanopartículas de prata (NETO, 2010; MBHELE et al., 2003). A interação de nanopartículas de prata com o poli (álcool vinílico) ocorre por meio dos grupos –OH.

O PVA comercial é uma mistura de estruturas estereoquímicas diferentes (isotático, sindiotático e atático), sendo obtido por hidrólise dos grupos acetato do poli (acetato vinila). Suas propriedades físico-químicas são altamente dependentes dos métodos de preparação. A funcionalidade do poli (álcool vinílico), ou seja, o número de funções –OH presentes na substância é denominado grau de hidrólise. O grau de hidrólise é o fator principal que determina a cristalinidade do PVA e suas características de solubilidade (BASSNER e KLINGENBERG 1998).

O PVA com grau de hidrólise de 98,5% ou maior possui um elevado número de hidroxilas levando à formação de ligações de hidrogênio fortes entre grupos hidroxila intra e intermoleculares, impedindo sua solubilização em água a frio. Em contrapartida, os grupos acetatos residuais são

essencialmente hidrofóbicos e enfraquecem as ligações intra e intermoleculares dos grupos hidroxila vizinhos. Assim é necessário o aquecimento de uma solução de PVA para sua completa solubilização (COELHO, 2012).

Com o aquecimento, durante a solubilização, as ligações de hidrogênio são rompidas pela energia térmica, aumentando a solubilidade do PVA. Embora este tipo de ligação tenha uma força inferior às ligações químicas, as várias ligações de hidrogênio formadas ao longo da cadeia possuem uma forte energia de ligação associada a elas. Com o resfriamento, as ligações de hidrogênio rearranjam-se, aumentando a viscosidade da solução e criando uma estrutura de gel (WANG *et al.*, 2004).

O PVA é adicionado a fim de promover um aumento na estabilidade da suspensão coloidal. Este estabilizante contém átomos de oxigênio em sua estrutura, que atuam como centros básicos de Lewis, favorecendo a interação ácido-base entre o polímero e as nanopartículas. As cadeias orgânicas suficientemente compridas do PVA criam um impedimento estérico quando adsorvido nas superfícies das nanopartículas presentes no meio reacional, evitando interações entre as mesmas.

As nanopartículas de prata obtidas em solução, pela redução dos íons prata, podem ser posteriormente utilizadas para obtenção de sólidos por meio da sua incorporação em uma matriz polimérica, por exemplo. Assim, temos a formação de filmes, que está descrita a seguir.

2.5. Formação de filmes

Os filmes são películas pré-formadas que podem ser utilizados para envolver o alimento. As características requeridas do filme dependem, principalmente, da característica do produto. Frutas e hortaliças frescas requerem filmes que permitam uma transferência moderada de vapor de água para reduzir a respiração e evitar processos degradativos (AZEREDO, 2003).

Uma alternativa para a modificação das propriedades dos filmes à base de biopolímeros é a utilização de nanopartículas como reforço, produzindo-se dessa forma um tipo de material denominado nanocompósito. Assim como acontece nos compósitos tradicionais, um dos componentes serve como matriz, na qual as partículas do outro material se encontram dispersas (KUMARI et al., 2010). Espera-se assim que cada fase contribua com uma propriedade do produto final, sinergicamente à matriz.

Na maioria dos filmes, a matriz é constituída por um polímero de cadeia longa. Estruturas desse tipo são necessárias para formar uma matriz filmogênica com força de coesão apropriada quando dispersa em solvente adequado. Este poder coesivo do filme é descrito pela estrutura química e polimérica do sistema e do solvente e, quanto maiores a polaridade e o comprimento da cadeia polimérica, maior a coesão, devido à maior probabilidade de ligações de hidrogênio intermoleculares e interação iônica entre as cadeias (KESTER e FENNEMA, 1986).

O filme pode ser formado em suportes próprios, com forças de adesão atuando entre o filme e o suporte. Entre os materiais que constituem os suportes, os mais citados na literatura são: acrílico (MOURA et al., 2011; FONSECA, 2012), vidro (OUSSALAH et al., 2006) e poliestireno (AUDIC e CHAUFER, 2005).

Uma técnica muito utilizada para a formação de filmes não fixos é o processo conhecido casting. Esta técnica consiste na aplicação da solução filmogênica em uma superfície não adesiva (suporte) e posterior evaporação do solvente. Após isso, o filme seco pode ser facilmente desprendido do suporte (GONTARD et al., 1994).

As condições ambientais durante a formação dos filmes podem influenciar nas propriedades finais do filme. A aplicação da solução filmogênica em um suporte quente produz filmes mais coesos. Entretanto, temperaturas demasiadamente altas, resultando em excessiva taxa de evaporação do solvente

durante a secagem do filme, podem imobilizar de forma prematura as moléculas do polímero para se unirem num filme contínuo. Isto acarretará na formação de um filme defeituoso, com cavidades ou espessuras não uniformes, aumentando a permeabilidade do filme (BANKER, 1966).

A escolha do solvente na dispersão do polímero também pode acarretar alterações estruturais nos filmes. Um solvente é considerado adequado quando os valores dos parâmetros de solubilidade do polímero e solvente forem semelhantes. Neste caso, as moléculas poliméricas apresentam-se em uma conformação na forma expandida. Na fase de evaporação do solvente, ocorre um aumento na concentração da dispersão, fazendo com que as forças intermoleculares das moléculas poliméricas tornem-se mais eficazes, resultando em um filme com estrutura resistente e densa, devido ao entrelaçamento das cadeias (AOUADA, 2009).

Para ter uma metodologia de comparação entre diferentes formulações de filmes, torna-se importante manter alguns parâmetros constantes no modo de preparação do filme, como temperatura, solvente, tempo de evaporação e suporte, pois o processamento pode influenciar nas propriedades dos filmes.

2.5.1. Propriedades dos filmes

O uso de filmes em embalagens de alimentos deve apresentar os seguintes requisitos: boa aceitabilidade sensorial, propriedades de barreira e mecânicas adequadas, estabilidade térmica, solubilidade, não-polvente, de processamento simples, de baixo custo e apresentem certa transparência. Os filmes também não devem causar alterações no sabor do alimento (DEBEAUFORT *et al.*, 1998).

O conteúdo de umidade em produtos alimentícios pode comprometer seriamente a qualidade, estabilidade e segurança microbiológica

dos mesmos. A perda de água em produtos armazenados resulta em perda de massa e, conseqüentemente, perda de qualidade, devido a alterações na sua textura. Uma quantidade mínima na perda de água pode ocorrer, sendo necessário evitar aquela que ocasione um enrugamento do produto (DONHOWE e FENNEMA, 1994).

A migração de vapor através de uma membrana pode ocorrer de duas maneiras: difusão capilar e difusão ativa. A capilaridade ocorre em materiais porosos ou com alguma imperfeição (fissuras). A difusão ativa ocorre pela absorção (solubilização) do vapor penetrante em um lado do filme, sua difusão e posterior dessorção do lado oposto do filme. Este último mecanismo ocorre em filmes comestíveis e o parâmetro que define a velocidade do processo é a permeabilidade. Em um meio contínuo homogêneo, a permeabilidade é o produto da difusividade (D) e coeficiente de solubilidade (S), que representam a mobilidade das moléculas do permeado através do polímero e a concentração do permeante no interior do filme, respectivamente, em equilíbrio com a concentração da fase externa. No caso específico do vapor d'água, a concentração na fase gasosa é definida em termos da pressão parcial de vapor e a solubilidade é obtida por meio de isotermas de sorção de equilíbrio (McHUGH e KROCHTA, 1994).

As propriedades hidrofílicas dos filmes sintetizados a partir de polissacarídeos são responsáveis pela sua baixa barreira ao vapor de água. Esta hidrofiliçidade é uma das desvantagens deste tipo de revestimentos e filmes, já que muitas vezes é necessário um controle da transferência de vapor de água. Dessa forma, torna-se necessária a melhoria deste parâmetro.

Para preservar a integridade do filme, é necessário que o mesmo apresente boas propriedades mecânicas. Um filme deve suportar as tensões mecânicas encontradas durante sua aplicação, manuseio e transporte. Assim, os filmes devem apresentar uma certa resistência à ruptura e flexibilidade, que permitam sua deformação sem causar sua ruptura (DAVANÇO, 2006).

Algumas das propriedades mecânicas apresentadas pelos filmes são a resistência à tração, deformação na ruptura e o módulo de elasticidade (módulo de Young). A resistência à tração é definida como a máxima tensão suportada pelo filme até o momento de sua ruptura, ou seja, é a força máxima por unidade de área de sua seção transversal suportada por um filme durante o ensaio de tração. A deformação na ruptura representa a habilidade do filme em se distender, sendo expressa como a diferença percentual entre o comprimento inicial do material fixado para a realização do teste e o final (momento da ruptura). A deformação na ruptura é um dado importante, pois alta deformação indica que um material pode absorver uma grande quantidade de energia antes do rompimento (ROBERTSON, 1993). O módulo de elasticidade (módulo de Young) representa a constante de proporcionalidade entre a tensão aplicada e a deformação sofrida pelo filme e é determinada pela inclinação da curva tensão versus deformação, na região elástica (VAN DE VELDE e KIEKENS, 2002).

A maioria dos filmes poliméricos sintéticos demonstra uma combinação dos comportamentos elástico e plástico, apresentando comportamento plástico logo após o limite elástico ser atingido. Ambos os comportamentos diferenciam-se mediante a aplicação de uma força: os materiais plásticos não retomam a sua forma original após a aplicação de uma força, enquanto os perfeitamente plásticos demonstram comportamento contrário.

A solubilidade dos filmes em água fornece informações sobre a sua integridade em sistemas aquosos e indica qual a sua resistência à água. Quando o objetivo é proporcionar a preservação de alimentos com grande quantidade de água são necessários filmes de baixa solubilidade. No entanto, em alguns casos, uma solubilidade moderada é desejada, podendo ser vantajosa. A estrutura dos polissacarídeos é um dos fatores que mais afeta a sua solubilidade em água. Também nesse caso, a incorporação de nanopartículas influencia a solubilidade em água, provocando a diminuição destes valores. Em filmes compósitos, onde são incorporados uma segunda fase, mesmo eles sendo

hidrofílicos, a solubilidade tende a diminuir devido ao tamanho das partículas que esses compósitos apresentam (OZDEMIR e FLOROS, 2008).

PONCE et al. (2009) observaram a melhoria nas propriedades mecânicas e de barreira quando adicionaram nanopartículas de prata a filmes de Poli(caprolactona) (PCL), como embalagens ativas para maçãs.

A transparência de um filme pode ser um aspecto positivo, devido à visualização do material recoberto pelo filme. Na área de alimentos esta é uma propriedade desejável, devido a importância do aspecto do produto revestido com o filme para o consumidor (RHIM et al. 2006).

2.6. Nanocompósitos antimicrobianos

Durante o transporte e armazenamento, os alimentos estão expostos a inúmeras condições físicas, químicas e microbiológicas, podendo causar alterações na sua qualidade. O crescimento microbiano na superfície dos alimentos é a causa mais comum de sua deterioração (ORTS et al., 2005). O uso de preservativos químicos pode reduzir o crescimento desses microrganismos; no entanto, esta concentração deve ser a mínima a fim de otimizar seu uso. Alternativamente, o crescimento de microrganismos na superfície do produto pode ser controlado por meio da incorporação de agentes antimicrobianos nos filmes (PIRES et al., 2008).

As embalagens com ação antimicrobiana, consideradas como uma parte da área de embalagens ativas vem sendo estudadas com o objetivo de reduzir o risco do desenvolvimento de microrganismos patogênicos e aumentar a vida de prateleira de produtos alimentícios (SUPPAKUL et al., 2003).

O uso de nanocompósitos antimicrobianos tem como base o uso de uma matriz polimérica e nanopartículas (metálicas ou poliméricas). Entre os vários metais, a prata é amplamente conhecida pelo seu amplo espectro de

atividade antimicrobiana e o metal que apresenta a menor toxicidade para células animais (LARA et al., 2010, GORENSK e RECELJ, 2007).

O mecanismo de efeito inibidor dos íons prata está parcialmente compreendido; no entanto, nanopartículas de prata interagem com uma vasta gama de processos moleculares dentro dos microrganismos, resultando em uma variedade de efeitos na morte desses, que depende da forma (PAL et al., 2007), tamanho (YEN et al., 2009), concentração das nanopartículas (ASHARANI et al., 2009) e sensibilidade das espécies microbianas à prata (BAKER et al., 2005; ILLINGWORTH et al., 2000; RUPARELIA et al., 2008).

CHAUDRY et al. (2010) estudaram a efetividade antimicrobiana de nanocompósitos plásticos/nanopartículas de prata no estudo em embalagens de alimentos. RODRIGUES et al. (2008) também observaram resultados semelhantes em filmes de poli-{estireno-co-ácido acrílico} impregnado com prata nanoparticulada frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Também para esses mesmos microrganismos, ZAPERLON et al. (2013) obtiveram boa atividade inibidora para filmes finos de PAH/PAA decorados com nanopartículas de prata no tratamento de efluentes industriais.

PAL et al. (2007) relataram que as nanopartículas de prata com formato triangular inibiram por completo o crescimento de *E. coli* a uma concentração de 1 µg/L, enquanto as nanopartículas com o formato esférico causaram inibição total com uma concentração de 12,5µgL⁻¹. Segundo RUPARELIA et al. (2008), o efeito bactericida das nanopartículas diminui não só com o formato da partícula, mas também com as suas dimensões e o tipo de microrganismo estudado.

O pequeno tamanho das nanopartículas em relação às bactérias (tamanho médio de 1 a 10µm) reflete na sua atividade contra os microrganismos: com o aumento da área superficial, maior a facilidade da interação entre esses e as nanopartículas.

As bactérias podem ser classificadas de acordo com sua habilidade de retenção do corante de Gram, sendo divididas em Gram-positivas e Gram-negativas. A coloração de Gram é um teste fácil e poderoso que permite distingui-las. As bactérias Gram-negativas quando fixadas pelo calor ou desidratadas em uma lâmina tornam-se violetas com o uso do corante cristal-violeta, um corante que forma um precipitado com o iodo. Esse corante não retido e em excesso é removido por meio do uso de um solvente à base de acetona ou álcool. Um corante de contraste vermelho, a safranina, é adicionada para a coloração de todas as células descoloridas. Isto acontece pois estas bactérias possuem uma fina camada de peptidoglicano (polissacarídeo), que não retém o corante cristal-violeta. Em contrapartida, nas bactérias Gram-positivas, o corante violeta fica confinado, desde o início, na grossa camada de peptidoglicano que circunda a célula. Dessa forma, as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular mais espessa, devido a maior quantidade de peptidoglicano presente (FIGURA 2.5) (GHOSH et al., 2010).

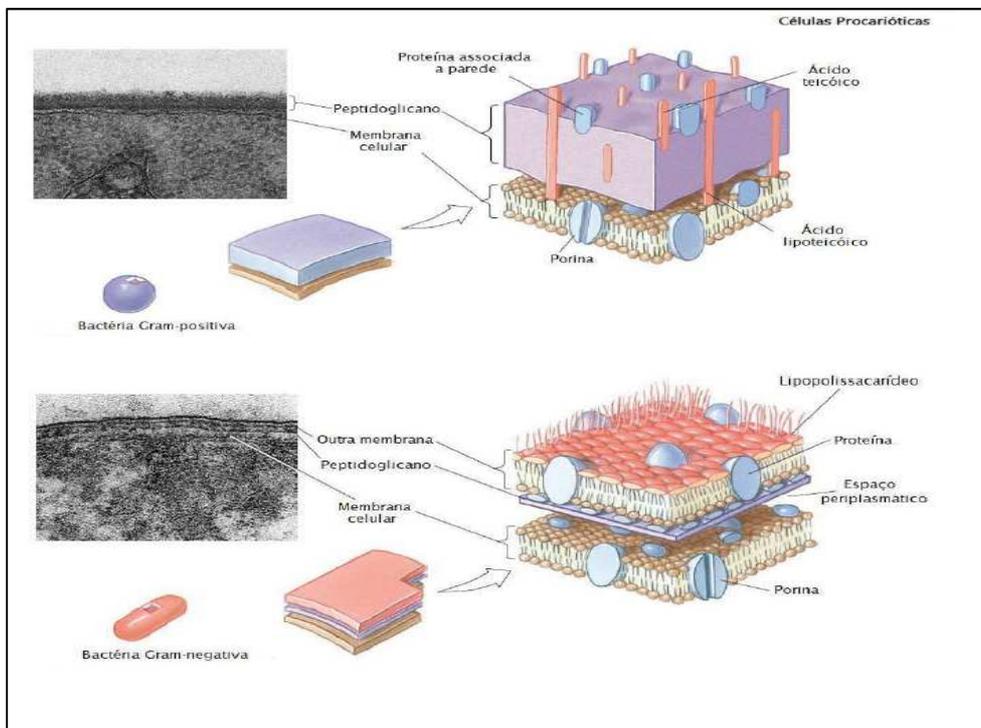


FIGURA 2.5: Estrutura celular de bactérias Gram-positiva e negativa.
Fonte: BLACK, 2008.

Uma bactéria muito utilizada em pesquisas antimicrobianas é a *Escherichia coli* (Gram-negativa) e como representante do grupo Gram-positivo as bactérias mais utilizadas são a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus Faecalis* (DESOUKY et al., 2013). *Escherichia coli* são bastonetes Gram negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos (não necessitam de oxigênio para se desenvolver, embora cresçam melhor em ambientes ricos em oxigênio), crescem bem em meio de cultura sintético, contendo nutrientes simples e fermentam açúcares. *Enterococcus Faecalis* caracterizam-se por apresentar cocos arranjados em cadeia, não esporulados e anaeróbios facultativos (GHOSH et al., 2010).

2.7. Nanotoxicidade

Embora os estudos disponíveis não provassem definitivamente quais impactos imediatos os nanomateriais contendo prata possam causar tanto para a saúde humana quanto para o ambiente, alguns dados obtidos até o momento sugerem certa cautela relacionada ao uso crescente desses nanomateriais, (MARAMBIO-JONES e HOEK, 2010; SHUBAYEV et al., 2009).

Para melhor prever e prevenir possíveis impactos ambientais das nanopartículas de prata mais dados são necessários sobre os efeitos biológicos em modelos apropriados de organismos. Analisando a literatura, há trabalhos que abordaram os efeitos adversos de nanopartículas de prata em diferentes níveis de interação biológica, incluindo testes *in vitro* e *in vivo*. Os resultados de estudos *in vitro* indicaram um efeito possivelmente dose-dependente induzido pelo estresse oxidativo como principal via possível de toxicidade (JEYARAJ et al., 2013; PARK et al., 2011).

Em 2009, mais de 70% dos trabalhos publicados relacionados à nanociência utilizaram ensaios *in vitro*, sem qualquer comparação com testes *in*

vivo (HAYNES, 2010). Estudos *in vitro* em cultura de células podem muitas vezes não corresponder e substituir os resultados *in vivo* (CLIFT et al., 2010).

Testes em modelos *in vivo* permitem observar e avaliar os efeitos em longo prazo, o acúmulo em órgãos e a biodistribuição. Estudos *in vivo* geralmente estão focados em uma das três áreas seguintes: alteração da química do soro sanguíneo, mudanças da morfologia dos tecidos e a biodistribuição das nanopartículas (MARQUIS et al., 2009).

O desenvolvimento da nanotecnologia levou à síntese de novos materiais e novos produtos que contenham nanopartículas. Os produtos da nanotecnologia já estão presentes em vários ramos no mercado, como desodorantes, camisetas, painéis, revestimento de vidro, tintas de parede, etc. No entanto, há possibilidade de liberação no meio ambiente destas nanopartículas, o que aumenta as preocupações com a saúde e com o ambiente. Ainda há muitas perguntas a serem respondidas para se chegar a uma compreensão abrangente dos efeitos positivos e negativos das nanopartículas de prata (YU et al., 2013).

Dessa forma, não se pode generalizar que a ingestão e/ou contato com qualquer quantidade de nanopartículas de prata seja prejudicial, sendo totalmente evitados. Segundo a *Environmental Protection Agency* (EPA), doses diárias de prata equivalentes a $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de massa corpórea são aceitáveis, com improváveis riscos à saúde, sendo a dose limite de $14\mu\text{g kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ (EPA, 1987).

O uso generalizado de produtos que contenham nanopartículas pode apresentar riscos para a saúde humana devido à sua liberação, acidental ou não, para o meio ambiente no final do seu ciclo de vida (GAMBARDELLA et al., 2013). A administração oral é uma via relevante de exposição por causa do uso de nanopartículas de prata em produtos relacionados com alimentos e materiais em contato com alimentos (LOESCHNER et al., 2011).

Ainda há muitos questionamentos se a toxicidade é proveniente do íon prata ou das nanopartículas desse metal. KIM et al. (2009) sugeriram que a

toxicidade referente a nanopartículas de prata é devido ao estresse oxidativo e independe dos íons prata; no entanto, a toxicidade pode não ter origem nas nanopartículas em si, mas ser resultante da capacidade de liberarem íons metálicos em solução (MUDUNKOTUWA e GRASSIAN, 2011), mas há ainda conflitos a serem elucidados.

Embora a toxicologia de prata e seus compostos tenha sido estudada, existem várias lacunas de conhecimento no que diz respeito ao risco referente a prata na forma de nanopartículas, tanto para os seres humanos quanto ao meio ambiente. Assim, é necessário um maior estudo para avaliar exatamente qual o risco real que os nanomateriais podem oferecer diante sua ingestão e/ou descarte.

2.7.1. Testes *in vivo*: utilização de sementes de *Allium cepa*

O número crescente de agentes químicos introduzidos no ambiente, que podem promover possíveis alterações genéticas nos organismos, foi uma das principais razões que levou ao desenvolvimento de metodologias de avaliação de genotoxicidade de substâncias químicas (BRUSICK, 1987). Dentre as plantas, os vegetais superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos por responderem, eficientemente, às substâncias químicas ambientais. GRANT (1994) comparou sistemas testes vegetais e não vegetais e demonstrou que testes com vegetais superiores têm uma alta sensibilidade, produzindo poucos resultados falsos.

Segundo HOUK (1992), resultados de bioensaios genéticos são relevantes à saúde humana porque o alvo toxicológico é o DNA, molécula existente em todas as formas celulares vivas. Pode-se extrapolar que compostos que reagem com o DNA de uma espécie têm o potencial para produzir efeitos semelhantes em outras espécies.

A espécie *Allium cepa* (cebola) constitui um dos materiais pioneiros e eficientes nos estudos de citotoxicidade e genotoxicidade, apresentando boa correlação com sistemas testes de mamíferos, além de apresentar um crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, disponibilidade o ano todo, fácil manuseio, boa cinética de proliferação e cromossomos de número reduzido ($2n=16$) (MATSUMOTO et al.,2006)

As diferenças bioquímicas e farmacocinéticas existentes entre células de plantas e de mamíferos são as principais responsáveis pela falta de reconhecimento dos testes de genotoxicidade realizados com plantas. As agências reguladoras consideram queda dos obtidos por meio de ensaios de genotoxicidade realizados com plantas possuem um valor limitado, quando extrapolados para seres humanos, embora haja uma grande aceitação de outros sistemas testes em não mamíferos como bactérias, drosófilas, neurósporas e fungos. No entanto, resultados comparáveis entre plantas e animais são frequentemente registrados (GRANT et al., 1981).

A cultura de células apresenta vantagens sobre os métodos *in vivo*: possibilidade de limitar o número de variáveis experimentais, obtenção de dados significativos mais facilmente e períodos de experimentação mais curtos (ROGERO et al.,2003).

O termo citotoxicidade é designado para alterações celulares provocadas por um agente levando a célula a iniciar seu processo de morte. Um dos métodos utilizados para a investigação da citotoxicidade é a verificação da frequência do Índice Mitótico (IM) e a análise de alterações celulares morfológicas indicativas de morte celular (CUCHIARA et al., 2012).

Avaliando-se o IM, analisa-se a capacidade do organismo multiplicar suas células. A interrupção da divisão celular impede a germinação da semente, caracterizando um efeito tóxico que leva o indivíduo à morte. A inibição da divisão geralmente não leva o organismo à morte, mas pode interferir no seu desenvolvimento devido à significativa quantidade de células

em processo de morte, caracterizando assim um efeito citotóxico (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

O termo genotoxicidade é designado para danos no material genético, seja em estruturas cromossômicas ou moléculas de DNA, provocados por um agente. No entanto, essas alterações podem ser passíveis de reparo. Essas alterações podem ser as seguintes: C-metáfases, metáfases com aderência, metáfase com perda cromossômica, anáfases com atraso, perdas de cromossomos e pontes cromossômicas (FIGURA 2.6). Assume-se esta classificação por não se saber, com segurança, se as derivações dessas anormalidades levarão a efeito mutagênico (efeitos irreparáveis) ou se há possibilidade de correção desses erros, não resultando em uma célula com mutação. Contudo, a presença dessas alterações pode indicar que a substância teste tem ação sobre o material genético (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

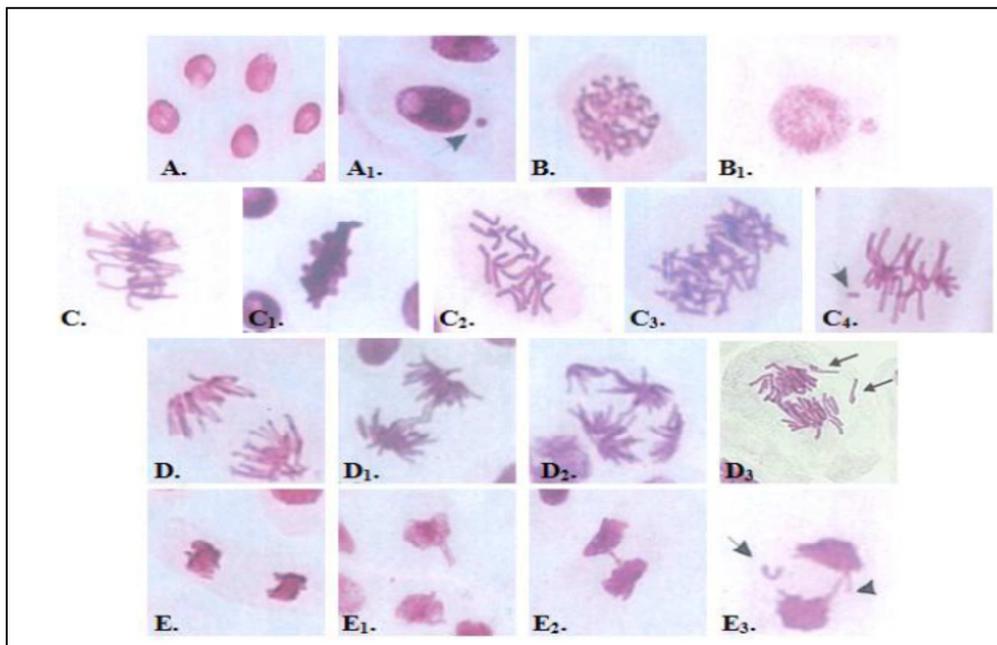


FIGURA 2.6: Exemplos de células meristemáticas normais e alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa*: A:Núcleo interfásico normal, A1: Micronúcleo na intérfase, B:Prófase normal, B1:Prófase com micronúcleo, C:Metáfase normal, C1:Metáfase com aderência cromossômica, C2:C-metáfase, C3:Metáfase poliploide, C4:Metáfase com quebra cromossômica,D:Anáfase normal, D1:Anáfase com ponte cromossômica, D2: Anáfase multipolar, D3:Anáfase com perdas cromossômicas (setas), E:Telófase normal, E1: Telófase com atraso cromossômico, E2: Telófase com ponte cromossômica, E3: Telófase com ponte (cabeça de seta) e perda cromossômica (seta).

Fonte: adaptado de LEME e MARIN-MORALES, 2009.

As alterações cromossômicas são induzidas por agentes clastogênicos (indutores de quebras no DNA) ou por agentes aneugênicos, ou seja, aqueles que interferem no fusomitótico, não afetando diretamente o DNA, mas podem causar erros durante a segregação cromossômica (GRANT et al., 1981).

Nos últimos 30 anos, o teste de Alterações Cromossômicas (AC) no sistema teste de *Allium cepa* tem sido amplamente utilizado para o monitoramento ambiental, atuando como um biomarcador de efeitos genotóxicos induzidos por agentes possivelmente tóxicos. Deste modo, esse teste tem apresentado posição de destaque entre os testes recomendados por lei para avaliação de agentes genotóxicos (MATEUCA et al., 2006). Esse teste tem sido satisfatório na correlação entre a avaliação das AC e o subsequente desenvolvimento de câncer: pessoas com elevadas frequências de AC apresentam risco significativo de desenvolvimento de câncer (OBE et al., 2002).

As AC são uma das consequências biológicas da exposição aos agentes químicos genotóxicos, representando a parte visível de uma grande variedade de alterações induzidas no material genético, resultantes da atuação de diferentes mecanismos de reparo das quebras do DNA. Apesar de vários mecanismos de reparo das cadeias de DNA estarem envolvidos, muitos deles podem não ocorrer de maneira correta, induzindo a alterações no DNA e, conseqüentemente, a alterações cromossômicas (PFEIFFER et al., 2000).

Embora existam poucos estudos sobre a citotoxicidade de nanopartículas em mamíferos e linhas de células humanas, quase não existem relatos sobre o comportamento genotóxico e citotóxico de nanopartículas em células de plantas.

Dessa forma, KUMARI et al. (2009) investigaram os impactos citotóxicos e genotóxicos de nanopartículas de prata utilizando *Allium cepa* como organismo indicador. Quatro diferentes concentrações (25, 20, 75 e 100 ppm) de nanopartículas de prata (abaixo de 100 nm de tamanho) e inferiram a

partir desse estudo que as nanopartículas de prata poderiam penetrar na planta podendo prejudicar as fases de divisão celular causando ponte, múltiplas quebras cromossômicas e desintegração celular. Os resultados também sugerem que plantas, sendo uma importante componente dos ecossistemas, precisam ser incluídas quando se avalia o impacto toxicológico geral das nanopartículas no meio ambiente.

É preciso avaliar o comportamento das nanopartículas de prata de tamanhos e concentrações diferentes a fim de comparar com resultados da literatura.

2.7.2. Testes *in vivo*: utilização de ratos Wistar

A experimentação animal na pesquisa científica tem contribuído para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Animais de várias espécies têm sido utilizados nos últimos tempos, sendo o camundongo e os ratos os mais intensamente utilizados e os mais conhecidos cientificamente (CHORILLI et al., 2007).

Os ratos representam cerca de 20% do número total de animais de laboratório utilizados em pesquisas científicas. Por serem animais pequenos apresentam tamanho apropriado para criação e manipulação, além de demandarem de pouco espaço; adaptam-se facilmente a novos ambientes e não demonstram estresse com mudanças; apresentam custo baixo; são de fácil manejo; possuem um breve período de gestação (19-21 dias); seu tempo de vida é estimado para no máximo 3 anos, permitindo que várias gerações sejam estudadas em curtos períodos de tempo.

Além disso, os ratos possuem a genética muito parecida entre si e isso permite uma uniformização dos resultados dos experimentos. São geneticamente e biologicamente parecidos com os seres humanos. Por este motivo, substâncias testes podem ser utilizadas com bastante eficácia, pois

muitos de nossos sintomas podem ser aplicados nos pequenos roedores. Como os estudos com ratos já acontecem há décadas, pequenas mudanças comportamentais são percebidas facilmente, pois sua anatomia, fisiologia e a genética já são bem conhecidas pelos cientistas (HARKNESS e WAGNER, 1993).

YU et al. (2013) demonstraram que nanopartículas de prata podem causar toxicidade potencial para modelos vivos. As nanopartículas de prata podem acumular-se na cadeia alimentar, o que cria o risco de um efeito direto sobre os organismos vivos. Também pode provocar a necrose de tecidos humanos e afetar a atividade de componentes elementares em células humanas (PULIT et al., 2011).

KIM et al. (2008) mostraram que ratos toleraram doses de 1000mg Kg^{-1} de nanopartículas de prata sem alterações significativas na massa corporal mas com aumento da fosfatase alcalina e dos níveis de colesterol com doses acima de 300mg kg^{-1} , indicando alterações funcionais do tecido hepático.

2.7.3. Ecotoxicidade em organismo aquático

Os estudos de toxicidade de substâncias no meio aquático limitam-se ao uso de organismos representativos de cada nível trófico como bactérias e algas (ex. *Chlorella pyrenoidosa*, *Microcystis aeruginosa*), micro-crustáceos (ex. *Daphnia sp*, *Gammarus lacustris*) e peixes (ex. *Carassius auratus*, *Gambusia affinis*). Estes organismos são adequados para determinação, por exemplo, de letalidade, contudo carecem de avaliação de outros aspectos, sinais e sintomas, que podem ser encontrados em mamíferos (MITTEREGGER, 2007).

Os produtos contendo nanopartículas estão suscetíveis à sua liberação para o meio ambiente, podendo causar bioacumulação. Apesar da maior parte da prata presente nas águas de superfície ser originada da lixiviação natural, concentrações elevadas desse metal podem ser associadas a um descarte

irregular. A biodisponibilidade e a bioacumulação de nanopartículas de prata por todos os organismos dependem do tamanho, formato e estado de agregação da partícula.

O microcrustáceo *Daphnia Similis*, também conhecido como pulga d'água, é amplamente utilizado em estudos de ecotoxicologia aquática para avaliação da toxicidade aguda, devido a sua alta sensibilidade. Seu uso é recomendado por vários órgãos internacionais (OECD, 2004; EUROPEAN COMMISSION, 2002). Além disso, uma vez que esse microcrustáceo está na parte inferior da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos de água doce, qualquer alteração na sua qualidade ou quantidade da população pode resultar em alterações nas populações de outros organismos aquáticos.

É um organismo planctônico com reprodução partenogênica, atinge no máximo 3,5mm e alimenta-se por filtração de material orgânico em suspensão. O teste de toxicidade aguda é um experimento de curta duração que proporciona rápida resposta por meio de parâmetros biológicos como imobilidade dos organismos aquáticos. Seu principal objetivo é determinar as Concentrações Efetivas ou Letais Médias (CE₅₀ ou CL₅₀) em tempo reduzido de exposição, que geralmente varia entre 24 a 96 horas. São definidas e padronizadas como a concentração do agente tóxico que causa 50% de mortalidade na população de organismos submetidos ao teste. Os testes desta natureza disponibilizam informações básicas para outros estudos mais criteriosos como os testes de toxicidade crônica e avaliação de risco ecotoxicológico.

Testes de toxicidade crônica são experimentos de longa duração, que visam ao estudo dos efeitos não letais nos organismos aquáticos, a partir da sua exposição prolongada a concentrações sub-letais. Estes efeitos são geralmente avaliados por meio de análises específicas (histológicas, hematológicas, comportamentais, etc.), utilizadas para a detecção de alterações crônicas, tais como: distúrbios fisiológicos, deformidades em tecidos somáticos

e/ou gaméticos, alterações no crescimento e reprodução do organismo, dentre outras (CRANE et al., 2008).

Embora a toxicidade de nanopartículas de prata tenha sido estudada em organismos aquáticos, tais como *Daphnia* e alguns tipos de peixes (FABREGA et al., 2011; LABAN et al., 2010), as características distintas de nanopartículas (por exemplo, do método de preparação, tamanho e forma) podem alterar os seus efeitos sobre os organismos vivos, o que leva alguns cientistas a sugerir que a toxicidade destes novos materiais precisam ser investigados caso a caso.

BILBERG et al. (2010) estudaram os efeitos in vivo de nanopartículas de prata em peixes, indicando que partículas entre 10 e 80 nm afetaram o desenvolvimento precoce dos peixes.

Assim, com a presença crescente de nanomateriais em produtos de consumo, grande quantidade de nanopartículas podem ser liberadas e eventualmente entrar em sistemas aquáticos, seja intencionalmente ou por acaso, o que representa sérios riscos possíveis para o ambiente. Portanto, investigar o potencial de toxicidade aquática de nanomateriais tornou-se uma questão importante, sendo um estudo complementar dos efeitos desses materiais nanoparticulados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo são descritos os procedimentos de síntese de nanopartículas de prata-PVA, filmes de carboximetilcelulose e carboximetilcelulose/nanopartículas de prata-PVA e suas caracterizações, assim como a avaliação da atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas frente a *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade *in vivo* em células de cebola (*Allium cepa*), em ratos Wistar e ecotoxicidade em microcrustáceos *Daphnia Similis*.

Durante o desenvolvimento deste trabalho de tese, também foram sintetizados sistemas de CMC/Nanopartículas de quitosana para avaliação da atividade antimicrobiana. Como o foco deste trabalho foi o estudo de sistemas com atividade antimicrobiana, os resultados destas avaliações preliminares não foram apresentados nesta tese, pois não houve atividade antimicrobiana para os compostos CMC/Nanopartículas de quitosana.

3.1. Materiais

Os reagentes utilizados nas sínteses de nanopartículas foram de pureza analítica e estão listados a seguir:

3.1.1. Síntese de Nanopartículas de prata e soluções filmogênicas

- Nitrato de prata (AgNO_3) - Sigma Aldrich (St. Louis, USA);
- Poli(álcool vinílico) (PVA) - $M_w = 78.000 \text{ g mol}^{-1}$ - 98% hidrolisado - Sigma Aldrich (St. Louis, USA);
- Borohidreto de sódio (NaBH_4) - Sigma Aldrich (St. Louis, USA);

- Carboximetilcelulose sódica (CMC) Grau de substituição 0,75 - Denver Indústria e Comércio Ltda (Cotia-SP).

3.1.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a preparação do meio de cultura LB (Luria-Broth) foram utilizados:

- Triptona 10g L⁻¹; Extrato de levedura 5g L⁻¹; Cloreto de sódio 5g L⁻¹ e Agar-agar 15g L⁻¹ (para o meio sólido) - Hi-Media Laboratories Ltda (Mumbai-Índia);

As bactérias utilizadas foram:

- *Enterococcus faecalis* (CCCD E002) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) - Cefar Diagnostica Ltda (São Paulo-SP).

3.1.3. Genotoxicidade e citotoxicidade em células de *Allium cepa*

Os materiais utilizados nos ensaios foram:

- Sementes de *Allium cepa* adquiridas comercialmente, sendo que em todos os bioensaios foram utilizadas cebolas da mesma procedência(variedade Baia periforme);

- Herbicida Premerlin 600 (trifluralina) - Milênia Agrosciências S.A (Taquari-RS);

- Reagente de Schiff - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA);

- Ácido acético P.A.; Ácido clorídrico P.A. e Álcool etílico absoluto

- Chemco Indústria e Comércio Ltda (Hortolândia-SP);

- Carmim em pó - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

3.1.4. Toxicidade em ratos Wistar

Os animais utilizados nos ensaios de toxicidade foram:

- Ratos Wistar jovens, com massas aproximadas de 230 ± 15 g – Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna –SP).

3.1.5. Ecotoxicidade em microcrustáceo *Daphnia Similis*

- *Daphnia Similis*, com idade inferior a 24 horas - Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna –SP).

3.2. Métodos

Na FIGURA 3.1 é apresentado o fluxograma dos ensaios realizados nesse trabalho.

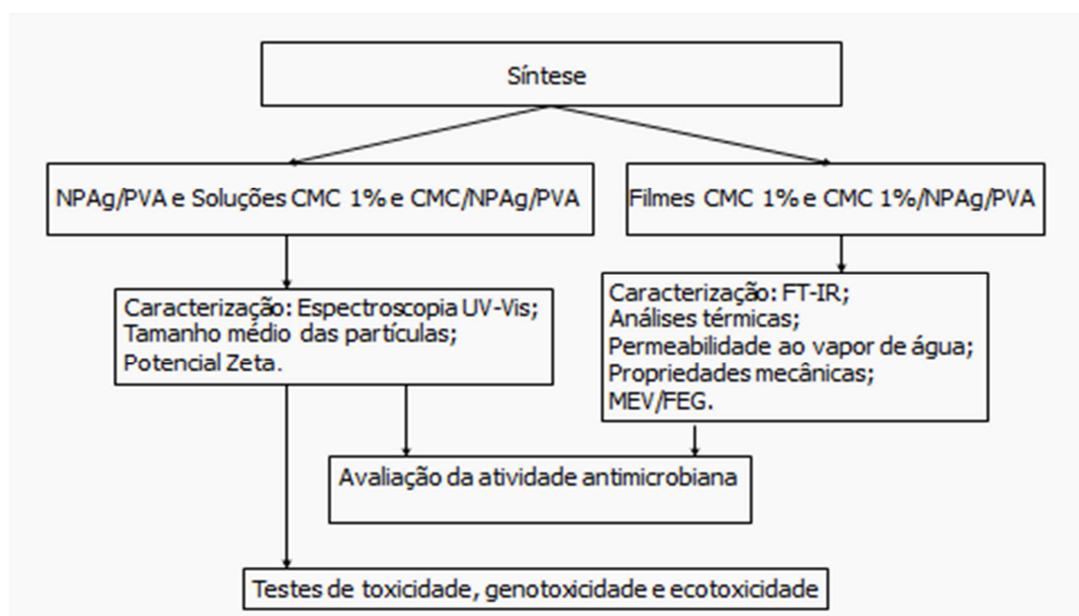


FIGURA 3.1: Fluxograma contendo os ensaios realizados durante a execução do trabalho.

3.2.1. Preparação da solução de Nanopartículas de Prata-PVA e soluções filmogênicas

As nanopartículas de prata foram sintetizadas por reação da redução química de íons prata (AgNO_3) por um agente redutor (NaBH_4) na presença de um agente estabilizante (PVA), seguindo metodologia adaptada de NETO et al. (2008) e MBHELE (2003).

Foi necessário o aquecimento a 80°C da solução contendo PVA para sua total solubilização. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (grau Mili-Q).

Em seguida, 10 mL de solução de nitrato de prata $0,08\text{g L}^{-1}$ foram adicionados a 20 mL de solução de PVA $0,2\text{g L}^{-1}$ resfriado e sob agitação constante de 1400 rpm. Em seguida, adicionou-se 10 ml de solução de borohidreto de sódio $0,04\text{g L}^{-1}$. A preparação foi feita sob abrigo da luz, a fim de se evitar a oxidação dos íons prata. Uma solução de 40 mL de NPAg-PVA foi obtida para posterior obtenção de cada filme.

A solução tornou-se amarelada imediatamente após o uso do agente redutor, confirmando a formação das nanopartículas, sendo mantida sob constante agitação à temperatura ambiente. A solução foi estocada em frascos âmbar e mantiveram-se estáveis por 2 meses. A concentração de nanopartículas foi $12,40\mu\text{g mL}^{-1}$. Para obtenção da solução filmogênica de CMC/nanopartículas de prata (CMC/NPAg-PVA), adicionou-se 1% de CMC (m/v) à solução de nanopartículas de prata. A solução filmogênica de CMC 1% (m/v) puro também foi obtida por solubilização do polímero em água. No APÊNDICE 1 encontram-se os cálculos referentes à obtenção das nanopartículas de prata, soluções filmogênicas e filmes. A formação das nanopartículas foi acompanhada pela banda *plasmon* em aproximadamente 400 nm por espectroscopia UV-Vis.

3.2.2. Preparação dos Filmes

Para o preparo dos filmes empregou-se a técnica *casting*, que consiste no preparo da solução filmogênica depositada em um suporte, seguida da secagem do solvente. O controle da espessura dos filmes foi feito com auxílio de um espacionamento.

Após o preparo das soluções, estas foram vertidas sobre placas de poliéster (30x30 cm) e secas por 24 horas à temperatura ambiente (FIGURA 3.2). Após os filmes secos, estes foram retirados das placas e alocados em sacos plásticos, para posterior caracterização. Cada filme foi obtido a partir do volume resultante da solução contendo o PVA, AgNO_3 e NaBH_4 . Assim, cada filme continha 40 mL de solução de nanopartículas de prata com adição de 1% (m/v) de CMC.

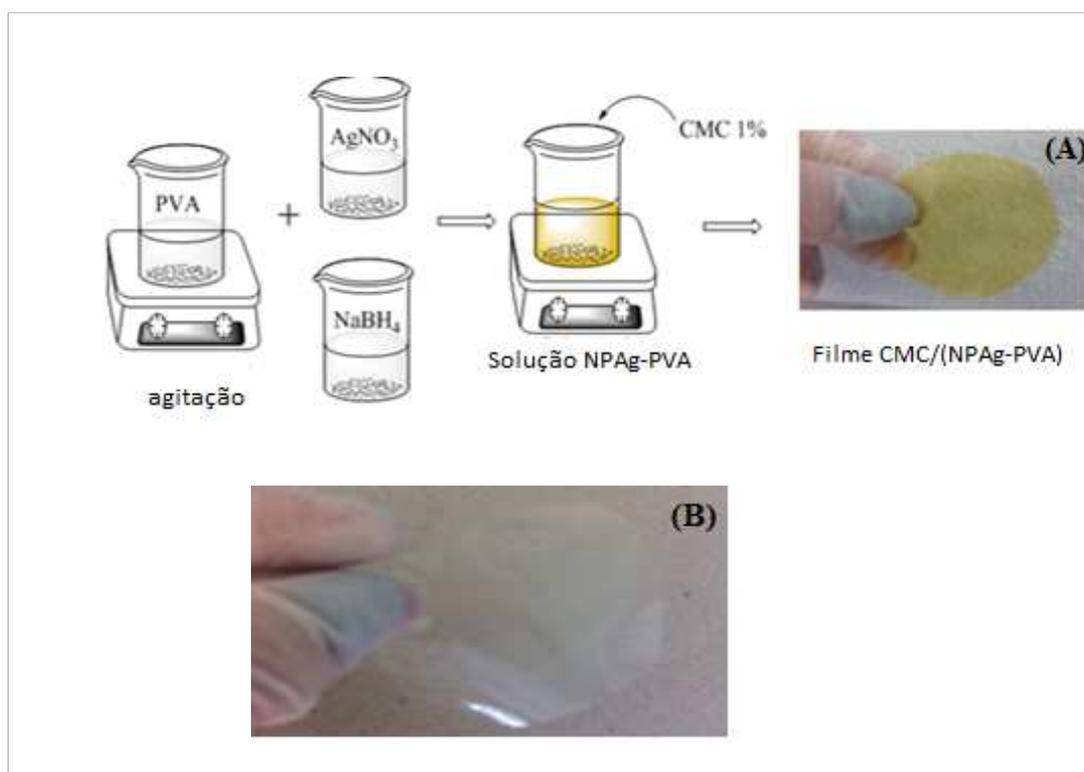


FIGURA 3. 2: (A) Síntese de NPAg-PVA e filme CMC/(NPAg-PVA) e (B) Filme CMC.

3.2.3. Caracterização das Nanopartículas de Prata-PVA e das Soluções filmogênicas

3.2.3.1. Espectroscopia UV-Visível (UV-Vis)

A caracterização das nanopartículas de prata-PVA abrange a técnica de espectroscopia no UV Visível. Os espectros foram obtidos a partir das soluções aquosas usando um espectrofotômetro de absorção UV-Vis (Shimadzu UV-Vis 160-1PC), na região de 300 a 800 nm, em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico e utilizando-se água como branco.

3.2.3.2. Análise do Tamanho médio das partículas

O tamanho médio das partículas foi determinado por meio de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments (Inglaterra), capaz de determinar tamanhos de partículas entre 0,3 nm até 10 μ m. As análises foram feitas nas soluções contendo nanopartículas de prata, com medidas em triplicata.

Nesta técnica, o tamanho das partículas é medido pelo espalhamento de luz em um modelo de esfera difusa que se movimenta em meio aquoso, devido ao movimento Browniano, de modo que a velocidade da partícula no meio determina o seu tamanho (partículas maiores movem-se mais lentamente e espalham mais o laser; partículas menores se movem mais rapidamente e espalham menos o laser). Uma fonte laser incide sobre a amostra, que espalha luz. A intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas sofre flutuações ao longo do tempo. Esta flutuação da intensidade de luz espalhada ocorrerá com maior velocidade quando a dispersão contiver partículas pequenas, devido ao fato de estas se movimentarem mais rapidamente que as

partículas maiores. Assim, são analisadas essas flutuações, estimando assim a velocidade das partículas em solução. Com esses dados, a partir da equação de Stokes-Einstein (equação 3.1), obtém-se o tamanho médio das partículas (SCHARTL, 2007).

Equação de Stokes-Einstein

$$D_{AB} = \frac{kT}{6\pi r\mu_B} \quad (\text{equação 3.1})$$

Onde:

D_{AB} = difusividade de A em solução diluída em B

k = constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-16}$ ergs K^{-1})

T = temperatura absoluta

r = raio da partícula

μ_B = viscosidade do solvente

3.2.3.3. Análise do Potencial Zeta

A análise do Potencial Zeta das soluções filmogênicas foi realizada para avaliar a estabilidade da solução. O equipamento utilizado foi o mesmo para a determinação do tamanho das partículas (Zetasizer modelo Nano ZS da Malvern Instruments). As medidas foram realizadas em triplicata.

A estabilidade total de um colóide vai depender de seu potencial total (Potencial Zeta), que é a soma do potencial devido ao solvente, do potencial atrativo e do potencial repulsivo. Para não ocorrer o fenômeno de aglomeração, o potencial repulsivo deve ser maior que o potencial atrativo. Esse potencial é influenciado por mudanças na interface com o meio externo, decorrente da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície ou da adsorção de espécies iônicas do meio de dispersão. Cria-se uma camada ao redor da partícula (dupla camada elétrica) que difere do *bulk* da solução. Sob movimento Browniano, essa camada se move como parte da partícula. O

potencial zeta é o potencial nesta camada e é determinado por medidas de mobilidade eletroforética, que correspondem à velocidade das partículas em suspensão quando submetidas a um campo elétrico. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas se deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta. O potencial zeta é relacionado com a mobilidade eletroforética pela equação de Henry (equação 3.2) (SCHARTL, 2007).

A estabilidade de partículas ocorre quando o valor do potencial Zeta é menor ou igual a -25mV ou maior ou igual a 25mV, caso contrário, a aglomeração irá ocorrer (SCHARTL, 2007).

Equação de Henry

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad (\text{equação 3.2})$$

Onde:
EU= mobilidade eletroforética
 ε = constante dielétrica
z = potencial zeta
f(ka) = fator de correlação que depende da força iônica do meio e do tamanho das partículas
 η = viscosidade

3.2.4. Caracterização dos filmes

3.2.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/FEG)

A morfologia das partículas no filme foi analisada por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/FEG). Para isso, utilizou-se um

microscópio JSM-6701F(Jeol). As amostras foram depositadas em porta-amostras de silício contendo fita de carbono e recobertas com ouro e foram analisadas a 1,5 KV.

3.2.4.2. Solubilidade dos filmes em água

A percentagem de solubilidade dos filmes em água foi obtida por meio do procedimento descrito por GONTARD et al. (1992). Para isso, os filmes foram cortados em disco (2 cm de diâmetro), pesados e secos a 100 °C durante 24 horas. Os filmes foram então imersos em 50 mL de água contendo traços de azida de sódio (0,02% m/v), para prevenir o crescimento microbiano, sob lenta agitação por 24 horas (20 °C). A parte de filme insolúvel foi separada por centrifugação a 5000 rpm e posteriormente secas (100 °C -24 horas) para a determinação da massa seca que não foi solubilizada. A massa de filme solubilizada foi calculada pela diferença da massa inicial de matéria seca e massa da matéria seca não solubilizada e reportada como a percentagem de filme solubilizada em água (equação 3.3):

$$\text{Solubilidade filme em água (\%)} = \frac{m_{\text{seca inicial}} - m_{\text{seca não solubilizada}}}{m_{\text{seca inicial}}} \times 100 \quad (\text{equação 3.3})$$

Todos os resultados foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney, seguindo o nível de significância de 0,05.

3.2.4.3. Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier FT-IR

Para análise da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, as amostras secas foram pastilhadas com brometo de potássio (KBr).

Os espectros foram obtidos no espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Paragon 1000 (USA), registrando 128 varreduras de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

A Espectroscopia no Infravermelho foi utilizada principalmente para determinação das interações entre as nanopartículas de prata e o polímero, por meio de deslocamentos de bandas de grupos funcionais específicos.

3.2.4.4. Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água é comumente referenciada como WVP (Water Vapour Permeability) e para a sua determinação utilizou-se o método ASTM E96-92 modificado (MCHUGH et al., 1993). Inicialmente, os filmes tiveram suas espessuras medidas por paquímetro em 5 pontos diferentes do filme. Cada filme foi cortado em formato circular (4 cm de diâmetro), sempre em triplicata. Os filmes foram presos entre duas placas de Teflon, onde foram adicionados 6 mL de água destilada na parte interna da placa inferior. O filme foi colocado de forma a cobrir essa água, sem entrar em contato com a mesma, sendo fixado na parte superior da placa. As placas foram colocadas em dessecadores com sílica gel, para controle de umidade, os quais foram alocados com ventilação e temperatura de 25 °C. As massas das células foram periodicamente medidas para calcular a percentagem de umidade relativa (equações 3.4 a 3.6) e, conseqüentemente, a permeabilidade ao vapor de água (equação 3.7) (AOUADA, 2009).

$$\text{Velocidade transmissão vapor de água (WVTR)} = \frac{\text{perda massa por tempo}}{\text{Área do filme}} \quad (\text{equação 3.4})$$

$$\text{WVTR} = \frac{M \times P \times D \times \ln[(P-p_2)/(P-p_1)]}{R \times T \times z} \quad (\text{equação 3.5})$$

$$\text{Umidade Relativa} = \frac{p_2}{p_1} \times 100 \quad (\text{equação 3.6})$$

onde: MW (massa molecular da água 18 g mol^{-1}), P (pressão total do sistema 1 atm), D (difusividade do vapor de água através do ar a $298\text{K} = 0,102 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), p_1 (pressão de saturação do vapor de água na temperatura do ensaio $= 0,0313 \text{ m}^2 \text{ s}$), p_2 (pressão parcial na parte inferior do filme), R (constante dos gases ideais $= 82,1 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ atm g}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), z (altura média atingida pelo gás inerte).

Assim, por meio da pressão parcial da parte de baixo do filme, consigo calcular a velocidade de transmissão do vapor de água e, conseqüentemente, a permeabilidade ao vapor de água (WVP).

$$\text{WVP} = \frac{\text{WVTR} \times L}{(p_2 - p_3)} \quad (\text{equação 3.7})$$

onde L (espessura média do filme) e $(p_2 - p_3)$ (pressão parcial do vapor de água do lado superior do filme).

3.2.4.5. Propriedades mecânicas

A resistência à tração, deformação na ruptura dos filmes e módulo de elasticidade foram obtidos segundo o método D882 (ASTM, 1995), utilizando uma máquina universal de ensaios mecânicos EMIC (modelo DL3000). Os filmes foram cortados em corpos de prova retangulares ($2 \times 10 \text{ cm}$) e mantidos em dessecador durante 48 horas a $24 \text{ }^\circ\text{C}$ antes do início dos testes. O equipamento foi dotado de uma célula de carga de 500N e velocidade de tracionamento de 5 mm min^{-1} .

A resistência à tração foi calculada por meio da equação 3.8 e a deformação na ruptura de acordo com a equação 3.9.

$$\text{Resistência à Tração} = \frac{F}{S} \quad (\text{equação 3.8})$$

onde F (valor da força de ruptura) e S(área seccional do filme).

$$\text{Deformação} = \frac{L - L_0}{L_0} \quad (\text{equação 3.9})$$

onde L (comprimento de deformação do filme durante o experimento) e L_0 (comprimento inicial do filme).

O módulo de elasticidade foi calculado por meio da inclinação inicial da curva obtida tensão/deformação.

3.2.4.6. Análises Térmicas

A Termogravimetria (TG) é uma técnica utilizada para verificar a mudança de massa de uma substância em função da variação da temperatura, enquanto submetida a uma programação controlada. O aparelho utilizado foi TGA Q-500 (TA Instruments). Foram utilizados 3 mg de cada amostra em porta-amostra de platina. A programação utilizada foi: faixa de temperatura 10 a 600°C, com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, sob vazão dinâmica de nitrogênio na balança (40 mL min⁻¹) e ar sintético no forno (60 mL min⁻¹).

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) registra a energia calorífica absorvida ou liberada pela amostra durante o aquecimento ou resfriamento, em relação a uma amostra de referência. As curvas DSC foram obtidas utilizando-se um equipamento DSC Q100 (TA Instruments), utilizando porta-amostras de alumínio com tampa contendo as amostras (aproximadamente 3 mg de amostra). A programação utilizada para todas as análises foi: faixa de temperatura -50° a 230 °C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

3.2.4.7. Colorimetria

A coloração dos filmes foi determinada com um colorímetro Minolta (CR 400) (Minolta, Japão). Os valores de L^* , a^* , b^* e ΔE de cada filme foram avaliados por meio de medidas de refletância. Para a calibração do instrumento foi utilizado um fundo branco-padrão definido.

A partir do espectro de reflectância da amostra, podem-se obter os parâmetros colorimétricos L^* (luminosidade), a^* (intensidade de vermelho e verde) e b^* (intensidade de amarelo e azul) determinados pela CIE (*Comission International de l'Eclairage*) (CIE, 1986). Os valores de L^* , a^* e b^* matematicamente combinados permitem medir a cor utilizando a escala de cores Hunter Lab. A diferença total da cor (ΔE) foi calculada da seguinte forma (equação 3.10):

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{0,5} \quad (\text{equação 3.10})$$

onde: ΔL ($L_{\text{padrão}} - L_{\text{amostra}}$), Δa ($a_{\text{padrão}} - a_{\text{amostra}}$) e Δb ($b_{\text{padrão}} - b_{\text{amostra}}$).

Os valores de branco-padrão medidos foram: L (96,5), a (-0,16) e b (+1,96). Foram feitas 5 medidas em cada filme, sendo cada amostra realizada em triplicata.

Por este sistema, uma cor tem uma única localização específica numericamente em um espaço tridimensional esférico, definido por três eixos perpendiculares como ilustrado na FIGURA 3.3.

O eixo L^* (luminosidade) varia do preto (0) ao branco (100); o eixo a^* , do verde (-a) ao vermelho (+a) e o eixo b^* , do azul (-b) ao amarelo (+b).

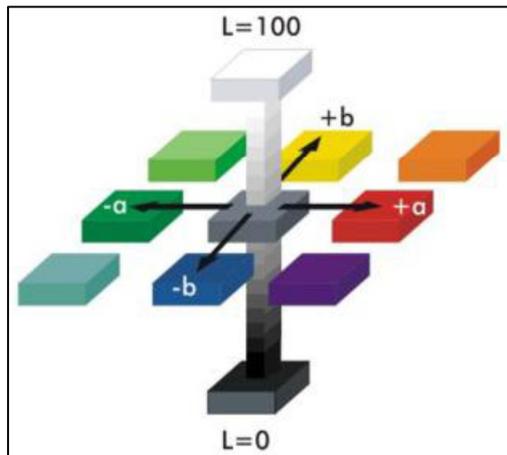


FIGURA 3.3: Parâmetros do sistema de cores da CIELAB.

Fonte: YUAN et al., 2007.

3.2.4.8. Análise estatística

Para a realização dos testes de caracterização, foram feitas três medidas de cada sistema, a fim de se confirmar os dados obtidos. Todos os resultados foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney, seguindo o nível de significância de 5%.

3.2.5. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada seguindo a metodologia do National Committee for Clinical Laboratory (NCCLS, 2003). Inicialmente, na avaliação da atividade antimicrobiana, foram feitos os testes de halo de inibição (método da difusão em ágar). Neste método, durante a incubação da placa de Petri a uma temperatura adequada para o crescimento do microrganismo teste, o agente antimicrobiano sofre difusão do disco de papel para o meio sólido. Um halo (zona transparente) de inibição é formado em volta do disco, onde não crescem colônias de microrganismos. O diâmetro do halo de inibição é proporcional à capacidade de inibição do microrganismo pelo agente.

Todo o material utilizado foi inicialmente autoclavado para eliminação de contaminantes. Para padronizar a densidade do inóculo bacteriano, fez-se uma solução padrão de turbidez de sulfato de bário, conhecida como Solução Padrão de McFarland 0,5. Sua densidade foi verificada utilizando espectrofotômetro UV-Vis, em comprimento de onda igual a 625 nm.

Foram utilizados papéis de filtro, previamente esterilizados, embebidos nas soluções filmogênicas, com 0,5 cm de diâmetro. Posteriormente, quatro discos foram dispostos em placa de Petri contendo o meio de cultura com ágar (pH 7,0) inoculado com as bactérias de interesse, com uma concentração de bactérias igual a 10^5 UFC mL⁻¹ (Unidade Formadora de Colônias), relativo ao padrão de McFarland, para cada microrganismo utilizado. Em seguida, as placas foram mantidas a 37 °C durante 24 horas (temperatura ideal de crescimento para *E. faecalis* e *E. coli*). As placas foram avaliadas pela formação da multiplicação microbiana ao redor do filtro e o diâmetro total foi medido. A área de inibição foi definida como a diferença entre a área total de zona de inibição e a área do filtro. Ensaio de Controle positivo e Controle negativo foram feitos em conjunto para a validação do método.

Se uma zona de inibição observada for maior que 1 mm, o efeito antimicrobiano é classificado como bom. Se a amostra é totalmente coberta pelas colônias de bactérias, a propriedade antibacteriana não é suficiente, como pode ser visto na FIGURA 3.4.

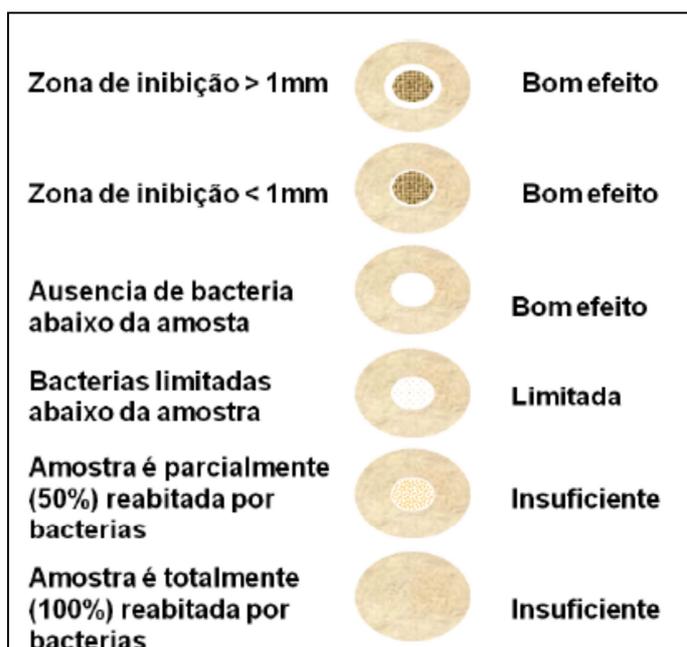


FIGURA 3.4: Níveis de capacidade antibacteriana do composto em função da presença do halo de inibição.

Fonte: FEITOR, 2010.

Após verificada a ação antimicrobiana dos filmes, realizou-se o teste da Concentração Mínima Inibitória (MIC). Esse método tem como base a mínima concentração do agente capaz de inibir o crescimento bacteriano. A observação do crescimento ou inibição das bactérias foi realizada por meio da turvação ou não do meio.

São feitas adições de solução filmogênica CMC/(NPAg-PVA) ao meio de cultura (pH 7,0) previamente inoculados com a bactéria de interesse (10^5 UFC mL⁻¹), totalizando um volume final de 10 mL, conforme a TABELA 3.1. O controle positivo contém 10 mL do meio de cultura com bactérias inoculadas e o controle negativo é constituído apenas pelo meio de cultura.

TABELA 3.1: Volume e concentração das soluções-teste CMC/(NPAg-PVA) no teste MIC.

Solução CMC/(NPAg-PVA)	Volume (mL)	Massa de prata (µg)	Volume final (mL)	Concentração final Ag (µg mL ⁻¹)
A	0,05	0,62	10	0,06
B	0,1	1,24	10	0,12
C	0,2	2,48	10	0,24

Posteriormente, foram deixados para incubação a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, analisou-se a turbidez da solução.

3.2.6. Avaliação da Toxicidade

3.2.6.1. Testes *in vivo* utilizando sementes de *Allium cepa*

A metodologia deste trabalho dos testes *in vivo* utilizando sementes de cebola (*Allium cepa*) para avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade foi baseada no trabalho de LEME e MARIN-MORALES, 2009.

A utilização de testes controle é necessária para que se possam estimar as variações naturalmente encontradas nos organismos testes e também às respostas que estes possam apresentar diante de situações experimentais. O herbicida Trifluralina é comumente utilizado como controle positivo (0,075g L⁻¹), devido a sua conhecida atividade mutagênica. Como controle negativo utilizou-se apenas água deionizada (mili-Q).

As sementes de *A. cepa* são submetidas à germinação em temperatura ambiente, em placas de Petri recobertas com papel de filtro umedecido com água deionizada (mili-Q). Quando as radículas atingiram 2 cm de comprimento, foram transferidas para frascos recobertos com papel alumínio e expostas ao tratamento com as concentrações do produto a serem analisadas por um período pré-estabelecido (24 horas). Cada frasco continha 10 radículas.

As soluções teste foram: Controle positivo, Controle negativo, solução filmogênica CMC/(NPAg-PVA) com concentração de prata igual a 1,24µg mL⁻¹ (C1= concentração 1 de nanopartículas de prata) e solução filmogênica com concentração de prata igual a 12,4 µg mL⁻¹ (C2 = concentração 2 de nanopartículas de prata).

Após as 24 horas de exposição, as raízes foram fixadas com fixador de Carnoy (álcool etílico: ácido acético 3:1). Após a etapa de fixação, as raízes foram removidas do reagente, lavadas com água destilada e submetidas à hidrólise ácida em uma solução de HCl 1M durante 9 minutos a 60 °C, a fim de facilitar a coloração na etapa seguinte. Nesta nova etapa, as raízes foram lavadas e colocadas em contato com o Reativo de Schiff durante 2 horas em local escuro. Lavam-se novamente as raízes até retirar todo o excesso de corante. A região meristemática das raízes foi cortada, colocadas sobre uma lâmina juntamente com 1 gota de carmim acético 2% e cobertas com uma lamínola, que foi utilizada para pressionar levemente e causar o espalhamento das células. As lâminas foram examinadas em um microscópio óptico (Carl Zeiss Microscopy, New York), com contagem média de 5000 células totais para cada concentração estudada.

Os resultados do teste foram calculados pelo Índice Mitótico (ação citotóxica) e Índice de Alterações Cromossômicas (ação genotóxica) das soluções filmogênicas com e sem nanopartículas de prata. Todos os resultados foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney, seguindo o nível de significância de 5%.

3.2.6.2. Testes *in vivo* utilizando ratos Wistar

Todos os procedimentos do presente estudo foram realizados de acordo com o Comitê de Ética da Embrapa Meio Ambiente no uso de animais, seguindo os princípios dos cuidados de animais de laboratório.

Ratos Wistar, pesando 230 ± 15 g obtidos da colônia de reprodução (Embrapa Meio Ambiente- Jaguariúna, São Paulo), foram alojados em gaiolas de policarbonato, com acesso total a comida (Nuvital Lab Chow) e água de torneira. As diretrizes nacionais e institucionais para habitação e tratamento foram seguidas. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura

controlada (22 ± 2 °C) a 70% de umidade com um ciclo de luz / escuridão de 12 horas.

Segundo a *Environmental Protection Agency* (EPA), como já citado anteriormente, doses diárias de prata equivalentes a $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de massa corpórea são aceitáveis, com improváveis riscos à saúde. Dessa forma, trabalhou-se com 3 concentrações da solução filmogênica contendo nanopartículas de prata: dose 1 ($1\mu\text{g}_{\text{Ag}} \text{ mL}^{-1}$), dose 3 ($3\mu\text{g}_{\text{Ag}} \text{ mL}^{-1}$) e dose 5 ($5\mu\text{g}_{\text{Ag}} \text{ mL}^{-1}$). Como controle negativo utilizou-se solução de CMC 1%.

As soluções foram administradas via oral, diariamente, em doses graduadas, aos grupos de animais, por um período de 28 dias, segundo guia para testes químicos (OECD 407, 2008). As soluções foram administradas por gavage, em dose única para os animais utilizando uma cânula de intubação adequada. 10 animais (cinco fêmeas e cinco machos) foram utilizados para cada dose (controle, dose 1, dose3 e dose 5).

Animais adultos jovens e saudáveis foram aleatoriamente designados para os grupos controle e tratamento. Durante o período de administração, os animais foram observados de perto, cada dia quanto a sinais comportamentais e da massa corporal. Todos os animais foram inspeccionados duas vezes por dia durante o decorrer do estudo. Além disso, eles foram monitorados de perto durante o período da manhã. No dia 29, cada animal foi pesado e depois sacrificados numa câmara de gás CO_2 .

Todos os animais sobreviveram até a data da necropsia, agendada após o período de alimentação de 28 dias. Observações e exames físicos semanais detalhados mostraram nenhuma toxicidade relacionada com o tratamento em animais de ambos os sexos em todos os quatro grupos de dieta.

Todos os animais do estudo foram submetidos a uma autópsia geral pormenorizada que incluía o exame da superfície externa do corpo, cavidades torácica e abdominal e seus conteúdos.

Para cada um dos animais sacrificados no final do estudo, os seguintes tecidos e órgãos foram dissecados e pesados: cérebro, fígado, intestino e íleo (parte final do intestino delgado). Os tecidos foram mantidos em formol 10%, resfriadas (- 20 °C) e encaminhados para análise histopatológica e análise de quantificação de prata. Para o exame microscópico, os tecidos foram embebidos em parafina, seccionados em 2 µm e corados com hematoxilina e eosina (H.E.) para confecção das lâminas (RUEHL-FEHLERT et al., 2003).

O teor de prata nos tecidos foi determinado pela análise ICP-OES (Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente)(Perkin Elmer Optima 7000 DV). A digestão das amostras foi feita utilizando-se ácido nítrico e perclórico. Preparou-se as curvas de calibração do aparelho com solução padrão de prata e procedeu-se à leitura das amostras.

Fez-se tratamento estatístico pela Análise de Variância (ANOVA) e Análise de Covariância (ANCOVA) (quando necessária), seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, usando *software* validado (SAS/STAT 9.3) (SAS Institute Inc. 2011). Considerou-se um nível de significância de 5%.

3.2.6.3. Ecotoxicidade em *Daphnia similis*

A toxicidade aguda (24 e 48 horas) das soluções filmogênicas foi conduzida de acordo com o guia OECD (OECD, 2004). Avaliou-se o efeito toxicológico de soluções contendo nanopartículas de prata sobre *D. similis*, mediante determinação da Concentração Efetiva 50% (CE50-24 e 48h), por meio da imobilidade dos microcrustáceos.

Neste estudo, cada solução teste foi realizada em triplicata, contendo ao todo 20 organismos. Foram utilizados neonatos de idade inferior a 24 horas, pois são os mais sensíveis. Os invertebrados foram previamente cultivados em aquários de 40 x 25 x 15 cm, com água decolorizada com as seguintes características físico-químicas: pH 7,8; dureza total 111,0mg L⁻¹ de

CaCO₃ e condutividade 0,38mS cm⁻¹. Os organismos foram mantidos em sala climatizada sob temperatura controlada a 20±2°C, luminosidade de 1.000 lux e alimentados com algas das espécies *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella pyrenoidosa*.

Cada amostra continha um volume final de 30 mL. Como controle negativo utilizou-se a própria água de cultivo. Os organismos foram expostos a diferentes concentrações finais da solução filmogênica: 0,01; 0,001; 0,0005; 0,0001; 0,00005 e 0,00001μg_{Ag} mL⁻¹. A exposição foi analisada após 24 e 48 horas do tratamento, pela imobilidade dos organismos.

Os resultados de imobilidade dos organismos face às diferentes concentrações do agente químico foram submetidos à análise para a determinação da C_E50-24 e 48h, e seus respectivos intervalos de confiança a 95%, utilizando-se o programa Statgraphics Plus (MANUGISTICS, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização das soluções de nanopartículas de prata-PVA e soluções filmogênicas

4.1.1. Síntese de nanopartículas de prata-PVA e soluções filmogênicas

Pela síntese descrita no item 3.2.1., a dispersão coloidal de nanopartículas de prata-PVA foi preparada e carboximetilcelulose foi adicionada para obtenção das soluções filmogênicas além de uma solução de CMC 1% pura. Enquanto a reação ocorria, alguns testes rápidos foram feitos para a verificação da total redução de Ag^+ a Ag .

A formação das nanopartículas de prata pode ser detectada visualmente devido a coloração amarelada da solução e a reação está descrita na equação 4.1. A solução coloidal apresentou um valor de pH igual a 8, efeito dos produtos da hidrólise do BH_4^- ($\text{BH}_2(\text{OH})_2^-$ e BO_2^-).



A cor amarelada característica observada na prata coloidal é resultado da absorção da radiação eletromagnética em ressonância com os *plasmons* de superfície. Essa coloração varia conforme o aumento das nanopartículas, indo do amarelo até cinza (coloração característica da prata em escala macroscópica). Esse fenômeno de ressonância de plasmon de superfície não ocorre com qualquer nanopartícula, já que há a necessidade de elétrons livres de condução em sua superfície, sendo o caso das nanopartículas de prata. As nanopartículas

metálicas possuem alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente sua agregação imediata para formação de ligações metal-metal.

O borohidreto de sódio foi adicionado na proporção 2:1 com o nitrato de prata. Em grande excesso pode atuar também como estabilizante. Isso ocorre pois os íons borohidreto adsorvem-se nas superfícies das nanopartículas, envolvendo-as e carregando-as negativamente. Estas cargas geram uma repulsão eletrostática entre as nanopartículas, evitando sua agregação. Essa condição de reação assim como tempo de agitação, velocidade e quantidades relativas de reagentes, deve ser rigorosamente controlada para a obtenção de prata coloidal estável. A adição de um excesso ainda maior de borohidreto pode aumentar a força iônica do meio, facilitando a agregação das partículas (HYNING et al., 2001).

SILVA et al. (2013) determinaram a melhor condição de síntese de nanopartículas de prata como sendo a relação $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ 3:1.

Neste trabalho, a escolha da proporção $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ 2:1 foi feita de tal forma a utilizar uma menor concentração de reagentes que proporcionasse efeitos satisfatórios nos testes aplicados.

4.1.2. Análise de espectroscopia UV-visível da dispersão coloidal de nanopartículas de prata-PVA

A síntese das nanopartículas de prata-PVA pode ser comprovada por análise espectrofotométrica por meio da observação da banda de ressonância plasmônica de superfície das nanopartículas (FIGURA 4.1). Pode-se observar uma banda intensa centrada em 399 nm, característica de nanopartículas de prata com formato esférico, fazendo com que haja apenas um modo de oscilação dos plasmons superficiais. A largura da banda relativamente estreita e simétrica indica uma pequena distribuição do tamanho das partículas. Para comparação, o espectro da absorção dos íons prata também é mostrado. Logo após o processo

de formação dessas nanopartículas, a solução tornou-se amarelada, conforme descrito no item anterior.

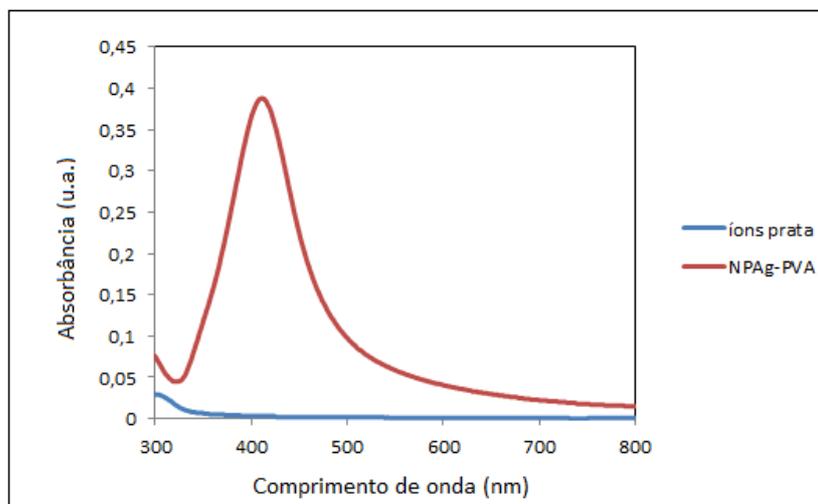


FIGURA 4.1: Espectros de absorção UV-Vis para nanopartículas de prata estabilizadas com PVA e íons prata livres.

Especificamente para as nanopartículas existe um *gap* entre a banda de valência e a banda de condução, diferente da estrutura de bandas do material em escala macroscópica. Essa mudança de característica de metal para isolante é observada se as partículas metálicas se tornam pequenas o suficiente para que efeitos de quantização ocorram. A energia da radiação eletromagnética necessária para promover elétrons da banda de valência para a banda de condução torna-se maior, ou seja, desloca-se para valores menores de comprimento de onda. Com excesso de íons Ag^+ , as partículas se tornam maiores e, conseqüentemente, essa energia desloca-se para valores maiores de comprimento de onda. Esse efeito é conhecido como efeito de confinamento quântico e é responsável pela mudança de cor do sistema, como observado na coloração amarela das nanopartículas de prata, diferente da cor prateada observada quando esse metal possui dimensões macroscópicas (SOLOMON et al., 2007).

De acordo com a teoria de Mie apenas uma única banda *deplasmon* é esperada no espectro de absorção de nanopartículas esféricas enquanto

partículas anisotrópicas podem dar origem a duas ou mais faixas de *plasmon* dependendo das formas diferentes das nanopartículas. O resultado prático dessa teoria é que para partículas de prata menores que cerca de 40 nm de diâmetro irá mostrar um forte pico acentuado que está localizado na faixa entre 380 a 420 nm. Este pico é o resultado de uma combinação de absorção e espalhamento de luz devido às interações com o campo de *plasmon* (XIA et al., 2009).

O valor obtido neste trabalho é condizente com valores descritos na literatura para nanopartículas esféricas, entre 15 e 25 nm, onde o comprimento de onda máximo está no intervalo 396 ± 5 nm (MELO et al., 2012). Quanto maior a agregação das nanopartículas de prata e, portanto, maior o seu tamanho, a banda se torna cada vez mais larga e com o máximo de absorção deslocado para maiores comprimentos de onda.

Os métodos de redução podem variar quanto ao tipo do agente redutor como da quantidade e concentração destes, bem como a temperatura de reação, velocidade de agitação e duração do processo de redução. Os diâmetros das partículas de prata resultantes da síntese dependem dessas condições. No trabalho de LIMA (2011), foi observado um pico de absorção em 390 nm, referente a solução de nanopartículas de prata de 20 nm sintetizadas via redução com borohidreto de sódio, mas sem utilização de um agente estabilizante. Sem adição de estabilizante, as nanopartículas apresentam um pico em menor comprimento de onda quando comparado ao pico apresentado pelas nanopartículas com uso de estabilizante. Esse fato pode estar associado à interação polímero/nanopartículas, gerando mudanças na banda plasmônica resultante.

SABATINI (2007) sintetizou nanopartículas de prata utilizando borohidreto de sódio em meio alcoólico (2-propanol e metanol) e verificou que houve um deslocamento do máximo de absorção para a região do vermelho, ou seja, região de menor energia quando comparadas com as preparadas em meio aquoso. As possíveis causas deste deslocamento podem ser atribuídas à presença

de partículas apresentando anisotropia de forma (elipsoides e nanobastões) ou também ao maior índice de refração dos álcoois quando comparados com o índice de refração da água.

4.1.3. Análise do tamanho das nanopartículas de prata-PVA

A análise do tamanho das partículas foi realizada utilizando-se a técnica de DLS. As nanopartículas de prata apresentaram um tamanho médio de $8,12 \pm 1,72$ nm (FIGURA 4.2). A vigorosa agitação da solução para formação das nanopartículas é um dos fatores para contribuição de um menor tamanho.

Estimando-se a área superficial das nanopartículas pela equação 4.2 (HIEMENZ e RAJAGOPALAN, 1997) temos um valor igual a $70,42 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$:

$$\text{Área superficial} = \frac{6}{\rho \times d} \quad (\text{equação 4.2})$$

onde: ρ é a densidade da prata ($10,49 \text{ g cm}^{-3}$) e d o diâmetro da partícula (8,12 nm). Sendo a massa de prata equivalente a 0,51 mg (APÊNDICE 1), a área ocupada pelas nanopartículas de prata-PVA é igual ao produto da área superficial pela massa, sendo igual a $3,50 \text{ cm}^2$.

A distribuição do tamanho médio das partículas é unimodal com baixa polidispersividade.

A síntese utilizando borohidreto de sódio como agente redutor resulta em nanopartículas de prata com menor tamanho quando comparada ao método com citrato, para iguais condições experimentais. Estudos demonstram que o aumento da concentração de citrato diminui a formação de clusters e promove simultaneamente o crescimento de partículas maiores (PILLAI et al., 2004).

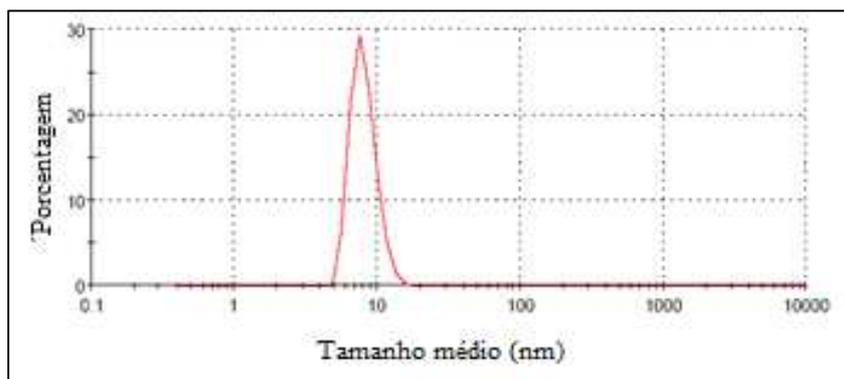


FIGURA 4. 2:Distribuição do tamanho médio das nanopartículas de prata-PVA obtida pela técnica de espalhamento dinâmico de luz.

A literatura relata casos em que ocorre o aumento e a diminuição do tamanho das partículas com uso de diferentes agentes de redução.

Neste trabalho foi utilizado borohidreto de sódio como agente redutor. PINTO (2008) obteve nanopartículas de prata entre 3 e 12 nm, por redução com borohidreto e, no caso do citrato, obteve partículas entre 38 e 122 nm. SOLOMON et al. (2007) obtiveram nanopartículas de prata de 12 nm de diâmetro utilizando borohidreto de sódio.

EMILIANE (2010) analisou o tamanho de nanopartículas de prata sintéticas Sigma e nanopartículas obtidas pelo método do citrato: as sintéticas apresentaram diâmetros médios de 180 nm e as obtidas pelo método de citrato de sódio apresentaram tamanhos variando entre 5,6 nm e 270 nm.

BARIOTO et al. (2004) utilizaram formaldeído sufoxilato de sódio hidratado (1mM), nitrato de prata (1mM) e PVA 10 mM (1:1:1 v/v) para produção das nanopartículas de prata e observaram partículas com distribuição entre 60 e 300 nm.

No estudo de PANACÉK et al. (2006) nanopartículas de prata foram sintetizadas pela reação de oxirredução utilizando-se $\text{Ag}(\text{NH}_3)^{2+}$. Os autores observaram que o pH influenciou no tamanho das nanopartículas. As partículas obtidas no pH 11,5 foram menores que em pH 12,5, variando entre 25 e 50 nm. Também houve redução da distribuição do tamanho com o abaixamento do pH. Nesse estudo, a solução de nanopartículas apresentou pH

igual a 9,0, corroborando o fato de menor tamanho das partículas em pH menores.

4.1.4. Análise do Potencial Zeta

A estabilidade das soluções filmogênicas foi avaliada analisando-se o potencial zeta. Na FIGURA 4.3 é apresentada a dependência de valores de potencial zeta com variação de pH. A estabilidade total de um colóide vai depender de seu potencial total, que é a soma do potencial devido ao solvente, do potencial atrativo e do potencial repulsivo.

Como carboximetilcelulose é comercializada como sal de sódio, quando dissolvida apresenta-se como éter aniônico de celulose e em toda faixa de pH a solução apresentou potencial zeta negativo. Em meio alcalino, a solução apresenta grupos COO^- dissociados. Já em pH ácido, verificou-se uma grande variação no potencial, em relação a pHs básicos, onde alguns grupos encontram-se protonados e outros desprotonados.

O sistema CMC/(NPAg-PVA) apresenta uma carga superficial negativa em toda a faixa de pH. Considerando a estabilidade da amostra em relação ao potencial zeta maior que 25 mV, em módulo, observamos que os pHs mais adequados são os pHs acima de 2,0, sendo que na faixa de pH 7,0-8,0 esse sistema continua estável para ser trabalhado. Este valor geralmente enquadra-se na faixa de pH ideal para a maioria dos sistemas biológicos (NETO et al., 2008).

O aumento (em módulo) do potencial zeta é considerado como indicativo da estabilidade da suspensão, já que maiores valores positivos ou negativos significam maior quantidade de cargas no meio de mesmo sinal sobre a superfície da partícula, o que leva a maior repulsão eletrostática entre elas e, conseqüentemente, maior estabilidade da suspensão coloidal.

Dessa forma, a incorporação de nanopartículas de prata-PVA manteve o sistema em estabilização.

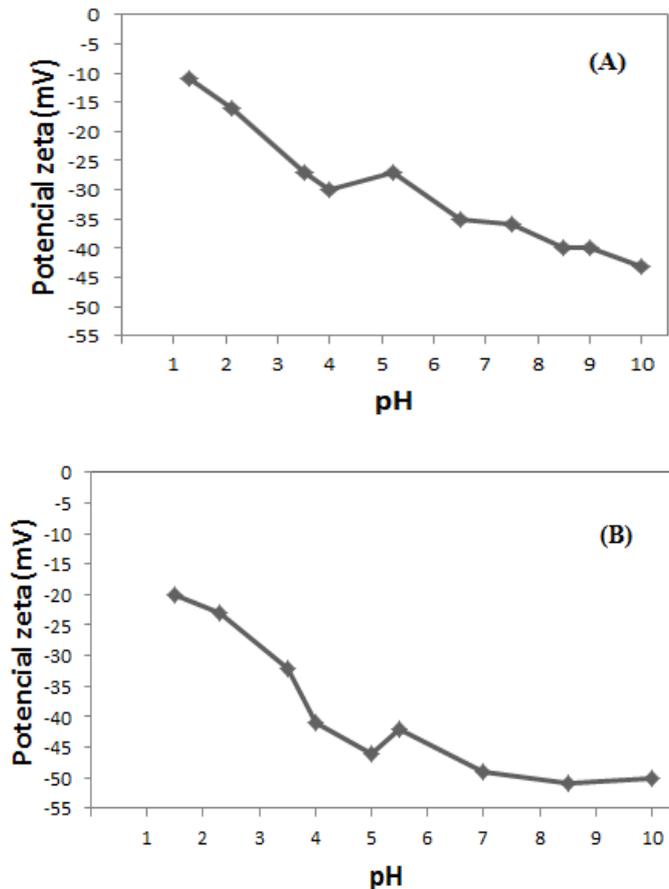


FIGURA 4.3: Dependência do potencial zeta com variação de pH em (A) solução filmogênica CMC e (B) Solução filmogênica CMC/(NPAg-PVA).

4.2. Caracterização dos filmes

4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/FEG)

A análise morfológica do filme contendo nanopartículas foi realizada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura/FEG (FIGURA 4.4). Uma micrografia de MEV/FEG também foi realizada com nanopartículas de prata-PVA pura.

Na micrografia das nanopartículas de prata-PVA pode-se observar uma coalescência, onde partículas de maior tamanho podem ser cristais de

NaBH₄, NaNO₃ e aglomerados. Não foi possível fazer um mapeamento atômico das partículas, pois o equipamento não tinha o acessório EDX (Espectroscopia dispersiva de Energia por Raio-X).

A agitação mecânica e o processo de secagem permitiram a morfologia observada na micrografia do filme CMC/(NPAg-PVA). A adição de CMC mudou o equilíbrio do sistema, tendo melhor dispersão e distribuição nanométrica. Pela concentração de PVA (0,98%), estima-se que seja nanopartículas de prata-PVA dispersas, o que corrobora os resultados mecânicos. No artigo de FRANCO (2009) observou-se a morfologia de CMC, apresentando aspecto homogêneo sem a presença de partículas.

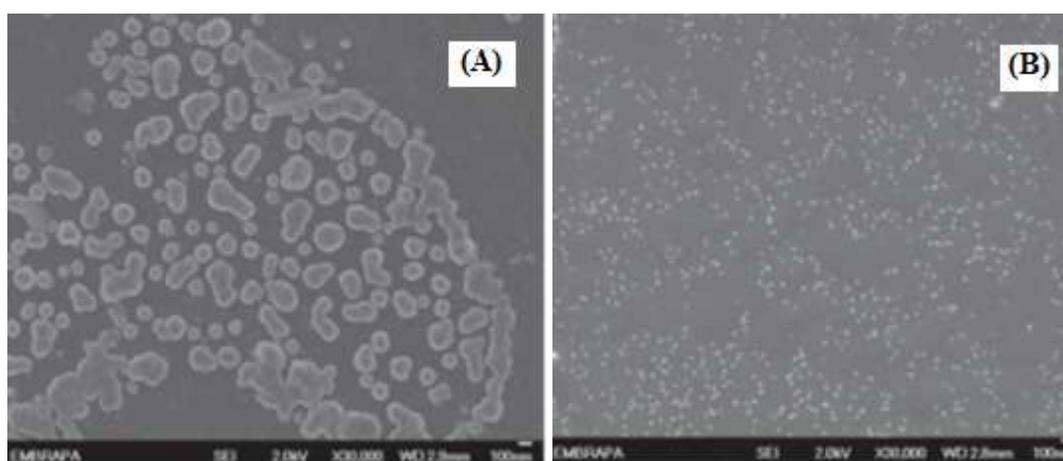


FIGURA 4.4: Micrografias de MEV/FEG: (A) Nanopartículas de prata-PVA e (B) filme de CMC/(NPAg-PVA).

4.2.2. Propriedades Mecânicas

Os filmes devem apresentar uma boa resistência durante sua manuseabilidade. Geralmente, uma alta resistência mecânica é requerida, podendo variar de acordo com a sua aplicação. Essas propriedades mecânicas dependem da interação entre seus componentes (PVA com CMC e outros inorgânicos presentes na reação como NaNO₃ e NaBH₄, por meio de ligações entre as cadeias.

Os efeitos das nanopartículas de prata-PVA, NaNO_3 e NaBH_4 nas propriedades mecânicas dos filmes podem ser observados no diagrama tensão-deformação típicos desse sistema na FIGURA 4.5. Os resultados dos ensaios mecânicos de tração estão presentes na TABELA 4.1.

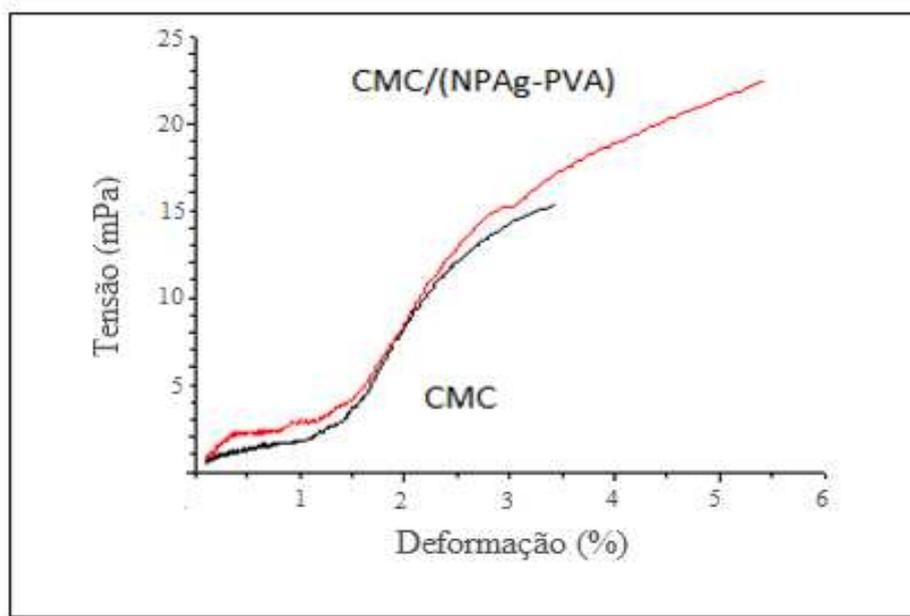


FIGURA 4.5: Curvas típicas tensão-deformação obtidas nos ensaios de tração de filmes de CMC na presença e ausência de nanopartículas de prata.

TABELA 4.1: Valores médios obtidos no ensaio tensão-deformação para filmes CMC e CMC/(NPAg-PVA).

Filme	Resistência à Tração (MPa)	Módulo de Elasticidade (MPa)	Deformação (%)
CMC	15,82±2,91	402,15±35,00	3,69±0,41
CMC/(NPAg-PVA)	26,43±4,20*	655,13±31,86*	5,18±1,42*

* Diferença significativa ($p < 0,05$).

Observou-se que a adição de nanopartículas de prata-PVA aos filmes aumentou significativamente a resistência mecânica do filme. A resistência à tração dos filmes CMC sem adição de nanopartículas de prata-PVA apresentou um valor de $15,87 \pm 2,96$ MPa. Com a inserção de nanopartículas de prata-PVA a resistência à tração aumentou para $26,48 \pm 4,23$, um aumento de

66,7% na resistência à tração. Dessa forma, ocorre um aumento das interações moleculares entre as cadeias poliméricas de CMC/(NPAg-PVA).

Uma adequada deformação dos filmes ativos é um atributo desejável na embalagem de alimentos, pois o envoltório mantém maior área de contato com o produto.

Os dados da tabela também mostram que a adição de nanopartículas de prata-PVA resultou em um acréscimo no módulo de elasticidade (Young) em 62,9%. Assim, uma maior energia é necessária para causar uma deformação nos ângulos e distâncias de ligações entre os átomos da cadeia polimérica, levando a este aumento da rigidez do material.

Na literatura encontram-se resultados semelhantes quando nanopartículas foram adicionadas em uma matriz polimérica para confecção de embalagens. A modificação das propriedades mecânicas foi observada por MOURA et al. (2009), quando incorporaram nanopartículas de quitosana em matriz HPMC e também por BAE et al. (2009), com a aplicação de nanoargilas em embalagens. A resistência mecânica à tração é equivalente a filmes convencionais de polietileno de baixa densidade (PEBD) (DOAK, 1986).

Comparando-se as propriedades mecânicas dos filmes de CMC/(NPAg-PVA) com os materiais apresentados na tabela 2.1, observou-se que é possível aplicação do CMC/(NPAg-PVA) como material embalagem pois as propriedades estão na mesma faixa de grandeza dos materiais utilizados. Assim, o aumento das propriedades mecânicas foi devido a incorporação do sistema NPAg-PVA, apresentando boa dispersão observada nos resultados de microscopia eletrônica de varredura.

4.2.3. Solubilidade do filme em água

A solubilidade de um filme em água é uma propriedade importante quando o objetivo desse filme é proporcionar a preservação de alimentos com

grande quantidade de água, sendo necessários filmes de baixa solubilidade. No entanto, em alguns casos, certa solubilidade é desejada, podendo ser vantajosa quando utilizadas, por exemplo, em alimentos revestidos quando cozidos ou alimentos com pouca quantidade de água.

A TABELA 4.2 apresenta a solubilidade dos filmes com e sem nanopartículas de prata. Os valores reportados são os valores médios de triplicatas de cada filme.

TABELA 4.2:Solubilidade em água de filmes: CMC e CMC/(NPAg-PVA).

Filme	Solubilidade (%)
CMC	96,48
CMC/(NPAg-PVA)	89,86

Os filmes contendo somente CMC apresentaram uma solubilidade maior em água. Assim, praticamente toda a película de CMC deve desintegrar-se quando imerso em solução aquosa, exibindo uma elevada solubilidade.

A solubilidade dos filmes decresceu significativamente quando nanopartículas foram incorporadas aos mesmos ($p < 0,05$). As nanopartículas podem reduzir as interações entre o polímero e as moléculas de água, causando um decréscimo na sua solubilidade.

Além da presença de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos na composição dos filmes, a concentração dos polissacarídeos é um dos fatores que afeta a sua solubilidade em água. MOURA et al. (2011) obtiveram maior solubilidade de filme de CMC 2% (100%) quando comparado a CMC 1% deste trabalho (96,48%) e a adição de nanopartículas de quitosana aos filmes causou um decréscimo na solubilidade.

CASARIEGO et al. (2009) verificaram que o aumento da concentração de quitosana de 1 % para 2 % levou a um aumento da solubilidade

em água. Os autores também observaram a diminuição da solubilidade em água quando incorporaram micro/nano partículas de argila nesses filmes.

4.2.4. Análise de FT-IR

O estudo das interações entre as nanopartículas de prata, PVA e CMC foi realizado pela análise de espectroscopia FTIR. Os espectros dos filmes CMC e CMC/(NPAg-PVA), assim como nanopartículas de prata-PVA e PVA puros são apresentados na FIGURA 4.6. Uma provável atribuição dessas bandas está descrita na TABELA 4.3.

TABELA 4. 3: Atribuições das bandas no espectro de FT-IR relacionadas ao PVA e CMC/(NPAg-PVA).

Número de onda (cm^{-1})	Grupo
PVA	
83	Vibração fora do plano –CH álcool
1092	Estiramento assimétrico C-O álcool
1384	Acoplamento entre grupos -OH
1634	Estiramento C=O acetato
2845	Alongamento simétrico -CH
2919	Alongamento assimétrico –CH e –CH ₂
3335	Deformação axial –OH
CMC/(NPAg-PVA)	
1056	Estiramento assimétrico C-O-C
1167	Estiramento assimétrico C-O éter
1615	Estiramento assimétrico COO ⁻
3431	Deformação axial OH (umidade)

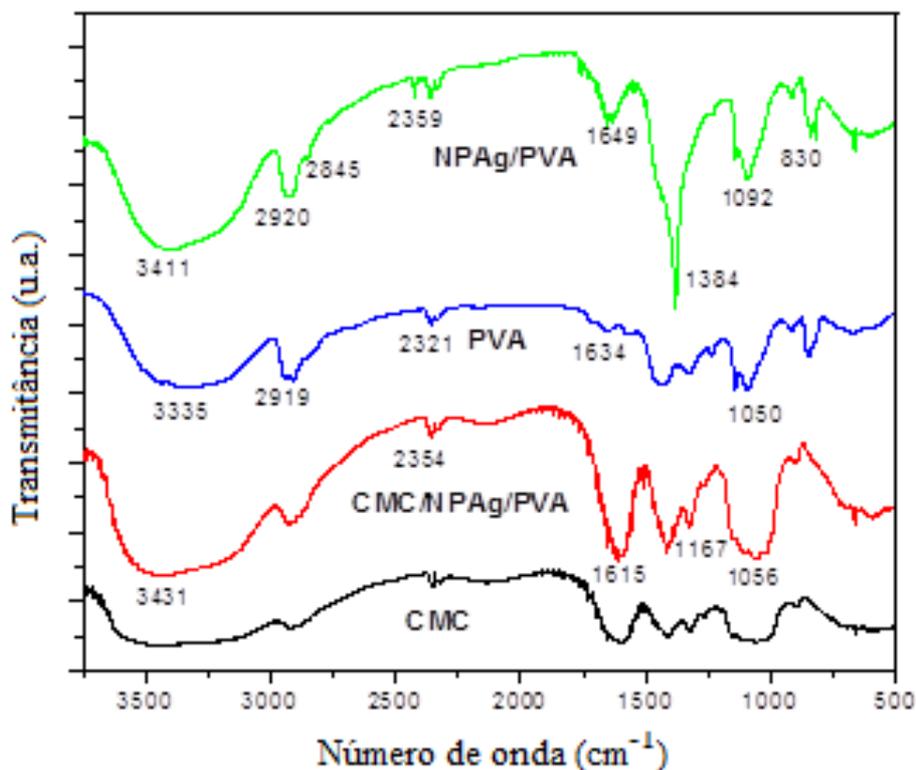


FIGURA 4.6:Espectro de FTIR dos filmes CMC e CMC/(NPAg-PVA), Nanopartículas de prata-PVA e PVA puros.

O PVA puro apresenta uma banda em 3335 cm^{-1} , referente ao estiramento do grupo OH, e uma banda em 2919 cm^{-1} , devido ao estiramento assimétrico do CH_2 alifático. A banda em 1634 cm^{-1} tem intensidade baixa para o PVA com alto grau de hidrólise, indicando que poucos grupos acetato estão presentes no polímero. A região em torno de 800 cm^{-1} corresponde às vibrações fora do plano do grupo OH. A banda em 1400 cm^{-1} corresponde à vibração do CH. O deslocamento e um pequeno alargamento da banda para 3411 cm^{-1} sugerem a interação entre nanopartículas com o grupo OH do PVA. A banda em 2845 cm^{-1} é atribuída ao estiramento simétrico do grupo CH. A banda em 2919 cm^{-1} praticamente não sofreu deslocamento ou alargamento, sugerindo a ausência de interações entre nanopartículas e grupo CH_2 . Banda em 1145 cm^{-1} refere-se à cristalinidade do PVA, onde não é observada no espectro de CMC/(NPAg-PVA), devido à biocompatibilidade.

Bandas na região de 2361 cm^{-1} correspondem ao CO_2 atmosférico. O espectro CMC/(NPAg-PVA) mostrou um pequeno deslocamento em relação ao filme sem nanopartículas, podendo indicar uma interação polímero-metal. Espectros semelhantes podem ser verificados por alguns autores no estudo de derivados de celulose (ROSCA et al., 2005; ADINUGRAHA e MARSENO, 2005).

Observamos um deslocamento em 1615 cm^{-1} , referente a interações entre nanopartículas e grupos COO^- . Bandas em 1056 cm^{-1} correspondem ao estiramento assimétrico de C-O do álcool e em 1167 cm^{-1} ao estiramento assimétrico do C-O do éter.

4.2.5. Permeabilidade ao Vapor de Água

Na TABELA 4.4 são apresentados os valores de permeabilidade ao vapor de água (WVP) para os filmes de CMC 1%, com e sem nanopartículas. A umidade relativa da parte inferior do filme foi semelhante para todos os filmes ($46,16 \pm 0,5\%$).

TABELA 4.4: Dependência da Permeabilidade ao Vapor de Água de filmes de CMC sem e com a adição de nanopartículas de prata.

Filmes	WVP (g.mm/KPa.h.m ²)	Espessura (mm)	Umidade relativa (%)
CMC	$3,67 \pm 0,22$	$0,03 \pm 0,003$	$45,62 \pm 0,52$
CMC/(NPAg-PVA)	$2,89 \pm 0,12^*$	$0,04 \pm 0,003$	$46,71 \pm 0,66$

* Diferença significativa ($p < 0,05$).

Podemos observar que a permeação de água através do filme CMC foi de $3,67 \pm 0,32\text{ g.mm/KPa.h.m}^2$. Quando houve a inserção de nanopartículas à matriz do filme, a permeabilidade sofreu um decréscimo para $2,89 \pm 0,12$

g.mm/KPa.h.m^2 , valor significativamente diferente ($p < 0,05$). Uma hipótese que pode ser atribuída a esse menor valor originado pela adição das nanopartículas é devido a presença das nanopartículas que ficam dispersas na matriz, dificultando a permeação da água através do filme. Com arranjo tipo labirinto na matriz, as nanopartículas atuam como barreiras que aumentam a tortuosidade e o livre caminho médio para a permeação, dificultando a passagem do vapor de água.

SOTHORNVIT e RODSAMRAN (2008) relataram valores semelhantes para filmes de purê de manga, com uma permeabilidade ao vapor de água igual a $2,6 \text{ g.mm/KPa.h.m}^2$, valor considerado para uma boa barreira de vapor de água quando comparado a outros filmes com base em purê de frutas.

MOURA et al. (2011) também obtiveram uma diminuição do valor de WVP quando inseriram nanopartículas de quitosana a filmes de CMC 2%.

O tipo de nanopartícula inserida em filmes pode diminuir significativamente os valores de WVP entre 20-30%. Pode-se atribuir esse decréscimo à presença de camadas dispersas de nanopartículas na matriz polimérica, aumentando assim a tortuosidade do caminho permeante da água. A inserção das nanopartículas de prata em CMC causou o decréscimo em 22% nos valores de WVP quando comparado ao filme sem nanopartículas, sendo uma vantagem para a necessidade de filmes com eficiente barreira ao vapor de água.

4.2.6. Análises térmicas

A caracterização térmica dos materiais foi realizada por meio da Termogravimetria (TG) e da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Os ensaios de Termogravimetria das nanopartículas de prata-PVA e dos compostos envolvendo CMC são apresentados na FIGURA 4.7 e TABELA 4.5.

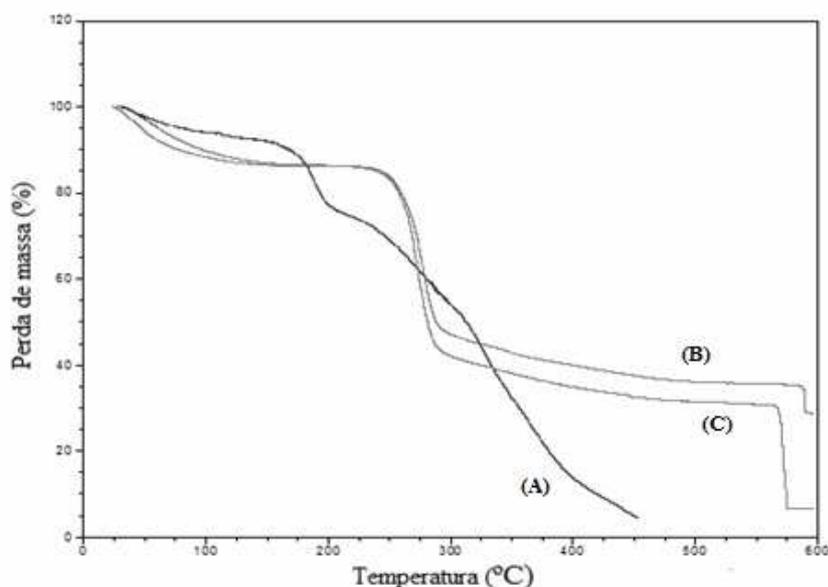


FIGURA 4.7: Curvas TG: (A) Nanopartículas de prata-PVA; (B) Filme CMC e (C) Filme CMC/(NPAg-PVA) em atmosfera de ar sintético (80% N₂ - 20% O₂ v/v).

TABELA 4.5: Composição de voláteis, orgânicos e resíduos dos filmes.

Tratamento	Voláteis	Orgânicos	Resíduos
NPAg-PVA	(25-100°C) – 8,90%	(150-450°C) – 83,50%	450°C – 7,60%
CMC	(25-200°C) – 14,40%	(200-595°C) – 50,31%	595°C – 35,29%
CMC/(NPAg-PVA)	(25-200°C) – 15,30%	(200-560°C) – 73,00%	560°C – 11,70%

A faixa de temperatura entre 25 e 150 °C corresponde à perda de voláteis nos filmes poliméricos, sendo esta perda majoritariamente de água adsorvida aos materiais. A perda de voláteis nos sistemas contendo CMC foi maior em relação ao sistema nanopartículas de prata-PVA. SENNA et al. (2014) obtiveram curvas termogravimétricas de CMC, PVA e blends CMC/PVA, em atmosfera de nitrogênio, e observaram resultado semelhante ao deste trabalho, com maior perda de voláteis para o CMC do que para o PVA. A maior perda de voláteis do CMC em relação ao PVA pode ser devido à maior quantidade de grupos funcionais por unidade de repetição que podem fazer ligações de hidrogênio com a água no CMC comparado ao PVA.

Com relação aos resíduos, observou-se pela termogravimetria que no sistema nanopartículas de prata-PVA, os resíduos em base seca equivalem a

7,60%, enquanto nos cálculos teóricos baseados na estequiometria da reação (APÊNDICE 1), o valor estimado foi de 17,00%. Como os mecanismos de reações para a degradação termoxidativa neste sistema ainda não foram determinados na literatura, essa diferença encontrada pode estar relacionada a processos físico-químicos como a volatilização de compostos formados com elementos que formariam sólidos (como prata e sódio).

Para as amostras de CMC, observou-se que a temperatura em que se inicia a última perda de massa antes do resíduo foi de 595°C para o CMC e, para o CMC/(NPAg-PVA), foi de 560°C. Também se observou maior perda de massa para o CMC/(NPAg-PVA), comparando-se ao CMC. Estas reduções podem ter ocorrido devido a reações de catálise de degradação da parte orgânica do CMC e/ou a volatilização de compostos formados com elementos que formariam sólidos (como prata e sódio) proporcionados pelos inorgânicos contidos no sistema nanopartículas de prata-PVA.

Os resultados dos ensaios de DSC são mostrados na FIGURA 4.8. Na faixa de temperatura de 0 a 150°C, observou-se na FIGURA 4.8 (A) uma endoterma referente ao processo de perda de voláteis, majoritariamente água. Na sequência, entre 150 e 220°C, verificou-se um pico exotérmico (190 °C) referente à degradação do PVA, como observado na curva TG, FIGURA 4.7 (A).

Para os filmes de CMC, FIGURA 4.8 (B) e (C), observou-se o processo endotérmico de perda de voláteis, já verificado na termogravimetria.

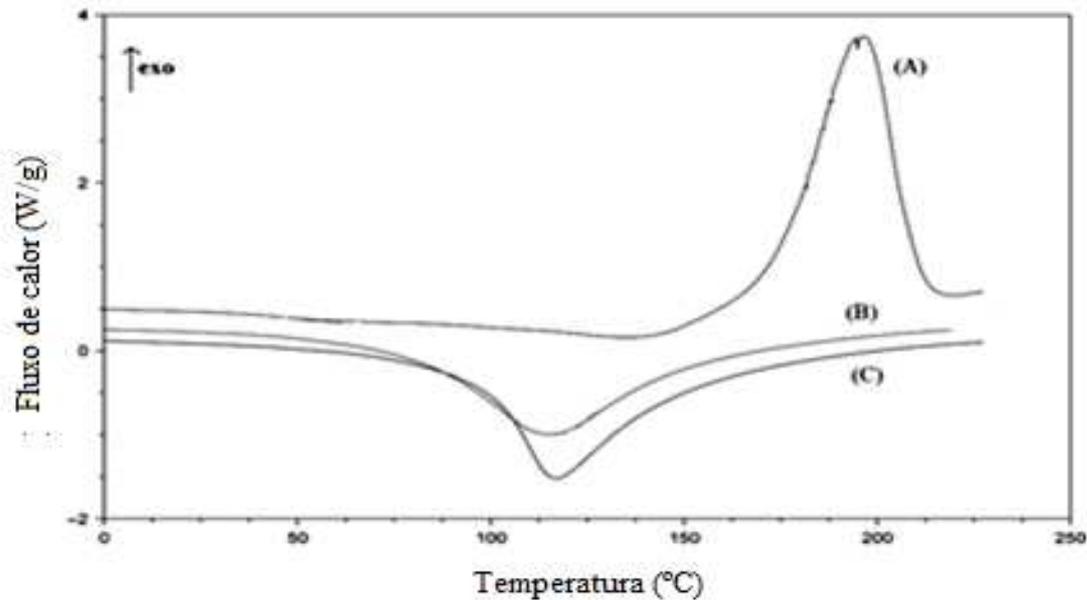


FIGURA 4.8: Curvas de DSC: (A) Nanopartículas de prata-PVA, (B) Filme CMC/(NPAg-PVA), e (C) Filme CMC.

4.2.7. Colorimetria

Todos os filmes apresentaram luminosidade e transparência tendendo ao amarelo, com características de transparência. Essa transparência (baixa opacidade) é importante em situações onde o filme é aplicado em alimentos, possibilitando a visualização da área tratada, além de permitir maior aceitação comercial em virtude de sua boa qualidade visual. Os resultados dos parâmetros de colorimetria estão apresentados na TABELA 4.6.

TABELA 4.6: Leitura colorimétrica dos filmes de CMC.

Filme	L*	a*	b*	ΔE
CMC	90,1±0,2	-0,6±0,1	2,8±0,3	14,1±0,1
CMC/(NPAg-PVA)	79,3±0,3*	4,1±0,1*	20,3±0,7*	26,1±0,3*

* Diferença significativa ($p < 0,05$).

Os filmes apresentaram uma transparência, sendo o filme com nanopartículas um pouco menos transparente que o filme de CMC, apresentando uma coloração tendendo ao amarelo.

Com relação à luminosidade (L^*) dos filmes é possível observar que estes valores estão dentro do padrão de luminosidade para filmes produzidos quitosana, obtidos por RHIM et al. (2006), onde o valor encontrado foi 85,8. Já para filme de quitosana com nanopartículas de prata, os mesmos autores encontraram um valor de 67, sendo um pouco abaixo do obtido neste trabalho. A inserção das nanopartículas de prata indicou uma diminuição da luminosidade.

Os parâmetros de (a^*) e (b^*) descrevem a cor de filmes partindo do branco tomado como padrão para calibração, sendo estas coordenadas cromáticas que influenciam a diferença de cor total. Os valores obtidos na leitura de (a^*) e (b^*) revelam resultados estatisticamente diferentes entre os filmes com e sem a adição de nanopartículas, reafirmando a intensificação da cor amarela do filme contendo as nanopartículas de prata.

O cálculo de ΔE nos fornecem a diferença total de cores e o valor encontrado para filme com nanopartículas (26,1) foi superior ao encontrado para o filme de CMC 1% (14,1). A diferença observada na coloração dos filmes sugere que a incorporação das nanopartículas de prata-PVA ao filme de CMC interferiu na coloração final. Mesmo assim, os filmes apresentaram baixa opacidade, atributo necessário para finalidade de embalagens de alimentos.

4.3. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A fim de se avaliar a atividade antimicrobiana das soluções filmogênicas, fez-se ensaios biológicos contra as bactérias *E. coli* e *E. faecalis*, por meio do teste de halo de inibição.

A FIGURA 4.9 mostra o ensaio realizado para análise do potencial antimicrobiano das soluções filmogênicas. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra.

Dessa forma, fez-se o teste de halo de inibição para verificar se as soluções em suas concentrações totais apresentariam ou não atividade

antimicrobiana. Na amostra contendo apenas CMC não houve formação de halo e ocorreu o crescimento bacteriano sob as amostras, resultando na incapacidade do filme constituído apenas por carboximetilcelulose na concentração de 1% atuar como agente antimicrobiano para as bactérias testadas.

Para as amostras contendo nanopartículas de prata-PVA, pode-se observar que houve a formação do halo de inibição em torno das amostras, podendo afirmar que o tratamento foi eficaz, pois houve repelência das bactérias pela superfície e não houve o seu crescimento. Os valores médios encontrados para a zona do halo de inibição, tanto para *E. coli* quanto para *E. faecalis* foram iguais a 3,0 mm e 2,8mm, respectivamente, sendo semelhantes. Dessa forma, pode-se salientar o efeito antimicrobiano sobre as bactérias em estudo.

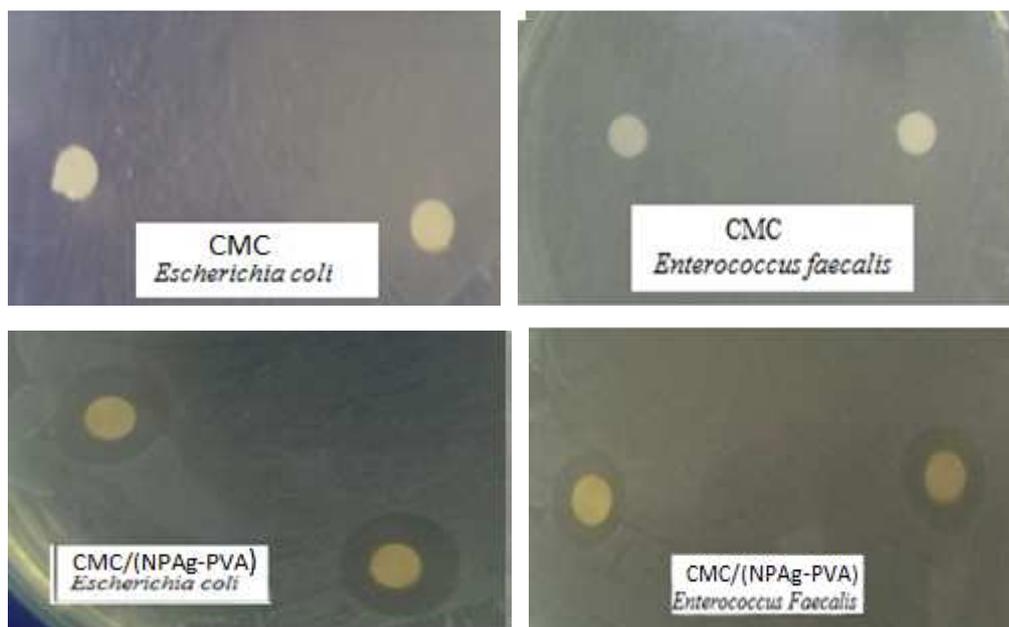


FIGURA 4.9: Teste do Halo de Inibição para as soluções filmogênicas de CMC e CMC/(NPAg-PVA).

A superfície do peptidoglicano de bactérias Gram-positivas é coberta, principalmente, por polissacarídeos neutros e ácidos, grande número de diferentes proteínas e ácidos teicóicos. Nas Gram-negativas, a camada de peptidoglicano é mais fina (~10 nm) e a superfície externa da célula possui uma

membrana constituída de proteínas, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos. Mesmo com essa camada mais grossa na Gram-positiva, o sistema contendo nanopartículas de prata foi eficiente na mesma proporção para ambas as bactérias.

Nas bactérias Gram-negativas, há uma distribuição assimétrica dos lipídios sobre as faces externa e interna da membrana externa. A face interna contém a maioria dos fosfolipídeos e a face externa contém todos os lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS contêm mais carga por unidade de área que os fosfolipídeos e a maioria desta carga é aniônica em pH neutro, devido à exposição de grupos carboxil e fosforil que podem ser ionizados. Estes grupos conferem à superfície celular uma densidade de carga negativa (ARAÚJO et al., 2010).

Há de salientar que este teste de halo apenas permite fazer uma avaliação qualitativa do efeito antimicrobiano da substância teste, sendo necessários testes quantitativos, como a Concentração Mínima Inibitória (MIC) para uma mais completa avaliação.

No teste de Concentração Mínima Inibitória (MIC), diferentes concentrações do agente inibidor foram utilizadas para determinar qual a concentração mínima do mesmo é capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. Neste trabalho, o agente antimicrobiano testado – nanopartículas de prata – foi incorporado em matriz polimérica, a fim de se avaliar se há a melhoria do efeito antimicrobiano quando essas nanopartículas são incorporadas na CMC.

As amostras foram adicionadas em tubos de 20 mL, onde o volume final foi de 10 mL em cada tubo. Foram adicionados 50, 100 e 200 μL da solução teste, contendo previamente meio de cultura com uma concentração de 10^5 UFC/mL juntamente com 10 μL da cultura bacteriana, além dos controles positivo e negativo. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 18 h.

Na TABELA 4.7 são apresentados os ensaios realizados. A turvação do Controle positivo, evidenciando o crescimento das bactérias, e o Controle negativo com meio límpido validou o teste aplicado.

TABELA 4.7: Concentração Mínima Inibitória (MIC) da solução CMC/(NPAg-PVA).

Solução	<i>Escherichia Coli</i> (CCCD E002)	<i>Enterococcus Faecalis</i> (ATCC 25922)
CMC/(NPAg-PVA) _{12,40} µg mL ⁻¹	0,12µg mL ⁻¹	0,12µg mL ⁻¹

Os ensaios obtidos na triplicata de cada amostra foram concordantes. Na FIGURA 4.10 podemos observar a inibição do crescimento de ambas as bactérias no tubo B, evidenciada pela ausência de turvação do meio.

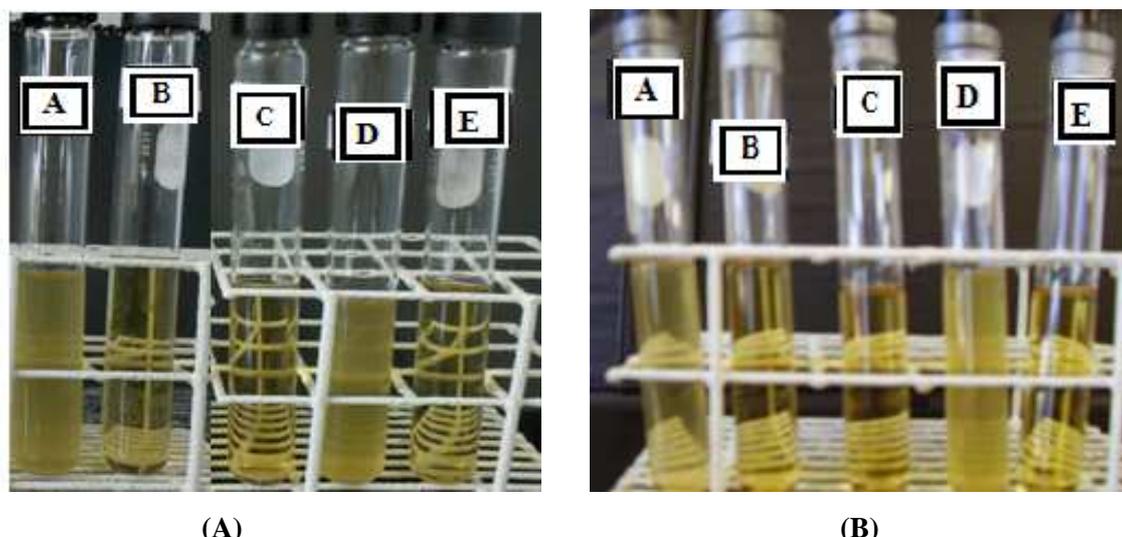


FIGURA 4.10: Resultados obtidos visualmente nos ensaios para a determinação do valor da concentração mínima inibitória realizados para solução CMC/(NPAg-PVA) (A) *Escherichia coli* e (B) *Enterococcus Faecalis*. A= solução (CMC/NPAg-PVA) 0,06 µg mL⁻¹ Ag., B=solução (CMC/NPAg-PVA) 0,12 µg mL⁻¹ Ag, C=(CMC/NPAg-PVA) 0,24 µg mL⁻¹ Ag, D=Controle positivo e E=Controle Negativo.

Pode-se observar a eficácia da incorporação das nanopartículas de prata-PVA contra bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus Faecalis*, apresentando um valor de MIC igual a 0,12µg mL⁻¹, para ambas.

Verificou-se a ação das nanopartículas de prata-PVA contra os dois tipos de bactérias, apresentando um mesmo valor de MIC. Os resultados desse estudo demonstram que as nanopartículas inibiram o crescimento das bactérias. Em um teste adicional, fez-se a análise do efeito da nanopartícula de prata sobre os microrganismos, para verificar se essas possuem efeito de inibição (bacteriostático) ou eliminação (bactericida). Uma alíquota de 15µL das culturas bacterianas que não apresentaram crescimento foi colocada em contato com novo meio de cultura e incubadas por 18h a 37 °C. Comprovou-se o efeito bactericida, sem a formação de crescimento microbiano.

Na literatura não há um consenso sobre os valores de MIC relacionados às nanopartículas de prata. Da mesma forma, o efeito de ação antimicrobiana dessas nanopartículas não está totalmente elucidado, mas acredita-se que envolva diferentes mecanismos. SONDI e SALOPEK-SONDI (2004), VOLKER et al. (2013) e LEE et al. (2007) também sugerem que nanopartículas de prata podem reagir com grupos fosfatos e com ligações sulfídicas (-SH) presentes na membrana celular. As nanopartículas, ao estabelecerem uma ligação com a membrana, podem provocar rupturas, aumentando a permeabilidade da membrana, causando danos no processo de respiração celular. Com isso, pode haver a liberação do conteúdo intracelular para o exterior, e, conseqüentemente, sua morte celular.

A composição química e o arranjo estrutural da superfície celular dos microrganismos também são muito complexos, devido à presença de uma grande variedade de grupos químicos. Estudos recentes sugerem que nanopartículas de prata estabelecem uma interação de dependência entre seu tamanho e forma com as células bacterianas. Nanopartículas produzidas por meio de diferentes processos e para diferentes propostas podem variar na carga de superfície e no estado de aglomeração (SANT et al., 2007).

A atividade antimicrobiana para *E. coli* de hidrogéis contendo nanopartículas de prata de diferentes tamanhos (2,67 nm, 6,63 nm e 21,11 nm)

foram examinados e comparados com nanopartículas de prata (220 nm) (MOHAN et al., 2007). Os resultados mostraram que as nanopartículas de prata de 2,67 nm protegidas por cadeias do polímero apresentaram uma excelente atividade antimicrobiana em relação às maiores nanopartículas. Estes autores concluíram que as nanopartículas de tamanho menor no hidrogel provavelmente se difundem mais facilmente que as maiores, o que explica a maior toxicidade na cepa estudada.

FOUDA et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de blendas poliméricas (carboximetilquitosana com poli(óxido de etileno)) com nanopartículas de prata contra *S. Aureus* e *E. coli*, pelo halo de inibição. Estes foram iguais a 20 e 15 mm para *S. Aureus* e *E. coli*, respectivamente. O diâmetro médio do halo de inibição para as nanopartículas foi de 12-18 mm à concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados indicaram uma excelente atividade antimicrobiana do compósito contendo nanopartículas comparada às nanofibras sem nanopartículas.

KIM et al. (2007) sintetizaram nanopartículas de prata por meio de nitrato de prata e borohidreto de sódio, com tamanho médio 13,5 nm. Eles observaram que *E. coli* foi inibida a baixas concentrações de nanopartículas (3,3 nmol L^{-1}), ao passo que a MIC para *S. Aureus* foi estimada em maior que 33 nmol L^{-1} . Este estudo sugeriu que a geração de radicais livres está envolvida de alguma forma com a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata. Na verdade, o estresse oxidativo foi observado em células após a interação com nanopartículas de prata. No entanto, a explicação descrita por LOK et al. (2007) difere de alguma forma sobre o envolvimento de radicais livres na atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata. Mais estudos são necessários, portanto, a fim de esclarecer o papel exato de radicais livres.

MORONES et al. (2005) estudaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata de pequeno tamanho (5 ± 2 nm) contra bactérias Gram-negativas. Essas partículas foram encontradas na membrana e no interior das

células e apresentavam tamanhos semelhantes, sugerindo que as partículas que interagem com a membrana são capazes de penetrar na bactéria. Assim, a penetração é dependente do tamanho das nanopartículas. As que apresentam tamanho entre 1 e 10 nm interagem preferencialmente com a bactéria.

Ao interagir, as nanopartículas podem penetrar para o interior da célula bacteriana. Neste caso, as bactérias mantêm o DNA compactado, comprometendo a sua replicação, já que esta depende da necessidade que o DNA se encontre no estado relaxado (FENG et al., 2000; LI et al., 2011).

KIM et al. (2011) reportaram valores iguais de MIC de nanopartículas de prata para *E. coli* e *S. aureus* ($100\mu\text{g mL}^{-1}$). Neste estudo, os autores relataram o efeito das nanopartículas de prata na liberação de proteínas pelo aumento da permeabilidade da membrana celular. Notavelmente, quantidade mais elevada de proteínas que atravessaram a membrana da *E. coli* comparada com a *S. aureus*, o que sugere a menor sensibilidade da bactéria Gram-positiva. Essa diferença é possivelmente atribuída à maior espessura da camada de peptidoglicano da *S. aureus*.

CHO et al. (2005) investigaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata preparadas com PVA como agente estabilizante e encontraram valores de MIC iguais a $5\mu\text{g mL}^{-1}$ e $10\mu\text{g mL}^{-1}$ contra Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativa (*E. coli*), respectivamente. Já JAIN et al. (2009) sintetizaram nanopartículas de prata (7-20 nm) envolvendo redução fotoassistida da prata. Obtiveram MIC iguais a $6,25\mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. coli* e $12,5\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. Aureus*. NETO (2010) obteve MIC de $150\mu\text{g mL}^{-1}$ para nanopartículas de prata, de 8-10 nm, contra *E. coli*.

Os resultados de inibição deste trabalho obtidos com menor concentração comparando-se com a literatura mostraram que a incorporação de nanopartículas de prata-PVA de 8,12 nm em uma matriz polimérica (CMC) proporcionou características antimicrobianas ao sistema, promovendo a possibilidade de utilizá-la como embalagens com propósito antimicrobiano.

Assim, partículas menores possuem uma maior área de superfície disponível para interação com a bactéria sendo, dessa forma, eficazes no combate a esses microrganismos. Os valores diferentes de alguns trabalhos da literatura, com nanopartículas de tamanhos semelhantes, podem ser devidos às cepas utilizadas.

4.4. Nanotoxicidade

4.4.1. Testes *in vivo* utilizando sementes de *Allium cepa*

Testar a citotoxicidade é a primeira etapa para avaliar o potencial tóxico de uma substância teste e pode ser feita por meio de testes *in vivo*. Este teste é feito por meio da exposição do organismo (semente-raiz) ao agente em estudo.

4.4.1.1. Efeitos citotóxicos

Os resultados do teste de *Allium cepa* foram utilizados para calcular o Índice Mitótico (IM) (equação 4.3), o Índice Mitótico Relativo (IMR) (equação 4.4), Índice de Alterações Cromossômicas (IAC) (equação 4.5) e o Índice de Alterações Cromossômicas Relativo (IACR) (equação 4.6). O Índice Relativo é obtido em relação com o controle negativo.

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de células em divisão}}{\text{Número total de células}} \times 100 \quad (\text{equação 4.3})$$

$$\text{IMR} = \frac{\text{IM}}{\text{Índice Mitótico do Controle Negativo}} \times 100 \quad (\text{equação 4.4})$$

$$\text{IAC} = \frac{\text{Número de células alteradas}}{\text{Número total de células}} \times 100 \quad (\text{equação 4.5})$$

$$\text{IACR} = \frac{\text{IAC}}{\text{Índice de Alterações Cromossômicas do Controle Negativo}} \times 100 \quad (\text{equação 4.6})$$

Todos os testes realizados não levaram à indução de morte celular. Pelos cálculos do Índice Mitótico Relativo, verificou-se que não houve uma ação citotóxica das amostras contendo nanopartículas, não havendo uma diminuição significativa dos índices (TABELA 4.8 e FIGURA 4.11).

TABELA 4.8: IM e IMR de células meristemáticas de *A. cepa* para as duas concentrações da substância teste, Controle Negativo e Controle Positivo.

Amostras	Número de células analisadas	Média±DP	IM	IMR
Controle Negativo	5235	132,1±35,3	13,3	1,0
Controle Positivo	5182	148,2±28,8	14,2	1,1
C1(CMC/NPAg-PVA) 1,24µg mL ⁻¹ Ag	5157	114,1±35,1	11,1	0,8
C2(CMC/NPAg-PVA) 12,40µg mL ⁻¹ Ag	5203	97,4±20,3	9,28	0,7

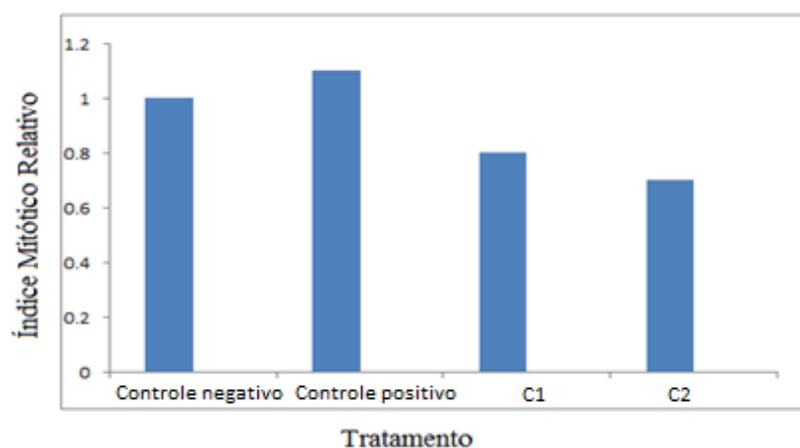


FIGURA 4.11: Efeito dos diferentes tratamentos no Índice Mitótico Relativo (IMR) em células de *A. Cepa* (C1= CMC/NPAg-PVA 1,24µg mL⁻¹Ag e C2= CMC/NPAg-PVA 12,40µg mL⁻¹Ag).

4.4.1.2. Efeitos genotóxicos

A análise dos efeitos genotóxicos apontou resultados significativos, após exposição das sementes de *A. cepa* ao herbicida trifluralina e para a maior concentração testada da substância contendo nanopartículas de prata-PVA (TABELA 4.9 e FIGURA 4.12). Os tipos de alterações cromossômicas encontradas estão apresentados na FIGURA 4.13.

TABELA 4.9: IAC e IACR de células meristemáticas de *A. cepa* para as duas concentrações da substância teste, Controle Negativo e Controle Positivo.

Amostras	Número de células analisadas	Média±DP	IAC	IACR
Controle Negativo	5235	8,4±3,9	0,82	1,0
Controle Positivo	5182	16,8±4,1	1,61*	2,0*
C1(CMC/NPAg-PVA) 1,24µg mL ⁻¹ Ag	5157	7,5±3,4	0,72	0,9
C2(CMC/NPAg-PVA) 12,40µg mL ⁻¹ Ag	5203	19,6±4,5	1,92*	2,3*

* estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo.

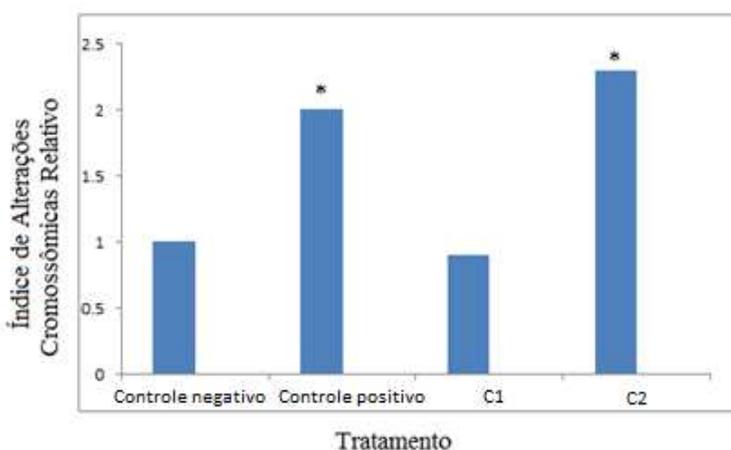


FIGURA 4.12: Efeito dos diferentes tratamentos no Índice de Alterações Cromossômicas Relativo (IACR) em células de *A. cepa* (C1= CMC/NPAg-PVA 1,24µg mL⁻¹Ag e C2= CMC/NPAg-PVA 12,40µg mL⁻¹Ag).

Utilizando-se a espécie *Allium cepa* como organismo teste para detecção dos efeitos citotóxicos e genotóxicos de soluções filmogênicas CMC/(NPAg-PVA), encontramos resultados significativos para a maior concentração de nanopartículas de prata-PVA, induzindo a um maior Índice de Alteração Cromossômica. Já a menor concentração de nanopartículas de prata-PVA não causaram alterações significativamente, em relação ao controle negativo, indicando que esses materiais foram menos tóxicos para as células de *A. cepa*.

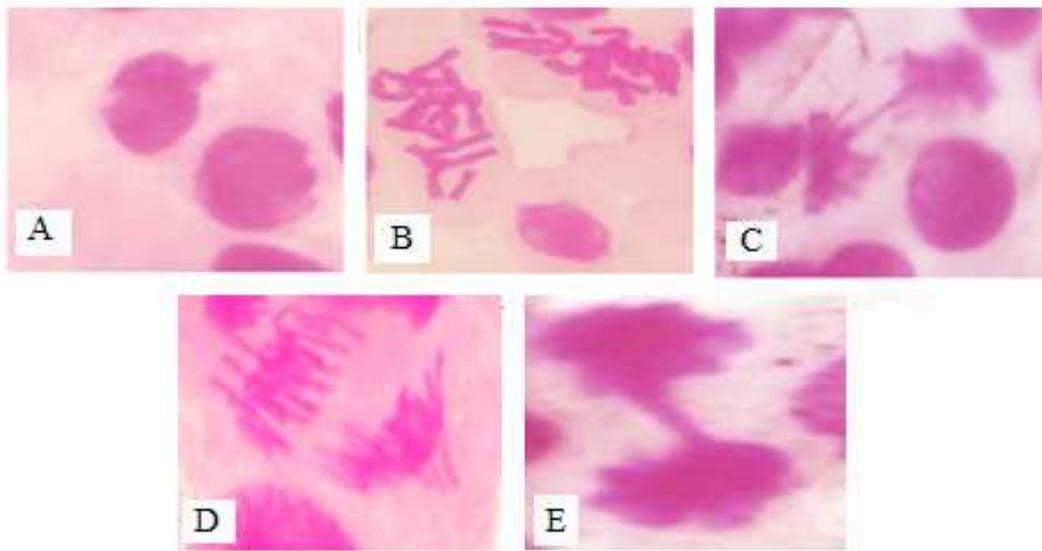


FIGURA 4.13: Alterações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa* após a exposição ao herbicida trifluralina e diferentes concentrações das soluções filmogênicas contendo nanopartículas de prata: A: Broto interfásico; B: C-metáfase; C: Anáfase com ponte; D: Anáfase poliplóide e E: Telófase com ponte.

Dentre as aberrações registradas, as pontes cromossômicas anafásicas foram as que apareceram em maior frequência para todos os tratamentos. As pontes cromossômicas que aparecem na anáfase podem ser decorrentes de trocas estruturais ocorridas, anteriormente, entre as cromátides de dois cromossomos diferentes ou entre as cromátides de um mesmo cromossomo. Os mecanismos da indução de pontes cromossômicas, em células com telômeros normais, por agentes que causem danos no DNA, ainda não são bem entendidos,

mas sugere-se que estejam relacionados com defeitos no sistema de reparo de quebras de fita dupla do DNA (ZHU et al., 2002).

Uma vez que a formação de pontes cromossômicas anafásicas foi o tipo de alteração cromossômica mais encontrada nas análises, pode-se sugerir que nanopartículas de prata-PVA com concentração de $12,4\mu\text{g mL}^{-1}$ atuem como um agente com propriedades clastogênicas.

PULATE et al. (2011) avaliaram o potencial genotóxico das nanopartículas de prata de $5\mu\text{g mL}^{-1}$ em células de *A. cepa* e o tratamento induziu a uma diminuição gradual no índice mitótico e aumentou a taxa de alterações cromossômicas tais como fragmentos de cromossomos, ponte cromossômica em anáfase, anáfase multipolar, etc.

PANDA et al. (2011) investigaram a indução de morte celular de células de cultura de *Allium cepa* incubadas com íons de prata (Ag^+), complexos de prata (AgCl), nanopartículas de prata biológica e comerciais (obtidas via redução química). Os resultados mostraram que nanopartículas de prata, tanto biológicas quanto comercial, exibiram efeitos biológicos similares originando menor extensão em efeitos citotóxicos e maior extensão nos efeitos genotóxicos quando comparadas aos íons prata. O composto AgCl foi o menos cito e genotóxico. Os resultados demonstraram envolvimento de radicais livres na morte celular e nas quebras cromossômicas induzidas pelas nanopartículas de prata.

Por este estudo, pode-se verificar que as células de *Allium cepa* foram eficazes em detectar efeitos genotóxicos de nanopartículas de prata-PVA com concentração igual a $12,4\mu\text{g mL}^{-1}$, induzindo a danos celulares.

Esta observação reforça a necessidade de estudos mais detalhados, sobre os efeitos de baixas concentrações de agentes potencialmente tóxicos. Dessa forma, fez-se a análise dos efeitos de nanopartículas de prata-PVA em animais para o estudo do acúmulo de prata nos órgãos e histopatologia,

assim como em microcrustáceo *Daphnia similis* para avaliação de uma toxicidade na liberação em ambiente.

4.4.2. Testes *in vivo* utilizando ratos Wistar

4.4.2.1. Análises histopatológicas

As análises microscópicas foram feitas a fim de se analisar os tecidos dos órgãos dos animais submetidos a soluções de CMC/(NPAg-PVA).

Essas análises ficaram um pouco prejudicadas devido aos artefatos encontrados nas lâminas que podem ser decorrentes da coleta e/ou processamento do material. No fígado, não foram observadas alterações no grupo controle, mas se observou uma vacuolização leve do citoplasma dos hepatócitos, sugerindo degeneração celular. A vacuolização ou degeneração dos hepatócitos ocorre devido a interferência de um agente no metabolismo dos ácidos graxos da célula, dificultando a utilização, transporte ou excreção causada pela solução contendo nanopartículas de prata (FILHO, 2004).

Quanto ao intestino, todos os grupos apresentaram artefatos (dilatação difusa das criptas), que são modificações na superfície do intestino.

Na literatura, encontram-se resultados semelhantes onde células espermatogônicas de ratos apresentaram reduzida viabilidade celular em testes *in vitro* com nanopartículas de prata de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (BRAYDICH-STOLLE et al., 2005).

KIM et al. (2010) avaliaram a toxicidade de nanopartículas de prata (56 nm) por um período de 90 dias e observaram uma alta incidência de hiperplasia no fígado, para ratos machos e fêmeas, sugerindo relação efeito-tratamento. No intestino, houve pigmentação das vilosidades nos ratos machos submetidos às maiores doses de nanopartículas (125 e 500 mg Kg^{-1}), sendo esse efeito menos pronunciado nas fêmeas.

O estudo histopatológico feito por JI et al. (2007) revelou vacuolização citoplasmática no fígado de ratos de ambos os sexos, com um aumento dependente da dose em fêmeas, quando submetidos a inalação de nanopartículas de prata. Resultados semelhantes foram reportados por SUNG et al. (2009), sugerindo uma concentração sem efeitos de $100\mu\text{g m}^{-3}$, para nanopartículas administradas por inalação.

Assim, a solução contendo nanopartículas de prata-PVA demonstrou a possibilidade de alterações, mesmo em uma dose bem abaixo das observadas acima, apresentando uma toxicidade relacionada à histopatologia.

Ainda há muitos questionamentos se a toxicidade é proveniente do íon prata ou das nanopartículas desse metal. KIM et al. (2009) sugeriram que a toxicidade referente a nanopartículas de prata é devido ao estresse oxidativo e independe dos íons prata; no entanto, a toxicidade pode não ter origem nas nanopartículas em si, mas ser resultante da capacidade de liberarem íons metálicos em solução (MUDUNKOTUWA e GRASSIAN, 2011), mas há ainda conflitos a serem elucidados.

4.4.2.2. Análise da concentração de prata nos órgãos

Após a quantificação de prata nos órgãos, apenas foram detectadas concentrações no íleo dos animais (FIGURA 4.14). O íleo é a parte final do intestino delgado (FIGURA 4.15) que mais absorve substâncias vindas do produto da digestão anterior. Essa absorção é feita por meio de vilosidades, na mucosa interna, sendo drenadas posteriormente para a corrente sanguínea.

No íleo, há a presença das placas de Peyer que estão presentes nesta parte do intestino. São agregados de nódulos linfáticos situados na parede delgada do íleo com a função de proteção contra infecções/agentes nocivos. O efeito protetor dessas placas quando submetidos à infecções experimentais estimulam os macrófagos, linfócitos B, células imunocompetentes e um

aumento do nível de IgA (anticorpos imunoglobulina) nas secreções intestinais. Pode haver uma dificuldade das nanopartículas de prata-PVA, incorporadas na CMC, de atravessar a mucosa dessa região, que é responsável pela absorção de parte das substâncias, ficando retidas. Em confirmação, na análise da distribuição de prata no íleo, LOESCHNER et al. (2011) verificaram a presença da prata nas células da submucosa.

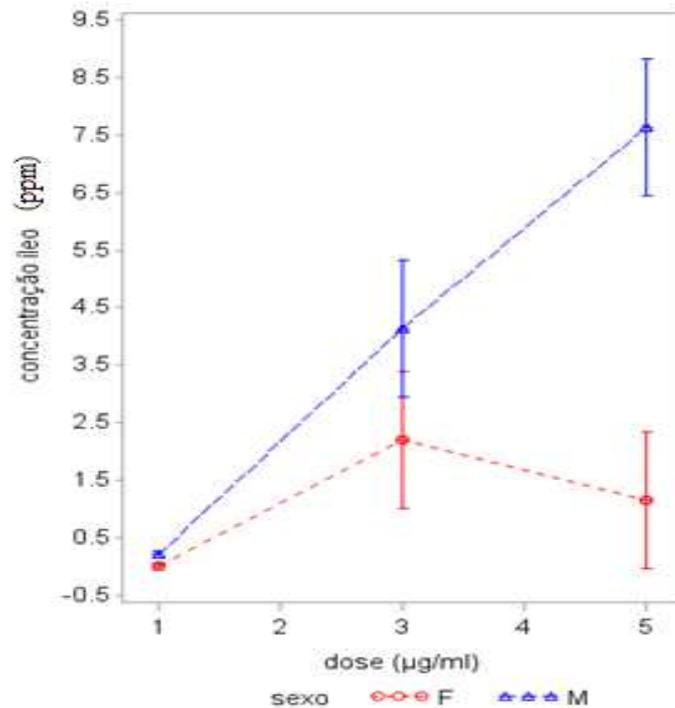


FIGURA 4.14: Concentrações médias de prata no íleo dos animais (machos e fêmeas) e seus respectivos desvios.

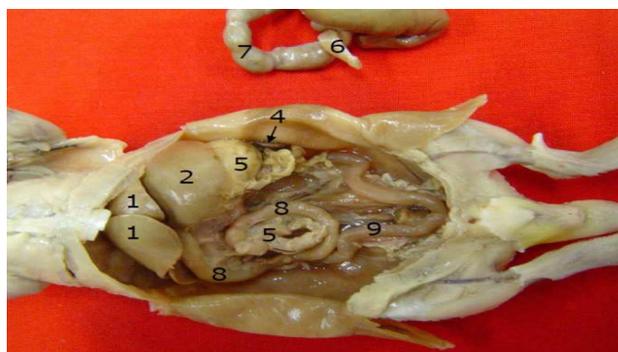


FIGURA 4.15: Vista ventral da cavidade abdominal de rato Wistar: 1: fígado, 2: estômago, 3:ceco (removido), 4: baço, 5: pâncreas, 6: íleo, 7: cólon, 8: duodeno, 9: útero.
 Fonte: Atlas Básico de Morfologia Animal – Universidade Federal Fluminense. Disponível em: <http://www.escolademorfologia.uff.br/index.html>.

O modelo usual de Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores assume erros com distribuição normal e independentes. A análise gráfica dos resíduos fornece bons indicativos para a verificação dessas suposições.

Foi ajustado um modelo de Análise de Variância contendo os efeitos fixos de sexo, dose e interação sexo/dose, considerando variâncias heterogêneas, uma vez que rejeitou-se a hipótese de variâncias homogêneas ($p < 0,05$). Ao rejeitar essa hipótese, concluiu-se que ao menos 2 dessas variâncias diferem entre si. Não houve diferença significativa entre os modelos com variâncias diferentes para cada dose (3 variâncias) e o modelo com apenas 2 variâncias diferentes (uma para a dose 1 e outra para as doses 3 e 5); logo este último foi escolhido pelo princípio da parcimônia (princípio pelo qual o modelo a ser escolhido deve ser o que tiver menor número de parâmetros).

A interação sexo/dose foi significativa ($p = 0,0037$) e assim sendo, foram feitos os desdobramentos para estudar os efeitos das doses em cada sexo e os efeitos dos sexos em cada uma das doses do nanocomposto (TABELA 4.10).

Houve diferenças, a 5% de significância, entre as concentrações médias nos íleos de machos e fêmeas, que receberam as doses 1 ($p = 0,0485$) e 5 ($p = 0,0010$). O que possibilitou detectar essa diferença com relação a dose 1 foi o fato de ter sido considerado o modelo com variâncias heterogêneas. Esse modelo possibilitou obter um intervalo de confiança mais preciso para as concentrações médias relacionadas a essa dose, resultando em interferências mais eficientes dos efeitos fixos do modelo.

Não houve diferenças significativas entre as concentrações médias encontradas nos íleos das fêmeas que receberam as diferentes doses do nanocomposto ($p = 0,1373$); já com relação aos machos a concentração média encontrada na dose 1 foi diferente das demais.

Para os machos, a tendência crescente das concentrações médias de nanopartículas em relação às doses do nanocomposto foi descrita por uma reta com inclinação igual a 1,88; assim, a um aumento de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ na dose do

nanocomposto corresponde um aumento de 1,88 ppm na concentração de nanopartículas encontrada no óleo.

TABELA 4.10: Concentrações médias e comparações múltiplas.

Sexo\Dose	1	3	5
F	0 a B	2,208 a A	1,158 a B
M	0,21 b A	4,1440 a A	7,642 a A

(letras minúsculas compararam as colunas (doses) e letras maiúsculas as linhas (sexos)).

O formato da partícula é considerado um dos fatores nas interações celulares e na distribuição sistêmica das nanopartículas, porém os resultados ainda são discrepantes, não sendo possível tirar conclusões gerais. O tamanho das nanopartículas também pode influenciar nas propriedades cinéticas (absorção, distribuição, difusão, metabolismo e excreção) e, portanto, nas propriedades tóxicas da partícula. O fator tamanho ainda causa conflitos em relação à nanotoxicidade: estudos comprovam que quando a superfície da partícula está estável a toxicidade é relativa ao tamanho; outros comprovam que nanopartículas de prata entre 15 e 30 nm são mais tóxicas que as de 55 nm (BAEZA-SQUIBAN et al., 2013).

Um trabalho de revisão mostrou possíveis rotas de nanopartículas sob diferentes formas de administração, dentre elas a ingestão. A ingestão de nanopartículas permite a absorção pelo trato gastrointestinal, podendo ser eliminada pelas fezes ou entrar na corrente sanguínea, onde são distribuídas para os diferentes órgãos, tais como fígado, rim, baço, sistema nervoso central, medula óssea, músculo e coração. Após a passagem pelo fígado, podem retornar ao trato gastrointestinal e serem eliminadas pelas fezes ou após a passagem pelo rim podem ser eliminadas na urina (OBERDORSTER et al., 2005). Estas rotas não consideram quantitativa nem qualitativamente os efeitos de nanopartículas.

Assim, podemos sugerir que as nanopartículas de prata-PVA deste trabalho incorporadas a carboximetilcelulose ficaram, em parte retidas no óleo,

sendo distribuídas no fígado (causando vacuolização), retornando ao trato gastrointestinal, sendo em parte eliminada pelas fezes; ou então, passar pelos rins, podendo ser eliminadas na urina.

KIM et al. (2008) estudaram o efeito de doses repetidas de 30mg Kg^{-1} nanopartículas de prata de 60 nm em solução de carboximetilcelulose 0,5% em ratos. Um aumento dose-dependente da concentração de prata foi observado, com as maiores concentrações no intestino, rim e fígado. Esse padrão de distribuição e concentração de prata nos órgãos foram semelhantes aos obtidos por LOESCHNER et al. (2011), quando doses de 15mg Kg^{-1} de nanopartículas de prata (15 nm) foram administradas oralmente por 28 dias, obtendo a maior concentração de prata no íleo.

Em relação a esses autores, mesmo com as concentrações e tamanhos diferentes, esses resultados semelhantes podem ser explicados pela menor taxa de absorção de prata a partir de uma solução mais estabilizada pela carboximetilcelulose.

No mesmo trabalho, LOESCHNER et al. (2011) obtiveram um alto índice de excreção de prata nas fezes de ratos que receberam nanopartículas (70%), estando de acordo com os menores valores de prata encontrados nos órgãos desses mesmos ratos, em comparação com ratos administrados com acetato de prata. Assim, a possível dissolução do material nanoparticulado no sistema gastrointestinal deve ser levada em consideração.

DZIENDZIKOWSKA et al. (2012) observaram a maior concentração de prata nos tecidos oriundas de nanopartículas de 20 nm, em relação a nanopartículas de 200 nm. Além disso, uma alta concentração de prata foi encontrada na urina 1 dia após o início do teste, mantendo-se elevado durante 14 dias, com diminuição nos 13 dias finais. Já nas fezes, a quantidade de prata foi maior nos 2 primeiros dias, com posterior decréscimo.

KIM et al (2010) obtiveram um aumento dependente da dose na concentração de prata no intestino e no sangue, indicando que a prata absorvida

oralmente é capaz de entrar na corrente sanguínea e ser distribuída nos órgãos. Houve uma diferença relacionada ao gênero no acúmulo da prata nos rins, com o dobro de prata encontrada nos rins das fêmeas, comparado aos machos, no estudo da toxicidade de nanopartículas de 56 nm durante 90 dias.

Como consequências que a dosagem excessiva de prata pode causar ao ser humano estão problemas neurológicos, nos rins, indigestão, dores de cabeça e a Argyria, patologia que causa o azulamento da pele (FUNG e BOWEN 1996).

4.4.2.3. Análise da massa corpórea dos animais

Com o objetivo de verificar possíveis alterações na massa corpórea dos ratos devido ao efeito das doses, foram analisados os perfis de massas diários dos ratos por meio do ajuste do modelo linear misto, que possibilitou modelar os perfis médios. O modelo que melhor ajustou-se aos dados apresentou os efeitos de sexo, dose, sexo*dose, dia, sexo*dia, dose*dia e sexo*dose*dia na parte fixa, efeitos aleatórios de intercepto e dia e variâncias dos erros diferentes em cada dia (SAS/STAT 9.3 - mixed models).

De acordo com testes de efeito fixo, não houve efeito da interação dose/sexo ($p=0,9245$), nem de sexo ($p=0,1761$) e tampouco de dose ($p=0,1671$) no ganho de massa diário. Assim sendo, não houve evidências para rejeitar a hipótese de paralelismo entre as retas dos controles e das doses 1, 3 e 5 dos dois sexos, como também entre as retas médias dos dois sexos e entre as retas médias das 4 doses. Ainda, sendo o efeito de idade significativo ($p<0,05$), as retas médias apresentaram uma mesma inclinação. Quanto aos interceptos, não foram significativos os efeitos da interação dose/sexo ($p=0,419$) e de dose ($p=0,6685$), sendo somente significativo o efeito de sexo ($p<0,05$), o que equivale dizer que as retas das doses em cada sexo são além de paralelas também coincidentes.

De acordo com o modelo escolhido, apenas os efeitos de dia e sexo foram significativos, ou seja, não houve diferenças entre os ganhos de massas de machos e fêmeas nas diferentes doses, havendo somente diferença entre os sexos com relação às massas iniciais dos animais.

Depois de escolhida a estrutura de covariâncias, um modelo reduzido com relação a parte fixa foi ajustado, sendo os perfis médios das massas corpóreas descritos por apenas duas retas paralelas, uma para cada sexo.

Foi possível obter um bom ajuste, usando modelo linear misto, que descreveu de forma apropriada os perfis médios de massas, assim como as variâncias e as correlações ao longo do tempo no mesmo rato e entre eles.

A FIGURA 4.16 apresenta os perfis médios de massas (tracejados) e os perfis individuais, separados por doses e a FIGURA 4.17 apresenta os perfis médios ajustados pelo modelo reduzido e os perfis individuais.

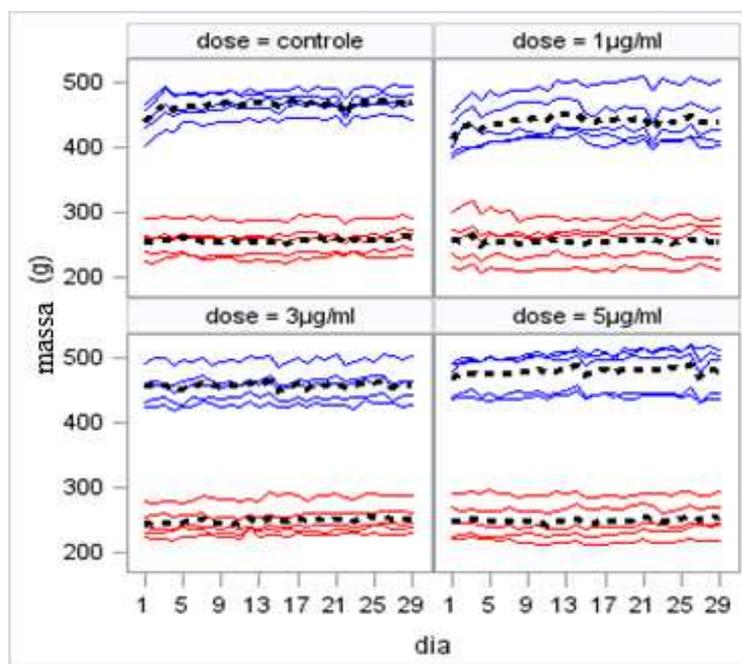


FIGURA 4.16: Perfis individuais e médios das massas corpóreas dos animais (Macho em azul e Fêmea em vermelho).

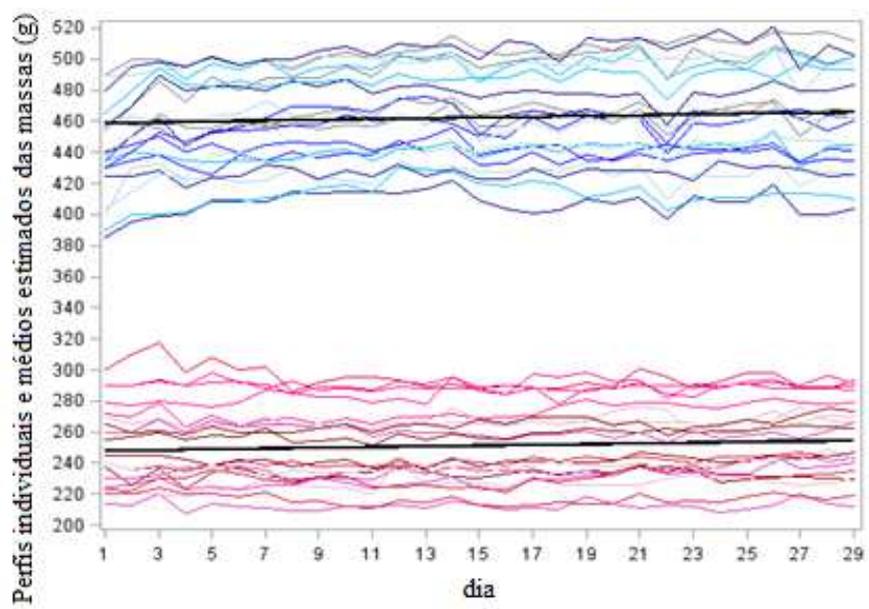


FIGURA 4.17: Perfis individuais e perfis médios ajustados pelo modelo reduzido.

KIM et al. (2010), no estudo relatado anteriormente, também relataram que não houve mudanças significativas relacionadas a dose na massa corporal de fêmeas; no entanto, também observaram um decréscimo na massa dos machos na quarta semana de exposição a nanopartículas de prata, não havendo diferenças significativas no consumo de comida e água entre todos os ratos dos grupos controle e tratamento.

SLEIMAN (2012) estudou a evolução da massa corporal na avaliação dos efeitos reprodutivos de nanopartículas de prata (60 nm) em ratos Wistar expostos durante a puberdade e constatou que não houve diferença estatística significativa na evolução da massa corporal dos animais, ao longo do experimento, entre os animais do grupo tratado e do grupo controle.

Sendo assim, houve relativa linearidade e similar desenvolvimento dos animais de ambos os grupos. As nanopartículas não causaram alterações no crescimento dos animais que pudessem prejudicar o desenvolvimento corporal normal destes.

4.4.2.4. Análise da massa dos órgãos

Como a hipótese de normalidade dos erros nos modelos de análise de variância (ANOVA) não foi rejeitada, o mais indicado é usar os testes paramétricos. Na análise paramétrica um único modelo é ajustado aos dados sendo os resultados analisados conjuntamente, enquanto na análise não-paramétrica as comparações são feitas separadamente em subconjuntos dos dados.

Para aumentar a precisão na verificação dos efeitos de dose, sexo e interação sexo/dose nas massas dos órgãos, foram testados modelos incluindo a covariável massa corpórea inicial.

A relação massa do fígado e dose encontra-se na FIGURA 4.18.

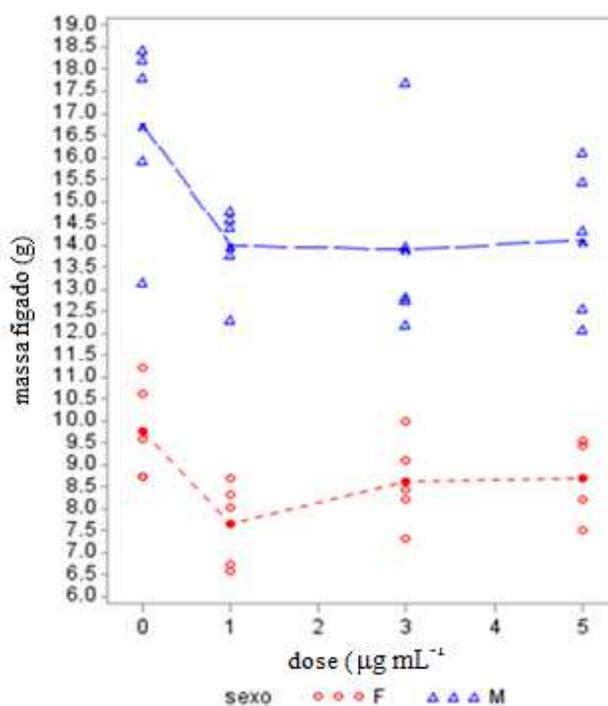


FIGURA 4.18: Relação massa do fígado dos machos e fêmeas com respectivas doses.

Na análise da massa do fígado dos animais, houve uma relação linear significativa entre a massa do animal no início do experimento e a massa

do fígado, tanto para os machos como para as fêmeas, logo, a covariável massa inicial foi incluída nos modelos, para explicar parte da variabilidade da resposta. Não foram testadas outras covariáveis como, por exemplo, massa do animal no final do experimento pois não pode haver efeito do tratamento nas mesmas.

Nos machos, a Análise de Covariância (ANCOVA) demonstrou que o efeito de dose foi significativo, pois rejeitou-se a hipótese de igualdade entre as massas médias dos machos que receberam as diferentes dosagens do nanocomposto ($p=0,0027$), ou seja, pelo menos 2 das massas médias diferem entre si (FIGURA 4.19).

A massa média estimada dos fígados dos machos do grupo controle foi igual a 16,94g ($\pm 0,62$ g), considerando machos pesando 443g no início do experimento. Ao aumento de 10g na massa inicial do animal corresponde um aumento de 0,49g na massa do fígado.

De acordo com os resultados dos testes de Tukey, a 5% de significância, concluiu-se que a massa média dos fígados dos machos do grupo controle diferiu das massas médias dos fígados dos machos que receberam as doses 3 e 5.

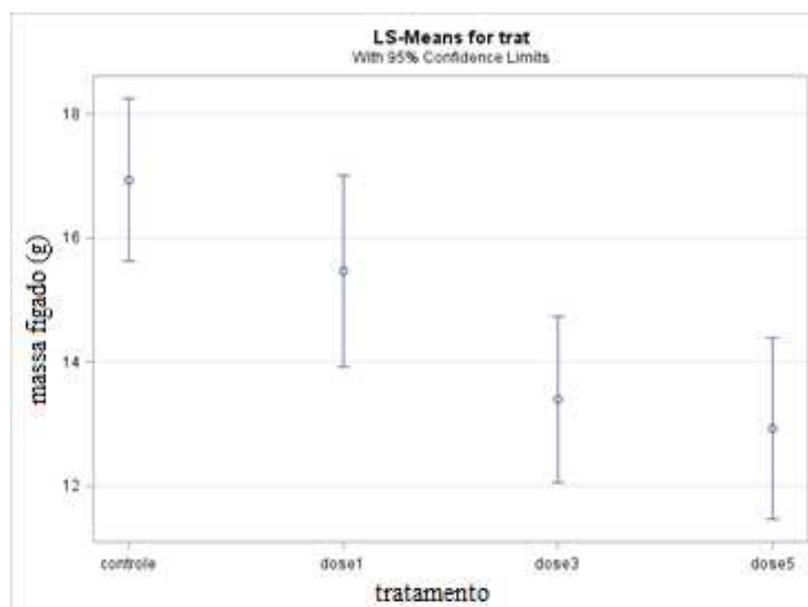


FIGURA 4.19: Massas médias estimadas dos fígados de machos por dose e respectivos intervalos de confiança.

A tendência decrescente das massas médias dos fígados dos machos com o aumento das doses do nanocomposto foi descrita por uma reta com inclinação igual a $-0,83$; assim, um aumento de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ na dose do nanocomposto corresponde a uma diminuição de $0,83\text{g}$ nas massas médias dos fígados.

Para as fêmeas, o efeito de dose também foi significativo, pois se rejeitou a hipótese de igualdade entre as massas médias das fêmeas que receberam as diferentes dosagens do nanocomposto ($p=0,0010$), ou seja, pelo menos 2 das massas médias diferem entre si (FIGURA 4.20).

A massa média estimada dos fígados das fêmeas do grupo controle foi igual a $9,67\text{g}$ ($\pm 0,28\text{g}$), considerando fêmeas pesando 253g no início do experimento. Ao aumento de 10g na massa inicial do animal corresponde um aumento de $0,27\text{g}$ na massa do fígado.

De acordo com os resultados dos testes de Tukey, a 5% de significância, conclui-se que a massa média dos fígados das fêmeas do grupo que recebeu a dose 1 difere das massas médias dos fígados das fêmeas dos demais grupos, ou seja, o nanocomposto diminuiu significativamente o tamanho do fígado nessa dose.

Para explicar o tipo de relação entre as massas dos fígados das fêmeas em função das doses seria necessário um polinômio de grau 3 (e esse passaria exatamente por todos os pontos).

A parte que cabe ao intestino nesse caso é aquela onde o íleo foi retirado, constando então do restante do órgão, incluindo intestino grosso. Na análise dos machos, quando todas as observações foram consideradas, a análise de diagnóstico do modelo destacou uma observação atípica na dose 1 (apontada no gráfico) como sendo bastante influente. Nesse caso, foram feitas as análises incluindo e excluindo a mesma, apresentando os mesmos resultados. Nesse caso, seguimos com os testes sem o ponto atípico.

A relação linear entre a massa do intestino e a massa do animal no início do experimento foi significativa ($p=0,0022$) e, desse modo, a covariável massa inicial contribuiu para reduzir a variabilidade das observações e das estimativas das variâncias e erros padrões.

Pela Análise de Covariância (ANCOVA) não houve diferenças significativas entre as massas médias dos intestinos dos machos que receberam as diferentes doses do nanocomposto ($p=0,17$) (FIGURA 4.22).

A massa média estimada dos intestinos dos machos do grupo controle foi igual a 12,22g ($\pm 0,51$ g).

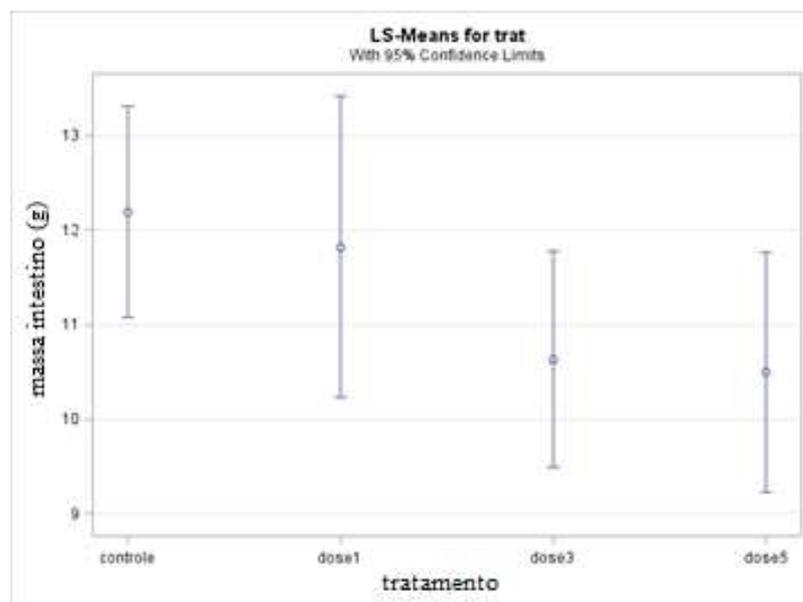


FIGURA 4. 22: Massas médias estimadas dos intestinos dos machos por dose e respectivos intervalos de confiança.

Assim como para os machos, não houve diferenças significativas entre as massas médias dos intestinos das fêmeas que receberam as diferentes doses do nanocomposto ($p=0,77$) (FIGURA 4.23).

A massa média estimada dos intestinos das fêmeas do grupo controle foi igual a 8,35g ($\pm 0,48$ g).

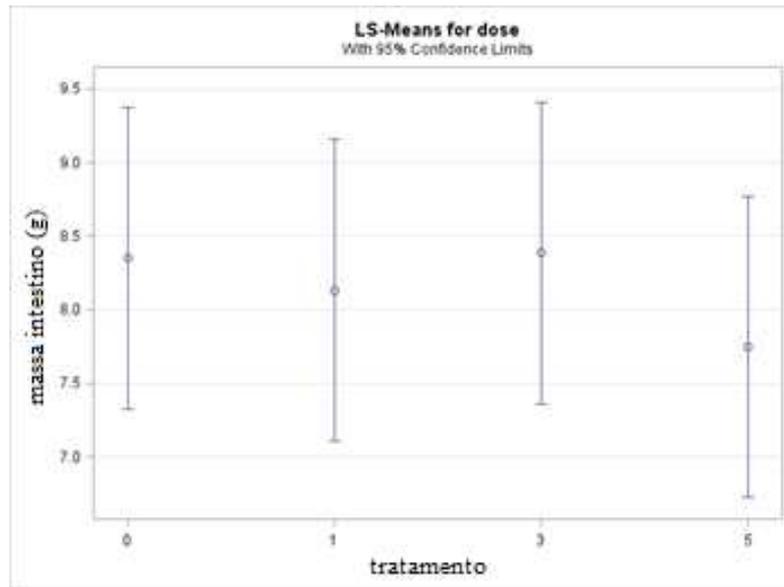


FIGURA 4. 23: Massas médias estimadas dos intestinos das fêmeas por dose e respectivos intervalos de confiança.

A análise da massa do cérebro dos animais relacionados às doses está na FIGURA 4.24.

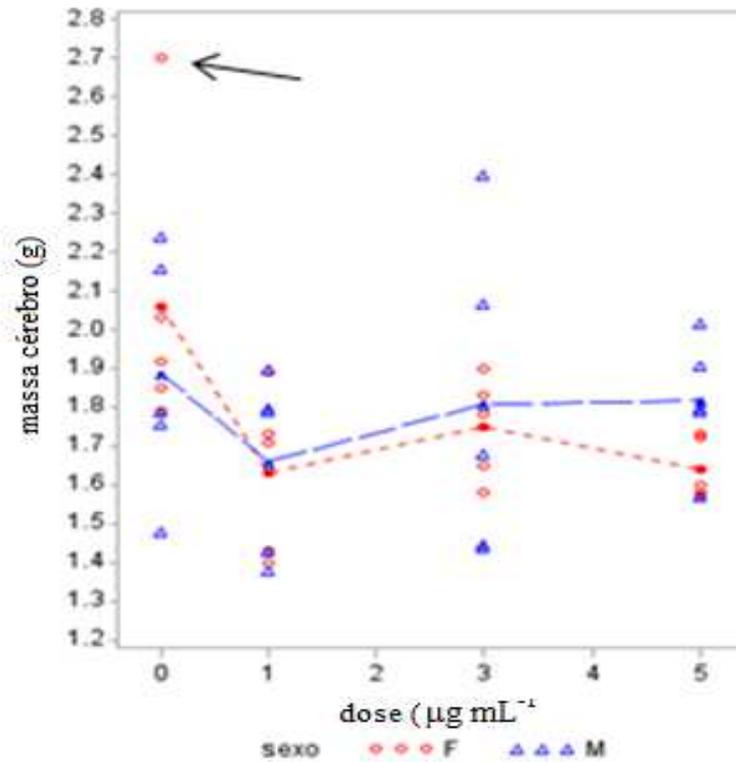


FIGURA 4. 24: Relação entre a massa do cérebro dos animais e doses.

Para os machos, a covariável massa inicial não contribuiu para explicar parte da variabilidade das massas dos cérebros dos machos, e assim ajustou-se o modelo de ANOVA e, de acordo com o mesmo, não houve efeito das doses nas massas dos cérebros dos machos ($p=0,6822$) (FIGURA 4.25). A massa média estimada do cérebro dos machos do grupo controle foi igual a $1,88g (\pm 0,13g)$.

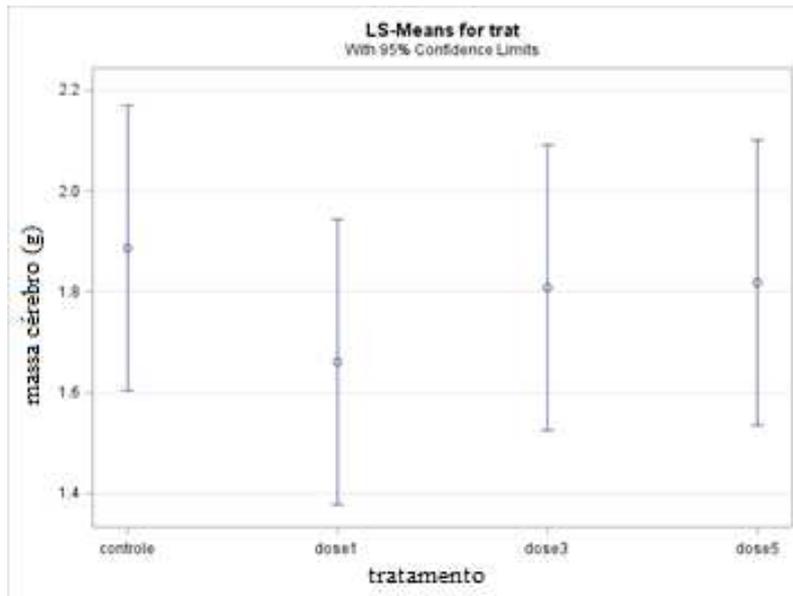


FIGURA 4.25: Massas médias estimadas dos cérebros dos machos por dose e respectivos intervalos de confiança.

Para as fêmeas, observamos um ponto atípico (apontada na FIGURA 4.24). Foram feitas as análises incluindo e excluindo-a. Nas duas situações, a relação entre a massa do cérebro e a massa do animal no início do experimento não foi significativa e assim ajustou-se os modelos de ANOVA. A massa média do cérebro das fêmeas do grupo controle foi igual a 1,89g ($\pm 0,07$ g).

Em ambas as observações, considerando 5% de significância, os testes de Tukey não detectaram diferenças significativas entre as massas médias nas diferentes doses (FIGURA 4.26).

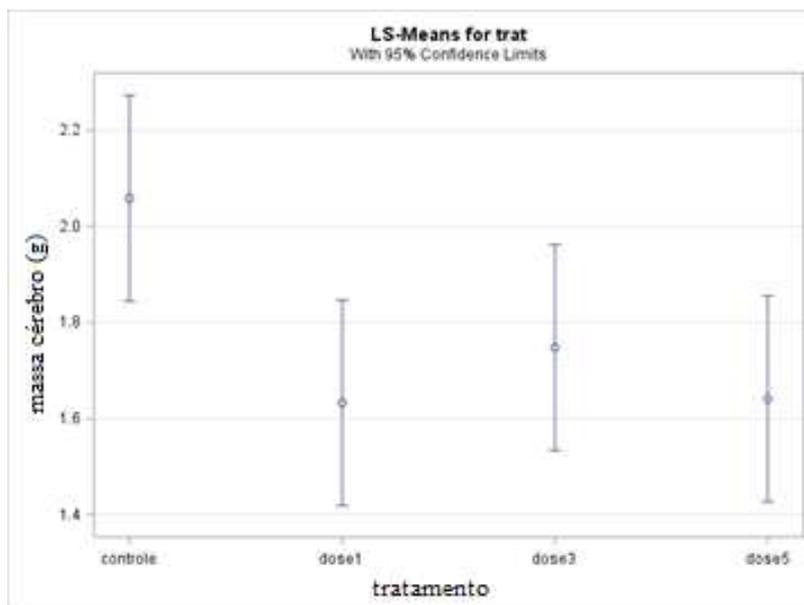


FIGURA 4.26: Massas médias estimadas dos cérebros das fêmeas por dose e respectivos intervalos de confiança.

A relação entre a massa dos íleos dos animais e as doses está na FIGURA 4.27.

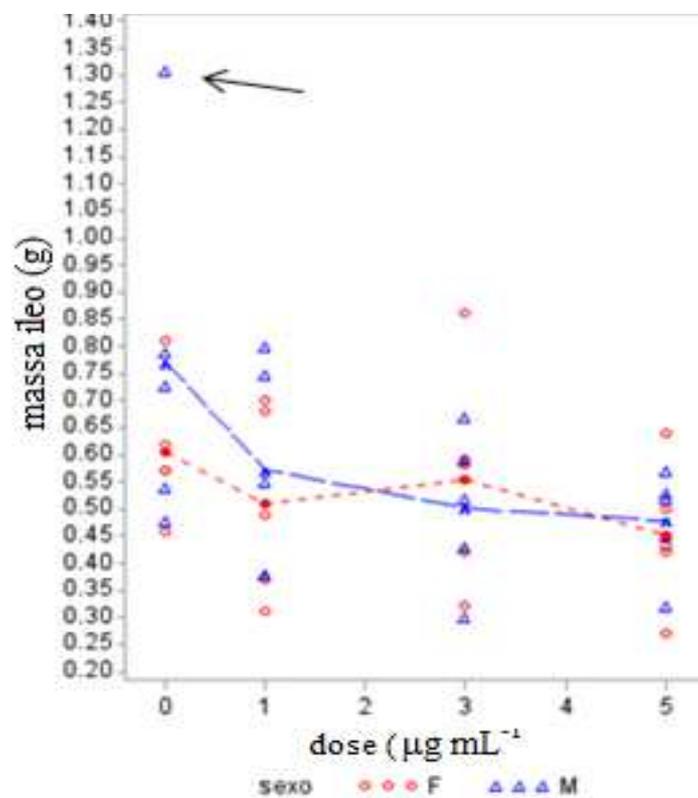


FIGURA 4.27: Relação entre as massas do íleo dos animais e doses.

Ao analisar os pontos relativos aos machos, podemos observar um ponto atípico. Da mesma forma como feito acima, foram feitas as análises considerando e eliminado esse ponto.

Nas duas situações, a relação entre a massa do íleo e a massa do animal no início do experimento não foi significativa e assim ajustou-se os modelos de ANOVA. Em ambos os casos, não houve efeito das doses nas massas médias dos íleos dos machos (FIGURA 4.28). A massa média estimada do íleo dos machos do grupo controle foi igual a 0,63g($\pm 0,07$ g).

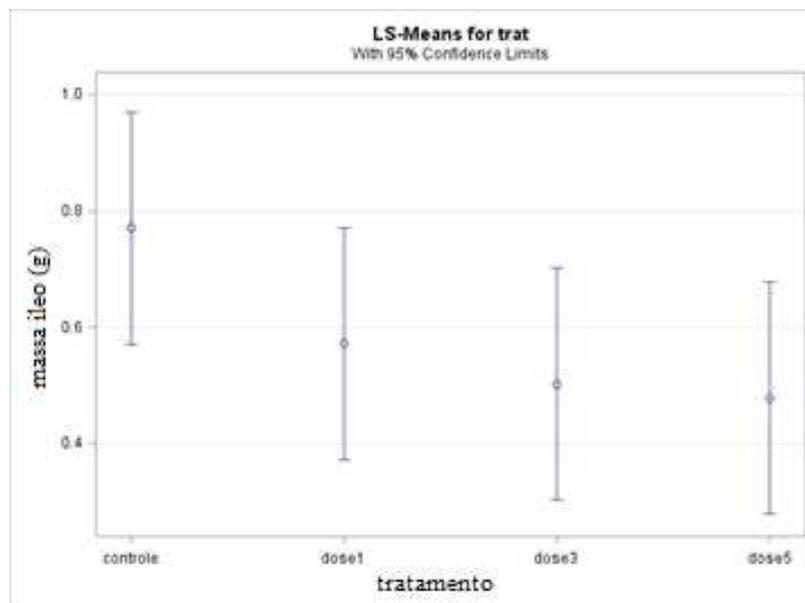


FIGURA 4.28: Massas médias estimadas dos íleos dos machos por dose e respectivos intervalos de confiança.

Para as fêmeas, assim como para os machos, não houve diferenças significativas entre as massas médias dos íleos das fêmeas que receberam as diferentes doses do nanocomposto (FIGURA 4.29). A massa média do íleo das fêmeas do grupo controle foi igual a 0,6g ($\pm 0,07$ g).

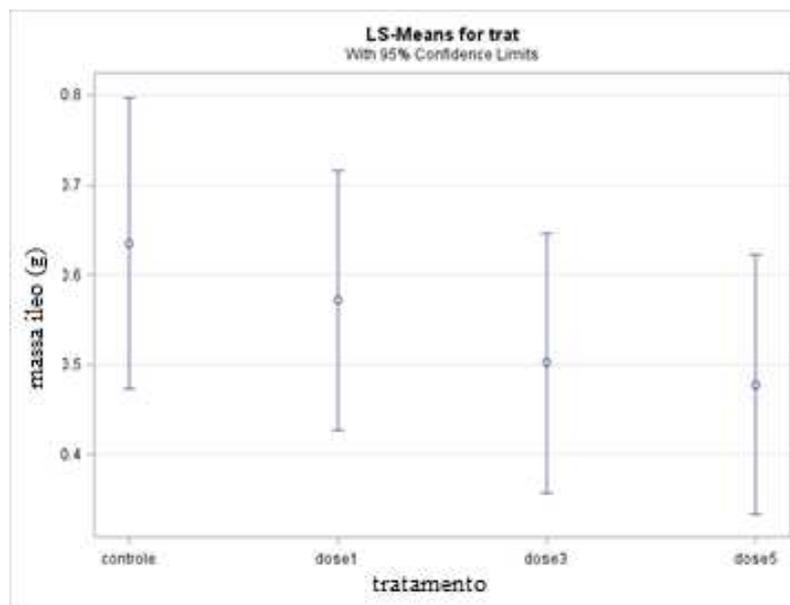


FIGURA 4.29: Massas médias estimadas dos fígados das fêmeas por dose e respectivos intervalos de confiança.

Podemos observar que o único órgão analisado que apresentou dose-dependência ao tamanho foi o fígado, sendo o órgão a apresentar vacuolização dependente da solução teste.

Na literatura, há relatos de não ocorrerem mudanças significativas na massa dos órgãos analisados (baço, fígado, pulmão, cérebro e coração) nos ratos machos e fêmeas.

4.4.3. Ecotoxicidade em *Daphnia similis*

No presente trabalho, a solução filmogênica contendo nanopartículas de prata-PVA apresentou uma maior toxicidade para o microcrustáceo *D. similis*, em relação às bactérias e aos ratos. O controle foi válido, com uma sobrevivência mínima de 90% dos organismos.

Os valores da CE_{50} -24 e 48 horas encontram-se na TABELA 4.11.

TABELA 4.11: Parâmetros de toxicidade aguda para *D. Similis* expostas a diferentes concentrações de solução filmogênica/nanopartículas de prata durante 24 e 48 horas.

Tempo exposição (h)	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Intervalo de Confiança (µg mL ⁻¹)	Modelo de regressão Y=normal	R ² (%)
24	0,0015	0,0011-0,0026	-1,08057 + 678,297x	70,46
48	0,0012	0,0008-0,002	-0,768212 + 603,564x	75,52

Após a exposição da *Daphnia* à solução contendo nanopartículas, alguns pigmentos foram visíveis em partes internas da carapaça, que não foram observados nas *Daphnias* do grupo controle (FIGURA 4.30). Essa pigmentação é relativa ao acúmulo das nanopartículas sob a carapaça, devido à sua ingestão.

ASGHARI et al. (2012) obtiveram CE_{50-48h} (0,002µg mL⁻¹) da mesma magnitude que as obtidas neste trabalho (0,0012µg mL⁻¹) em testes de toxicidade de nanopartículas de prata esféricas de 16nm comparadas a nanopartículas de outros tamanhos e a íons prata em *Daphnia magna*. Além disso, um fenômeno notável foi o aparecimento de pequenas bolhas sob a carapaça da *Daphnia*.

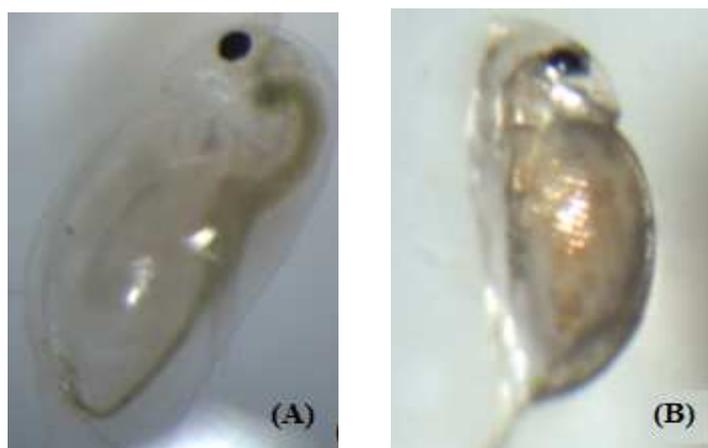


FIGURA 4.30: (A) *Daphnia* do grupo controle e (B) *Daphnia* exposta a solução contendo nanopartículas de prata.

De um modo geral o tamanho de partícula é um dos fatores determinantes da toxicidade de nanomateriais, ou seja, quanto menor a

nanopartícula, maior o seu efeito tóxico (FARRÉ *et al.* 2008). Assim, a alta toxicidade da solução contendo nanopartículas de prata pode ser justificada pelo pequeno tamanho das partículas (8 nm).

Da mesma forma, MARCONE (2011) obteve CE_{50} iguais a $0,0006\mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,022\mu\text{g mL}^{-1}$, referentes a solução de nanopartículas de prata (18 nm) esféricassem aglomeração e nanopartículas esféricas aglomeradas, respectivamente.

Em oposição a isso, GRIFFITT *et al.* (2008) realizaram um estudo no qual nanopartículas de prata esféricas de 26 nm apresentaram menos toxicidade ($CE_{50}= 40\text{g L}^{-1}$) à *D. pulex* do que os íons Ag^+ ($CE_{50} = 8\text{g L}^{-1}$).

Embora o tamanho da partícula seja importante, outros fatores podem ser relacionados a diferentes toxicidades. Por exemplo, diferentes agentes de estabilização e redução podem interferir na toxicidade de partículas com tamanhos similares. KENNEDY *et al.* (2010) mostrou a toxicidade de várias nanopartículas de prata sintetizadas com citrato, EDTA e PVP obtendo diferentes valores de CE_{50} ($0,005 - 0,097\mu\text{g mL}^{-1}$).

NEWTON *et al.*(2013) relataram que a toxicidade de nanopartículas de prata para *D. magna* pode ser mediada pela liberação de íons Ag^+ .

Geralmente, os valores da CE_{50} indicam uma linha de base para testes de toxicidade. De acordo com a legislação da União Européia, substâncias com CE_{50} -48h menor que $1\mu\text{g mL}^{-1}$, para *Daphnia*, podem ser classificadas como categoria 1 – muito tóxicas para organismos aquáticos (ASGHARI *et al.*, 2012).

Assim, a solução filmogênica contendo nanopartículas de prata-PVA mostrou ser um produto de elevada toxicidade para invertebrados aquáticos. Considerando as *Daphnias* como parte da alimentação de outros organismos, incluindo peixes, há certo potencial para absorção e subsequente transferência de nanopartículas para organismos de mais altos níveis tróficos.

5. CONCLUSÕES

Obteve-se, com êxito, nanopartículas de prata-PVA de $8,12 \pm 1,72$ nm de diâmetro, por meio do método de redução química da prata com borohidreto de sódio.

Os filmes de CMC/(NPAg-PVA) foram obtidos e a inserção destas aumentou as propriedades mecânicas e de barreira desses filmes, apresentando também certas luminosidade e transparência, requisitos importantes quando filmes são utilizados como embalagens de alimentos.

Na avaliação da atividade antimicrobiana, os filmes contendo nanopartículas de prata-PVA apresentaram a formação de um halo de inibição, sendo o tratamento eficaz contra ambas as bactérias testadas. No teste da Concentração Mínima Inibitória, a solução filmogênica com nanopartículas apresentou um valor de MIC igual a $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor este relativo a um sistema com alta atividade antimicrobiana.

No teste de toxicidade em células vegetais, apesar da inserção de nanopartículas na solução filmogênica de CMC não apresentar efeitos citotóxicos sobre as células de *Allium cepa*, os testes de genotoxicidade realizados neste trabalho indicaram que uma concentração de nanopartículas igual a $12,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresenta propriedades clastogênicas (indução de quebras no DNA) sobre os organismos expostos, sugerindo que o uso de nanopartículas de prata-PVA foi capaz de induzir danos nas células desses organismos, mesmo em baixas concentrações.

Os testes de exposição de ratos Wistar a nanopartículas de prata-PVA indicaram uma degeneração celular no fígado, em todas as concentrações utilizadas de prata da substância teste ($1,00$; $3,00$ e $5,00 \mu\text{g mL}^{-1}$). Não houve diferenças significativas entre as concentrações médias de prata encontradas nos fêcos das fêmeas, submetidas a diferentes doses do nanocomposto. Já para os

machos, verificou-se uma diferença significativa na concentração encontrada no óleo na menor dose de exposição.

Já nos testes de ecotoxicidade, uma Concentração Efetiva 50% igual a $0,012\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 horas) de nanopartículas de prata indicou uma alta toxicidade para solução filmogênica, quando exposta a organismos aquáticos.

Dessa forma, os resultados desse trabalho indicam que o uso de nanopartículas de prata, mesmo em baixas concentrações, resulta em toxicidade para os organismos expostos, reforçando a necessidade de estudos adicionais que avaliem os efeitos de baixas concentrações dessas nanopartículas, quando ingeridas ou liberadas no ambiente.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As seguintes sugestões para trabalhos futuros são:

- Fazer novos estudos de propriedades mecânicas e térmicas para avaliar o efeito dos reagentes isoladamente;
- Fazer testes com filmes de diferentes espessuras para avaliar a permeabilidade ao vapor de água;
- Fazer testes adicionais de toxicidade para possíveis usos desse sistema nanoestruturado com outras finalidades.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI: AGÊNCIA BRASILEIRA DO DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. Estudo Prospectivo Nanotecnologia. Série Cadernos da Indústria, Brasília, 2010. Disponível em <http://www.abdi.com.br/Estudo/Estudo%20Prospectivo%20de%20Nanotecnologia.pdf> > Acessado em 02 Maio 2012.

ADINUGRAHA, M.P.; MARSENO, D.W. “Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from cavendish banana pseudo stem”. Carbohydrate polymers, **62**(2): 164, 2005.

AHMADI, T. S.; LOGUNOV, S. L.; EL-SAYED, M. A. “Size-Dependent Electron Dynamics of Gold Nanoparticles”. Nanostructured Materials, **10**:125, 1997.

ALLSOPP, D.; SEAL, K.J.; GAYLARDE, C.C. Introduction to Biodeterioration. 2ª ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2004, p.237.

ANJANA SARKAR, A.; KAPOOR, S.; MUKHERJEE, T. “Synthesis of silver nanoprisms in formamide”. Journal of Colloid and Interface Science, **287**(2):496, 2005.

AOUADA, M.R.; AOUADA, F.A.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; MCHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M.; MATTOSO, L.H.C. “Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles”. Journal of Food Engineering, **92**:448, 2009.

AOUADA, M.R.M. Aplicação de Nanopartículas em Filmes Utilizados em Embalagens para Alimentos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2009. Tese de doutorado, 138p.

ARAUJO, E.A.; ANDRADE, N.J.; SILVA, L.H.M. “Aspectos coloidais da adesão de microrganismos”. Química Nova, **33**(9): 1940, 2010.

ARTHEL, S.; HEINZE, T. “Acylation and carbanilation of cellulose in ionic liquids”. Green Chem., **8**: 301, 2006.

ASGHARI, S.; JOHARI, S.A.; LEE, J.H.; KIM, Y. S.; JEON, Y. B.; CHOI, H. J. “Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*”. J. Nanobiotechnol., **10**(14):1, 2012.

ASHARANI, P.V.; HANDE, M.P.; VALIYAVEETIL, S. “Anti-proliferative activity of silver nanoparticles”. *BMC Cell Biol*,**10**:65, 2009.

ASTM: Tensile properties of thin plastic sheeting. *Annual Book of ASTM Standards*, American Society for Testing and Materials. Filadélfia, D82, 1995.

AUDIC, J.L.; CHAUFER, B. “Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate”. *Eur. Polym.*, **41**:1934, 2005.

AZEREDO, H.M.C. “Películas comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial de aplicação”. *Boletim do CEPPA*, Curitiba, **21**: 267, 2003.

BADAWY, A. M. E.; LUXTON, T. P.; SILVA, R. G.; SCHECKEL, K. G.; SUIDAN, M. T.; TOLAYMAT, T. M. “Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions”. *Environ. Sci.& Tech.*, **44**(4): 1260, 2010.

BAE, H. J.; PARK, H. J.; HONG, S. I.; BYUN, Y. J.; DARBY, D. O.; KIMMEL, R. M.; WHITESIDE, W. S. “Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films”. *LWT - Food Science and Technology*, **42**(6): 1179, 2009.

BAEZA-SQUIBAN, A.; VRANIC, S.; BOLAND, S. “Fate and health impact of inorganic manufactured nanoparticles”. IN: *Nanomaterials: A Danger or a Promise?*, Londres, Springer London, 2013. p.245-267.

BAKER, C.; PRADHAN, A.; PAKSTIS, L.; POCHAN, D.J.; SHAH, S.I. “Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles”. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **5**(2): 244, 2005.

BALDWIN, E. A., NISPEROSCARRIEDO, M., SHAW, P. E., BURNS, J. K. “Effect of coatings and prolonged storage conditions on fresh orange flavor volatiles, degrees Brix and ascorbic acids levels”. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, **43**: 1321, 1995.

BANKER, G. S. “Film coating theory and practice”. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, **55**(1): 81, 1966.

BANKS, N. H. “Some effects of TAL Pro-long coating on ripening bananas”. *Journal of Experimental Botany*, **35**(1): 127, 1984.

BARBA, C.; MONTANÉ, D.; RINAUDO, M.; FARRIOL, X. “Synthesis and characterizations of carboxymethylcellulose (CMC) from non-wood fibers I. Accessibility of cellulose fibers and CMC synthesis”. *Cellulose*, **9**: 319, 2002.

BARIOTO, V. L. ; AVANSI, W ; GASPAROTTO, L H S ; CRESPILO, F ; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA, O. N. “Síntese e caracterização de nanopartículas de prata (NPs) estabilizadas com polivinil álcool (PVA)”. Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, São Paulo-SP, 2006. SIICUSP, 2006.

BASSNER, L.; KLINGENBERG, E.H. "Using poly(vinyl alcohol) as a binder". *American Ceramic Society Bulletin*, **77**(6): 71, 1998.

BEN MOSHE, A.; MARKOVICH, G. “Synthesis of single crystal hollow silver nanoparticles in a fast reaction-diffusion process”. *Chemistry of Materials*, **23**(5): 1239, 2011.

BIHARI, P.; VIPPOLA, M.; SCHULTES, S.; PRAETNER, M.; KHANDOGA, A.; REICHEL, C. “Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies”. *Particle and Fibre Toxicology*, **5**:14, 2008.

BILBERG, K.; MALTE, H.; WANG, T.; BATRUP, E. “Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*”. *Aquatic Toxicology*, **96**: 159, 2010.

BLACK, J.G. *Microbiology: Principles and Explorations*. 7^a ed. Danver, Ed. Wiley, 2008. p. 968.

BOURTOOM, T. “Review article. Edible protein films: Properties enhancement”. *International Food Research Journal*, **16**: 1, 2009.

BRAYDICH-STOLLE, L.; HUSSAIN, S.; SCHLAGER, J.J.; HOFMANN, M.C.” In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells”. *Toxicol Sci*, **88**: 412, 2005.

BRITO, G. F. “Biopolímeros , Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes”. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, **6**(2): 127, 2011.

BRUSICK, D.J. *Principles of Genetic Toxicology*. Nova Iorque, Plenum Press, 1987. p. 284.

BRUST, M.; KIELY, C. J. “Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **202** (2):175, 2002.

CAMPOS, C.A.; GERSCHENSON, L.N.; FLORES, S.K. “Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity”. *Food Bioprocess Technology*, **4**(6): 849, 2010.

CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. “Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films”. *Food Hydrocolloid*, **23**(3):729, 2009.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B.W.S.; CERQUEIRA, M.A.; TEIXEIRA, J.A.; CRUZ, L. “Chitosan/clay films’ properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles concentrations”. *Food Hydrocolloids*, **23**: 1895, 2009.

CASSAGNEAU, T.; FENDLER, J. H. “Preparation and layer-by-layer self-assembly of silver nanoparticles capped by graphite oxide nanosheets”. *The Journal of Physical Chemistry B*, **103**(11):1789, 1999.

CERRUTI, B.M. *Biomacromoléculas Carboximetiladas: Atuação como Agentes de Estabilização de Suspensões Aquosas de Alumina*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química –USP, 2010. Tese de doutorado, 139p.

CHAUDRY, Q.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROS, B.; BOXALL, A.; CASTLE, L.; WATKINS, R. “Applications and implications of nanotechnologies for the food sector”. *Food additives and contaminants*, **25**(3): 241, 2008.

CHAUDHRY, Q.; WATKINS, R.; CASTLE, L. “Nanotechnologies in the Food Arena: New Opportunities, New Questions, New Concerns”. *Nanoscience and Nanotechnology*, **14**(14):1, 2010.

CHO, K.H.; PARK, J.E.; OSAKA, T.; PARK, S.G. “The study of antimicrobial activity of nanosilver ingredient.” *J. Electrochimica Acta*, **51**: 956, 2005.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. “Animais de laboratório: o camundongo”. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **28**(1):11, 2007.

CIE: International Commission on Illumination CIE L*a*b* Color Scale, 15^a ed., 1986. Disponível em <http://www.cie.co.at/frameaboutcie.html>. Acesso em 29 novembro 2013.

CLIFT, M. J.; GEHR, P.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B. “Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative”. *Arch Toxicol*, **85**(7):723, 2010.

COELHO, S.L. Desenvolvimento e Caracterização de Hidrogel para Liberação de Nitrofurazona. Sorocaba, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UNISO, 2012. Dissertação de Mestrado, 85p.

CRANE, M.; HANDY, R.D.; GARROD, J.; OWEN, R. “Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles”. *Ecotoxicology*, **17**(5): 421, 2008.

CUSHING, B.; KOLENICHENKO, V. L.; O’CONNOR, C. J. “Recent advances in the liquid-phase synthesis of inorganic nanoparticles”, *Chem. Rev.*, **104**: 3893, 2004.

CUCHIARA, C.C.; BORGES, C.S.; BOBROWSKI, V.L. “ Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d’água”. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*,**6**(1):33, 2012.

DAVANÇO, T. Desenvolvimento e Caracterização de Biofilmes a base de Gelatina, Triacetina, Ácido Esteárico ou Ácido Capróico e Surfactantes. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - UNICAMP, 2006. Dissertação de mestrado, 155p.

DEBEAUFORT, F.; QUEDAZA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. “Edible films and coatings, tomorrow’s packagings: A Review”, *Critical Reviews in Food Science*, **38**: 299, 1998.

DESOUKY, S.E.; NISHIGUCHI, K.; ZENDO, T.; IGARASHI, Y.; WILLIAMS, P.; SONOMOTO, K. “High-throughput screening of inhibitors targeting Agr/Fsr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*”. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **77**(5): 923, 2013.

DOAK, K.W. “Ethylene polymers”. IN: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. MARK, H. M.; BIKALES, N. M.; OVERBERG, C. G.; MENGES, G. (Eds). Nova Iorque, John-Wiley & Sons, 1986, p. 1-6.

DONHOWE, G.; FENNEMA, O. “Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods”. IN: *Edible Films and Coatings to Improve Quality*. KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; ISPEROSCARIEDO, M. (Eds.). Lancaster, Technomic Publishing Co., 1994. p.1-24.

- DRETS, M.E. “Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution”. *Mutation Research*, **504**: 17, 2002.
- DURAN, N.; MARCATO, P.D.; SOUZA, G.I.H.; ALVES, O.L.; ESPOSITO, E. “Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment”. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **3**(2):203, 2007.
- DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. *Nanotecnologia: Introdução, Preparação e Caracterização de Nanomateriais e Exemplos de Aplicação*. São Carlos, Ed. ArtLiber, 2006.p.32.
- DZIENDZIKOWSKA, K.; GROMADZKA-OSTROWSKA, J.; LANKOFF, A.; KRUSZEWSKI, M. “Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats”. *Journal of Applied Toxicology*, **32**(11): 920, 2012.
- EPA, Integrated Risk Information System Silver (CASRN7440-22-4), 1897. Disponível em <http://www.epa.gov/iris/subst/0099.htm>. Acesso em 15 janeiro 2012.
- EUROPEAN COMMISSION. *Guidance document on aquatic ecotoxicology*. 4^a ed. Bélgica, Brussels, 2002.
- EVANOFF, D.; CHUMANOV, G. “Size-controlled synthesis of nanoparticles: Measurement of extinction, scattering, and absorption cross sections. *The Journal of Physical Chemistry B*, **108**(37): 13957, 2004.
- FABREGA, J.; LUOMA, S.; TYLER, C.R.; GALLOWAY, T.S.; LEAD, J.R. “Silver nanoparticles: behavior and effects in the aquatic environment”. *Environ. Int.*, **37**: 517, 2011.
- FARRÉ, M.; GAJDA-SCHRANTZ, K.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. “Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment”. *Anal. Bioanal. Chem.*, **6**(393):81, 2009.
- FEITOR, M.C. *Efeito Antibacteriano de Tecidos Têxteis Revestidos por Prata Através da Técnica de Deposição por Plasma*. Natal, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais – UFRN, 2010. Tese de doutorado, 116p.
- FENG, Q.L.; WU, J.; CHEN, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.N.; KIM, T.N.; KIM, J.O. “A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia*

coli and Staphylococcus aureus”. *Journal of Biomedical Materials Research*, **52**(4): 662, 2000.

FILHO, G, B. *Patologia Geral*. 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004. p. 367.

FONSECA, J.P.C.G. *Revestimentos Comestíveis à base de Quitosano e Cera de Abelha: Aplicação na Conservação da Uva de Mesa*. Lisboa, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos – Universidade Técnica de Lisboa, 2012. Dissertação de Mestrado, 110p.

FOUDA, M.M.G; AASAR, M.R.; DEYAB, S.S. “A Antimicrobial activity of carboxymethyl chitosan/polyethylene oxide nanofibers embedded silver nanoparticles”. *Carbohydrate Polymers*, **92**: 1012, 2013.

FRANCO, A.P. *Caracterização Estrutural e Adsorção de Íons Metálicos por Carboximetilcelulose e Quitosana In Natura Impregnada com Zeólita*. Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federa do Paraná, 2009. Dissertação de Mestrado, 186p.

FREESTONE, I.; MEEKS, N.; SAX, M.; HIGGITT, C. “The lycurgus cup-a roman nanotechnology”. *Gold Bulletin*, **40**(4): 270, 2007.

FUNG, M. C.; BOWEN, D. L. “Silver Products for Medical Indications: Risk-Benefit Assessment”. *Clinical Toxicology*, **34**(1):119, 1996.

GAMBARDELLA, C.; ALUIGI, M.G.; GALLUS, L.; RAMOINO, P.; GATTI, A.M.; ROTTIGNI, M.; FALUGI, C. “Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles”. *Aquatic Toxicology*, **130**: 77, 2013.

GARCIA, M.V.D. *Síntese, Caracterização e Estabilização de Nanopartículas de Prata para Aplicações Bactericidas em Têxteis*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - UNICAMP, 2011. Dissertação de Mestrado, 89p.

GARCIA-BARRASA, J.; LOPEZ-DE-LUZURIAGA, J. M.; MONGE, M. “Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications”. *Central European Journal of Chemistry*, **9**(1):7, 2011.

GASPARIN, M. Embalagens: um Mercado Antigo, mas muito Dinâmico para Empreender. 2010. Disponível em: <<http://jornale.com.br/mirian/?p=11952>>. Acesso em 24 janeiro 2014.

GHANBARZADEHA, B.; ALMASI, H.; ENTEZAMI, A.A. “Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**: 697, 2010.

GHOSH, S.; KAUSHIK, R.; HOTI, S.L.; MENEZES, A.; HARISH, B.N.; VASAN, H.N. “Antimicrobial activity of highly stable silver nanoparticles embedded in agar–agar matrix as a thin film”. *Carbohydrate research*, **345**(15): 2220, 2010.

GHOSH, S.K.; PAL, T. “Interparticle Coupling Effect on the surface Plasmon resonance of Gold Nanoparticles: from theory to applications”. *Chem. Rev.*, **107**(11), 4797, 2007.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.L.; GULBERT, S.L. “Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties”. *International journal of food science & technology*, **29**(1): 39, 1994.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. “Edible wheat films: influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology”. *J. Food Sci.*, **57**: 190, 1992.

GORENSEK, M.; RECELJ, P. “Nanosilver Functionalized Cotton Fabric”. *Textile Research Journal*, **77**: 138, 2007.

GORUP, L. F.; LONGO, E.; LEITE, E.; CAMARGO, E.R. “Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method”. *Journal of colloid and interface science*, **360**(2): 355, 2011.

GORUP, L.F. Nanopartículas Coloidais de Ouro e Prata e sua Funcionalização com Dubutil- Dicalcogenetos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2010. Dissertação de mestrado, 142p.

GRANT, W.F. “The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens”. *Mutation Research*, **310**: 175, 1994.

GRANT, W.F.; ZINOV’EVA-STAEVITCH, A.E.; ZURA, K.D. “Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens. IN: Short Term

Tests for Chemical Carcinogens. STICH, H.F & SAN, R.H.C. (Eds). Nova Iorque, Springer-Verlag, 1981. p. 200- 216.

GREINER, R. “Current and projected applications of nanotechnology in the food sector”. *Nutrire: Sociedade Brasileira de alimentação e nutrição*, **34**(1): 243, 2009.

GRIFFITT, R. J.; LUO, J.; GAO, J.; BONZONGO, J.; BARBER, D. S. “Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms”. *Environ. Toxicol. Chem.*, **27**: 1972, 2008.

GUILBERT, S. “Technology and application of edible protective films”. IN: *Food Packaging and Preservation, Theory and Practice*. MATHLOUTI, M. (Ed). Londres, Elsevier Applied Science Publishing Co., 1986. p.371-373.

GUILBERT, S.; CONTARD, N. “Agro-polymers for edible and biodegradable films : review of agricultural polymeric Materials , physical and mechanical characteristics”. IN: *Inovations In Food Packaging*. HAN, J.H. (Ed). San Diego, Elsevier Academic Press, 2005. p.263-276.

GUOZHONG, C. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*. Londres, Imperial College Press, 2004. p.36.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E. *Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*. 3ª ed. São Paulo, Livraria Roca Ltda, 1999, p.238.

HAYNES, C. L. “The emerging field of nanotoxicology”. *Anal Bioanal Chem*, **398**(2): 587, 2010.

HE, D.; BLIGH, M. W.; WAITE, T. D. “Effects of Aggregate Structure on the Dissolution Kinetics of Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles”. *Environmental science & technology*, **47**(16): 9148, 2013.

HEINZE, T.; KOSCHELLA, A. “Solvents applied in the field of cellulose chemistry: A mini-review Polimeros”. *Ciência e Tecnologia*, **15**(2):84, 2005.

HIEMENZ, P.C.; RAJAGOPALAN, R. *Principle of Colloid and Surface Chemistry*. 3ª ed. Nova Iorque, CRC Press, 1997, p.672.

HOUK, V.S. “The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review”. *Mutation Research*, **277**: 91, 1992.

HYNING, D.L.V.; KLEMPERE, W.G.; ZUKOSKI, C.F. “Silver nanoparticle formation: predictions and verification of the aggregative growth model”. *Langmuir*, **17**(1): 3128, 2001.

ILLINGWORTH, B.; BIANCO, R.W.; WEISBERG, S. “In vivo efficacy of silver-coated fabric against *Staphylococcus epidermidis*”. *J. Heart. Valve. Dis.*, **9**:135, 2000.

JAIN, J.; ARORA, S.; RAJWADE, J.M.; OMRAY, P.; KHANDELWAL, S.; PAKNIKAR, K.M. “Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use”. *Molecular Pharmaceutics*, **6**(5):1388, 2009.

JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTINEZ-LOPEZ, W.; FOLLE, G.A.; JI, J.H.; JUNG, J.H.; KIM, S.S.; YON, J.U.; PARK J.D.; CHOI, B.S.; CHUNG, Y.H.; KNOW, I.H.; JEONG, J.; HAN, B.S.; SHIN, J.H.; SUNG, J.H. “A twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats”. *Inhal. Toxicol.*, **19**(10):857, 2007.

JIN, R.C.; CAO, Y.W.; MIRKIN, C.A.; KELLY, K.L.; SCHATZ, G.C.; ZHENG, J.G. “Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms”. *Science*, **294**(5548):1901, 2001.

KADER, A.A.; ROLLE, R.S. “The role of postharvest management in assuring the quality and safety of horticultural produce”. *FAO Agric. Serv. Bull.*, **152**:51, 2004.

KENNEDY, A.; HULL, M.; BEDNAR, A.J.; GOSS, J.; GUNTER, J.; BOULDIN, J.; VIKESLAND, P.; STEEVENS, J. “Fractionating Nanosilver: Importance for Determining Toxicity to Aquatic Test Organisms”. *Environ Sci Technol.*, **44**: 9571, 2010.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. “Edible films and coatings: a review”. *Food Technology*, **40**(12): 47, 1986.

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.H. PARK, S.J.; LEE, H.J.; KIM, S.H.; HWANG, C.Y.; LEE, Y.S.; JEONG, D.H. “Antimicrobial effects of silver nanoparticles”. *Nanomedicine*, **3**(1):95, 2007.

KIM, S.H.; LEEL, H.S.; RYUL, D.S.; CHOI, S.J.; LEE, D.S. “Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*”. *Korean J. Microbiol. Biotech.*, **39**(1): 77, 2011.

KIM, Y. S.; KIM J.S.; CHO, H.S.; RHA, D.S.; KIM, J.M.; PARK, J.D. "Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats". *Inhalation toxicology*, **20**(6): 575, 2008.

KIM, Y. S.; SONG, M. Y.; PARK, J. D.; SONG, K. S.; RYU, H. R.; CHUNG, Y. H.; CHANG, H. K.; LEE, J. H.; OH, K. H.; KELMAN, B. J.; HWANG, I. K.; YU, I.J. "Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. Particle and Fibre", *Toxicology*, **7**(20):1, 2010.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.P.; BOHN, A. "Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material". *Angewandte Chemie International Edition*, **44**(22): 3358, 2005.

KOSCHELLA, A.; DORN, S.; HEINZE, T.; TOGOLA, A.; PAULSENC, B. "Synthesis and characterization of branched polysaccharides by reaction of cellulose with 2,3,4,5-tetraacetyl-1-bromo- α -D-glucopyranoside". *J. Organic. Chem.*, **3**:76, 2012.

KROCHTA, J.M.; DEMULDER-JOHNSTON, C. "Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities". *Food Tech.*, **51**(2):61, 1997.

KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **75**(1): 1, 2010.

KUMARI. M; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. "Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*". *Science of the Total Environment* ,**407**: 5243, 2009.

JEYARAJ, M.; SATHISHKUMAR, G.; SIVANANDHAN, G.; MUBARAKALI, D.; RAJESH, M.; ARUN, R.; KAPILDEV, G.; MANICKAVASAGAM, M.; THAJUDDIN, N.; PREMKUMAR, K.; A. GANAPATHI, A. "Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: An experimental report". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **106**:86, 2013.

LABAN, G.; NIES, L.F.; TURCO, R.F.; BICKHAM, J.W.; SEPÚLVEDA, M.S. "The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos". *Ecotoxicology*, **19**:185, 2010.

LARA, H.H.; AYALA-NUNEZ, N.V.; IXTEPAN-TURRENT, L.; RODRIGUZ, C. "Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-

resistant bacteria”. World Journal of Microbiology and Biotechnology , **26**: 615, 2010.

LEE, H.Y.; PARK, K.H.; LEE, M.Y.; PARK, B.S. “A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications”. Chemistry Commun, **28**: 2959, 2007.

LELEUX, J.; WILLIAMS, R.O. “Recent advancements in mechanical reduction methods: particulate systems”. Drug development and industrial pharmacy, **1**: 12, 2013.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. “Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application”. Mutation Research, **682**:71, 2009.

LI, R.; KIM, D.J.; YU, K.; LIANG, H.; BAI, C.; LI, S. “Study of fine silver powder from AgOH slurry by hydrothermal techniques”. Journal of materials processing technology, **137**(1): 55, 2003.

LI, W.R.; XIE, X.B.; SHI, Q.S.; SUAN, S.S.; CHEN, Y.B. “Antibacterial effect of silver nanoparticles on *S. aureus*”. Biometals, **24**:135, 2011.

LIMA, T.H. Modificação do Cimento Ortopédico com Nanopartículas de Prata. Belo Horizonte, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas – Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. Dissertação de Mestrado, 127p.

LIZ-MARZÁN, L.M. “Nanometals: Formation and color”. Materials Today, **7**(2): 26, 2004.

LOESCHNER, K.; HADRUP, N.; QVORTRUP, K.; LARSEN, A.; GAO, X.; VOGEL, U.; MORTENSEN, A.; LAM, H.R.; LARSEN, E.H. “Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate”. Particle and Fibre Toxicology, **8**:18, 2011.

LOK, C.N.; HO, C.M.; CHEN, R.; HE, Q.Y.; YU, W.Y.; SUN, H.; CHE, C.M. “Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities”. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, **12**(4): 527, 2007.

MAFUNE, F.; KOHNO, J. Y.; TAKEDA, Y.; KONDOW, T.; SAWABLE, H. “Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation”. The Journal of Physical Chemistry B, **104**(35): 8333, 2000.

- MALLICK, K.; WITCOMB, M. J.; SCURRELL, M. S. “Polymer stabilized silver nanoparticles: A photochemical synthesis route”. *Journal of Materials Science*, **39**(14): 4459, 2004.
- MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. “Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing”. *Carbohydrate Polym.*, **72**(1):43, 2008.
- MANUGISTICS Statgraphics Plus. Version 5.1 for Windows. Rockville: Manugistics Group, 2001.
- MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E.M.V. “A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment”. *Journal of Nanoparticle Research*, **12**(5): 1531, 2010.
- MARCONE, G.P.S. Avaliação da Ecotoxicidade de Nanopartículas de Dióxido de Titânio e Prata. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química – UNICAMP, 2011. Tese de doutorado, 207p.
- MARQUIS, B. J.; LOVE, S. A.; BRAUN, K. L.; HAYNES, C. L. “Analytical methods to assess nanoparticle toxicity”. *Analyst*, **134**(3): 425, 2009.
- MARSH, K.; BUGUSU, B. “Food Packaging - Roles, Materials, and Environmental Issues”. *J. Food Science*, **72**(3): 39, 2007.
- MARTINS, P.R.; RAMOS, S.F. Impactos das Nanotecnologias na Cadeia de Produção da Soja Brasileira. São Paulo, Xamã Editora, 2009.p. 158.
- MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KRISCHVOLDERS, M. “Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring”. *Biochemic*, **88**: 1515, 2006.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. “Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root tips”. *Genetics and Molecular Biology*, **29**: 148, 2006.
- MBHELE, Z.H.; SALEMANE, M.G.; VAN SITTERT, C.G.; NEDELJKOVIC, J.M.; DJOKOVIC, V.; LUYT, A.S. “Fabrication and characterization of silver-polyvinyl alcohol nanocomposites”. *Chemistry of Materials*, **15** (26):5019, 2003.

MCCLARY, F. A.; GAYE-CAMPBELL, S.; TING, A. Y. H.; MITCHELL, J. W. “Enhanced localized surface plasmon resonance dependence of silver nanoparticles on the stoichiometric ratio of citrate stabilizers”. *Journal of nanoparticle research*, **15**(2): 1, 2013.

MCHUGH, T.H.; AVENA-BUSTILLOS, R.; KROCHTA, J.M. “Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects”. *J. Food Sci.*, **58**: 899, 1993.

MCHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. “Milk-protein-based edible films and coatings-favorable barrier and mechanical properties of milk-protein films warrant exploration for controlling mass transfer in food systems”. *Food Technology*, **1**: 97, 1994.

MEHERIUK, M.; LAU, O. L. “Effect of two polymeric coatings on food quality of "Barlett" and "d'Anjou Pears". *Journal American Society Horticultural Science*, **113**:222, 1988.

MELO, A.; SANTOS, L.S.S.; GONÇALVES, M.C.; NOGUEIRA, A.F. “Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino”. *Química Nova*, **35**(9): 1872, 2002.

MITTEREGGER, H.; SILVA, H.M.; ARENZON, A.; PORTELA, C.S.; FERREIRA, I.C.F.D.; HENRIQUES, J. “Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries”. *Chemosphere*, **67**(6): 1211, 2007.

MOHAN, Y. M.; LEE, K.; PREMKUMAR, T.; GECKELER, K.E. “Hydrogel networks as nanoreactor: a novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications”, *Polymer*, **48**(1): 158, 2007.

MOHANTY, A. K.; DRZAL, L. T.; MISRA, M. “Nano-reinforcement of bio-based polymers-the hope and reality”. *Polymeric Materials: Science and Engineering*, **88**: 60, 2003.

MONCADA, E.A. “Nanotechnology, food and drug packaging applications”. *Vitae*, **14**: 2, 2007.

MOORE, G. *Nanotecnologia em Embalagens*. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 2009.p.70.

MORAIS, L. C.; CAMPANA FILHO, S. P. “Carboximetilação de polpas de bagaço de cana-de-açúcar e caracterização dos materiais absorventes obtidos”. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **46**:51, 1999.

MOREIRA, F.K.V. Desenvolvimento de Nanocompósitos Poliméricos Biodegradáveis a Partir de Pectina, Amido e Nanofibras de Celulose. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais – Universidade de São Carlos, 2010. Dissertação de Mestrado, 213p.

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*, **16**:2346, 2005.

MOURA, M.R.; AOUADA, A.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; MCHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M.; MATTOSO, L.H.C. “Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles”. *J. Food Eng.*, **92**: 448, 2009.

MOURA, M.R.; LOREVICE, M.V.; MATTOSO, L.H.C.; ZUCOLOTTO, V. “Highly Stable, Edible Cellulose Films Incorporating Chitosan Nanoparticles”. *Journal of Food Science*, **76**(2):25, 2011.

MUDUNKOTUWA, I.A.; GRASSIAN, V. H. “The devil is in the details (or the surface): impact of surface structure and surface energetics on understanding the behavior of nanomaterials in the environment”. *Journal of Environmental Monitoring*, **13**(5):1135, 2011.

MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R.; BAWENDI, M. G. “Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies”. *Annual Review of Materials Science*, **30**(1): 545, 2000.

NATH, N.; CHILKOTI, A. “Label-free biosensing by surface plasmon resonance of nanoparticles on glass: optimization of nanoparticle size”. *Anal. Chem.*, **76**:5370, 2004.

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*. 6^a ed. West Valley, Wayne, 2003. p.8.

NETO, E.A.B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. “Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens”. *Comunicado Técnico*, 1^a ed. São Carlos, p. 4.

NETO, E.A.B. Desenvolvimento de Nanobiocompósitos Contendo Nanopartículas de Prata para Aplicações Bactericidas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Física – USP, 2010. Dissertação de Mestrado, 115p.

NEWTON, K. M.; PUPPALA, H.L.; KITCHENS, C.L.; COLVIN, V.L.; KLAINE, S.J. “Silver nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* is a function of dissolved silver concentration”. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **32**(10): 2356, 2013.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; OBERDORSTER, G., OBERDORSTER, E., OBERDORSTER, J. “Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles”. *Environ Health Perspect*, **113**(7): 823, 2005.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for testing on chemicals: *Daphnia sp.* - acute immobilization test. Paris, 2004, p.12.

OECD: Guidelines for the Testing of Chemicals: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris, 2008. p. 13.

ORTS, W.J.; SHEY, J.; IMAM, H.; GLENN, G.M.; GUTTMAN, M.E.; REVO, J.F. “Application of cellulose microfibrils in polymer nanocomposites”. *Journal of Polymers and the Environment*, **13**(4): 301, 2005.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. “Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle”. *Journal of Food Protection*, **69**(10): 2364, 2006.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J.D. “Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties”. *J. Food Eng*, **84**: 116, 2008.

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 Microbiol.*, **73**:1712, 2007.

PANDA, K. K.; ACHARY, V.M.M.; KRISHNAVENI, R.; PADHJ, B.K.; SARANGI, S.N.; SAHU, S.N.; PANDA, B.B. “In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants”. *Toxicology in Vitro*, **25**(5), 1097, 2011.

PARK, M.V.D.Z.; NEIGHC, A. M.; VERMEULENB, J. P.; FONTEYNEB, L. J. J.; HENNY, H. W.; BRIEDÉA, J. J.; LOVERENA, H.; JONG, W. H. “The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles”. *Biomaterials*, **32**(6): 9810, 2011.

PARRA, D.F.; TADINI, C.C.; PONCE, P.; LUGAO, A.B. “Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films”. *Carbohydr. Polym.*, **58**: 475, 2004.

PATAKFALVI, R.; VIRÁNYI, Z.; DÉKÁNY, I. “Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions”. *Colloid and Polymer Science*, **283**(3): 299, 2004.

PATTEKARI, P.; ZHENG, Z.; ZHANG, X.; LEVCHENKO, T.; TORCHILIN, V.; LVOV, Y. “Top-down and bottom-up approaches in production of aqueous nanocolloids of low solubility drug paclitaxel”. *Physical Chemistry*, **13**(19):9014, 2011.

PEELMAN, N. “ Application of bioplastics for food packaging”. *Trends in Food Science & Technology*, **32**(2):128, 2013.

PELLIEUX, C.; DEWILDE, A.; PIERLOT, C.; AUBRY, J.M. “. Bactericidal and virucidal activities of singlet oxygen generated by thermolysis of naphthalene endoperoxides, **319**: 197, 2000.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. “Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations”. *Mutagenesis*, **5**(4): 289, 2000.

PILENI, M. P. “Colloidal self-assemblies used as templates to control size, shape and self organization of nanoparticles”, *Supramol. Sci.*, **5**(3): 321, 1998.

PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. “What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method?”. *The Journal of Physical Chemistry B*, **108**(3):945, 2004.

PINHEIRO, A.C. “ Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources”. *Carbohydr. Polym.*, **75**: 408, 2010.

PINTO, R.J.B. *Nanocompósitos de Celulose e Metais (Au e Ag)*. Aveiro, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade de Aveiro, 2008. Dissertação de Mestrado, 84p.

PIRES, A. C. S.; SOARES, N.F.F.; ANDRADE, N.J.; SILVA, L.H.M. “Development and Evaluation of Active Packaging for Sliced Mozzarella Preservation”. *Packaging Technology and Science*, **21**:375, 2008.

PITKENTHLY, M. J. “Nanoparticles as building blocks?”. *Materials Today*, **1**: 36, 2003.

PLASTICS EUROPE: An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2011. Disponível em: <<http://www.plasticseurope.com>> Acesso em 15 janeiro 2013.

PONCE, P.; BUENO, V.; LUGÃO, A.B. “Filmes biodegradáveis produzidos com poli(caprolactona)(PCL) e nanopartículas de prata: embalagens ativas para maçã”. *Anais do X Congresso Brasileiro de Polímeros . Foz do Iguaçu-PR*, 2009, p.1-9.

PULATE, P.V.; GHURDE, M.U.; DESHMUKH, V.R. “Cytological effect of the biological and chemical silver nanoparticle in allium cepa”. *International Journal of Innovations in Bio-Sciences* , **1**:32, 2011.

PULIT, J.; BANACH, M.; KOWALSKI, Z. “Nanosilver - Making difficult decisions”. *Ecological Chemistry and Engineering* , **18**(2): 185, 2011.

PYATENKO, A.; SHIMOKAWA, K.; YAMAGUCHI, M.; NISHIMURA, O.; SUZUKI, M. “Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in pure water”. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, **79**(4):803, 2004.

RAHEEM, D. “Application of plastics and paper as food packaging materials – an overview”. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, **25**(3):177, 2012.

RAI, M.K.; DESHMUKH, S.D.; INGLE, A.P.; GADE, A.K. “Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria”. *Journal of applied microbiology*, **112**(5): 841, 2012.

RAO, C. N. R.; CHEETHAM, A. K. “Science and technology of nanomaterials: current status and future prospects”. *J. Mater. Chem.*, **11**: 2887, 2001.

RATYAKSHI, C.; CHAUHAN , R.P. “Colloidal Synthesis of Silver Nano Particles”. *Asian Journal of Chemistry*, **21**(10): 113, 2009.

REDDY, K.; MAHESWARI, C.; SHUKLA, M.; SONG, J.I.; VARADA, A. "Tensile and structural characterization of alkali treated Borassus fruit fine fibers". *Composites Part B: Engineering*, **44**(1): 433, 2013.

RHIM, J.W.; HONG, S.I.; PARK, H.M.; NG, P.K.W. "Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity". *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 5814, 2006.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. *Química de Alimentos*. 2ª ed. São Paulo, Edgard Blücher. 2007. p.75.

ROBERTSON, G. L. "Optical and Mechanical Properties of Thermoplastic Polymers in Food Packaging: Principles and Practice. Nova Iorque, CRC press, 1993. p. 63.

RODRIGUES, L.; BALDIN, M.; PAULA, M.S.; FRANCO, C.; BARICHELLO, T.; SAVI, G.D.; BELLATO, L.; SILVA, L. "Avaliação das propriedades antimicrobianas de poli-{estireno-co-ácido acrílico} impregnado com nanopartículas de prata". *Mater Sci Eng*, **29**: 647, 2009.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. "Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias". *Materials Research*, **6**(3): 317, 2003.

ROMERO-BATISTA, C.A.; BELLO-PEREZ, L.A.; GARCIA, M.A.; MARTINO, M.N.; SOLORZA-FERIA, J.; ZARITZKY, N.E. "Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches". *Carbohydr. Polym.*, **60**:235, 2005.

ROSCA, C.; POPA, M.I.; LISA, G.; CHITANU, G.C. "Interaction of chitosan with natural or synthetic anionic polyelectrolytes. 1. The chitosan-carboxymethylcellulose complex". *Carbohydrate polymers*, **62**(1): 35, 2005.

ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING:
Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties. Londres.
Disponível em:
http://royalsociety.org/uploadedFiles/Royal_Society_Content/policy/publications/2004/9693.pdf. Acesso 15 março 2011.

RUEHL-FEHLERT, C.; KITTEL, B.; MORAWIETZ, G.; DESLEX, P.; KEENAN, C.; MAHRT, C.R.; NOLTE, T.; ROBINSON, M.; STUART, B.P.;

DESCHL, U.; GROUP, R. “Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1”. *Exp Toxicol Pathol.*, **55**(2):91, 2003.

RUPARELIA, J.P.; CHATTERJEE, A.K.; DUTTAGUPTA, S.P.; MUKHERJI, “S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles”. *Acta Biomater.*, **4**:707, 2008.

SABATINI, C.A. Modulação de Fluorescência de Amino Coumarinas e Acridinas por Nanopartículas de Prata. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Ciências – Universidade de São Paulo, 2007. Dissertação de Mestrado, 72p.

SANT, S. B.; GILL, K. S.; BURREL, R.E. “Nanostructured, Dissolution and Morphology Characteristics of Microcidal Silver Films Deposited by Magnetron Sputtering”. *Acta Biomaterialia*, **3**: 341, 2007.

SARANTOPOULOS, C.I.G.; OLIVEIRA, L.M.; CANAVESI, E. “Requisitos de Conservação de Alimentos em Embalagens Flexíveis. 2ª ed. Campinas, CETEA/ITAL, 2002. p. 21.

SAVI, G. D.; TROMBIN, A. C.; GENEROSO, J. D. S.; BARICHELLO, T.; POSSATO, J.C.; RONCONI, J.V.V.; PAULA, M. M. D. S. “Antibacterial Activity of Gold and Silver Nanoparticles Impregnated With Antimicrobial Agents”. *Saúde e Pesquisa*, **6**:2, 2013.

SCHARTL, W. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Berlim, Springer, 2007. cap.4.

SCHMID, G. “Large clusters and colloids: metals in the embryonic state”. *Chem. Rev.*, **92**(8): 1709, 1992.

SCHMID, G.; PFEIL, R.; BOESE, R.; BARDERMANN, F.; MEYER, SW.; CALIS, G.H.M.; VALDERVELDEN, W.A. “A gold cluster of an exceptional size”. *Chemische Berichte-Recueil*, **114**(11): 3634, 1981.

SCOTT, N; CHEN, H. “Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems”. *Industrial Biotechnology*, **8**(6): 340, 2012.

SCRINIS, G.; LYONS, K. “The emerging nano-corporate paradigm: nanotechnology and the transformation of nature, food and agri-food systems”. *Intern. Jour. of Sociol. Food and Agric.*, **15**(2): 22, 2007.

SHUBAYEV, V. I.; PISANIC, T. R.; JIN, S. “Magnetic nanoparticles for theragnostics”. *Adv Drug Deliv Rev*, **61**(6): 467, 2009.

SENNA, M.M.H.; AL-SHAMRANI, K.M.; AL-ARIFI, A.S. “Edible Coating for Shelf-Life Extension of Fresh Banana Fruit Based on Gamma Irradiated Plasticized Poly(vinyl alcohol)/Carboxymethyl Cellulose/Tannin Composites”. *Mat. Sci. Applic.*, **5**:395, 2014.

SILVA, A.O.; SÁ, E.M.F.; BOLZAN, A.; MACHADO, R.A.F. “Estudo de nucleação e crescimento de nanopartículas de prata”. Livro de resumos do XII Congresso Brasileiro de Biopolímeros. Florianópolis-SC, 2013. p. 1-4.

SINGH, M.; MANIKANDAN, S.; KUMARAGURU, A.K. “Nanoparticles: a new technology with wide applications”. *Res. J. Nanos. Nanot.*, **1**:1, 2011.

SINGH, Y.; JAVIER, J. R. N.; EHRMAN, S. H.; MAGNUSSON, M. H.; DEPPERT, K. “Approaches to increasing yield in evaporation/condensation nanoparticle generation”. *Aerosol Science*, **33**:1309, 2002.

SLEIMAN, H.K. Efeitos eprodutivos de Nanopartículas de Sais de Prata em Ratos Wistar Expostos Durante a Puberdade. Guarapuava, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas –UNIOESTE, 2012. Dissertação de Mestrado, 73p.

SOLEIMANPOUR, M.R.; HOSSEINI, S.J.; MIRDAMADI, S.M. “Factors Affecting on Nanotechnology-based Entrepreneurship in Agriculture Sector of Iran”. *Intl. J. Farm. & Alli. Sci.*, **2**(19): 737, 2013.

SOLOMON, S. D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A. V.; RUTKOWSKY, S.A.; BORITZ, C. “Synthesis and Study of Silver Nanoparticles.” *J. Chem. Educ.*, **84**:322, 2007.

SONDI, I.; GOIA, D. V.; MATIJEVIC, E. “Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles”. *Journal of Colloid and Interface Science*, **260**(1): 75, 2003.

SONDI, I.; SONDI-SALOPEK, B. “Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria”. *J Colloid Interface Sci.*, **275**:177, 2004.

SOTHORNVIT, R.; RODSAMRAN, P. “Effect of a mango film on quality of whole and minimally processed mangoes”. *Postharvest Biology and Technology*, **47**(3):407, 2008.

SRINIVASA, P. C.; RAMESH, M.N.; THARANATHAN, R. N. “Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films”. *Food Hydrocolloids*, **21**: 1113, 2007.

SU, J. F.; HUANG, Z.; YUAN, X.Y.; WANG, X.Y.; LI, M. “Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions”. *Carbohydrate Polymers*, **79**(1):145, 2010.

SUCHOMEL, P.; PRUCEK, R.; PANACEK, A.; KVITEK, L. “Two-Step Preparation of Silver Nanoparticles”. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, **3**(1),1, 2013.

SUN, Y.; MAYERS, B.; XIA, Y. “Transformation of silver nanospheres into nanobelts and triangular nanoplates through a thermal process”. *Nano Letters*, **3**: 675, 2003.

SUNG, J. H.; JI, J. H.; PARK, J. D.; YOON, J. U.; KIM, D. S.; JEON, K. S.; SONG, M. Y.; JEONG, J.; HAN, B. S.; HAN, J. H.; CHUNG, Y. H.; CHANG, H. K.; LEE, J. H.; CHO, M. H.; KELMAN, B. J.; YU, I. J. “Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles”. *Toxicological Sciences*, **108**(2):452, 2009.

SUPPAKUL, P.; MILTS, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W. “Active packaging technologies with emphasis on antimicrobial packaging and its applications”. *Journal of Food Science*, **68**: 408, 2003.

TANTAN, Y.; LI, Y.; ZHU, D. “Preparation of silver nanocrystals in the presence of anilina”, *J. Coll.Interf. Sci.*, **258**: 244, 2003.

TEMPLETON, A. C.; WUELFING, W. P.; MURRAY, R. W. “Monolayer-protected cluster molecules”. *Acc. Chem. Res.*, **33**:27, 2000.

TIEDE, K. “Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment”. *Food Additives and contaminants*, **25**(7):795, 2008.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLER, S. “A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold”. *J. Discuss. Faraday Soc.*, **11**:55, 1951.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. “Development of a flax/polypropylene composite with optimal mechanical characteristics by fiber and matrix modification”. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, **15**(4): 281, 2002.

- VINCENZO, B. "Nanoscience ad Nanotechnology: a personal view of a chemist". *Small*, **1**(3):278, 2005.
- VOLKER, C.; OETKEN, M.; OEHLMANN, J. "The biological effects and possible modes of action of nanosilver". *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **223**: 81, 2013.
- WANG, K.K.; KOO,C.; CHUNG, I.J. "Physical properties of polyethylene/silicate nanocomposite blown films". *Journal of Applied Polymer Science*, **89**: 2131, 2003.
- WANG, S.; HUANG, X.; SHAN, X. "Electrochemical Surface Plasmon Resonance: Basic Formalism and Experimental Validation". *Anal. Chem.*, **82**(3): 935, 2010.
- WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. "Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly (vinyl alcohol) hydrogel". *Polymer International*, **53**(7): 911, 2004.
- WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. *Polysaccharides: Strutral Diversity and Functional Versatility*. Nova Iorque, Dekker, 2005. cap.43.
- XIA, Y.; XIONG, Y.; LIM, B.; SKRABALAK, S.E. "Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics". *Angew Chem. Int.*, **48**(1): 60, 2009.
- XIAO, C.; LU, Y.; LIU, H.; ZHANG, L. "Preparation and characterization of Konjac Glucomannan and Sodium Carboxymethylcellulose blend films". *Journal of Applied Polymer Science*, **80**: 26, 2001.
- YACAMAN, J.M.; RENDON, L.; ARENAS, J.; PUCHE, M.C.S. "Maya blue paint: an ancient nanostructured material". *Science*, **273**(5272):23, 1996.
- YAKIMETS, I.; PAES, S.S.; WELNNER, N.; SMITH, A.C.; WILSON, R.H.; MITCHELL, J.R. "Effect of Water Content on the Structural Reorganization and Elastic Properties of Biopolymer Films: A Comparative Study". *Biomacromolecules*, **8**(5):1710, 2007.
- YEN, H.J.; HSU, S.H.; TSAI, C.L. "Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes". *Small*, **5**:1553, 2009.

YONEZAWA, T.; ONOUE, S.; KIMIZUKA, N. “Self-Organized Superstructures of Fluorocarbon-Stabilized Silver Nanoparticles”. *Advanced Materials*, **13**(2): 140, 2001.

YU, L.; LU, H.; LIU, Q. “Ultrafine silver nanoparticles with excellent antibacterial efficacy prepared by a handover of vesicle templating to micelle stabilization”. *Polym. Chem.*, **4**: 3448, 2013.

YUAN, J.C.; BREWER, J.D.; MONACO, E.A.; DAVIS, E.L. “Defining a natural tooth color space based on a 3-dimensional shade system”. *J Prosth Dent*, **98**(2): 110, 2007.

ZHANG, Z.; HAN, M. “Template-directed growth from small clusters into uniform silver nanoparticles”. *Chemical Physics Letters*, **374**(1): 91, 2003.

ZHU, C.; MILLS, K.D.; FERGUSON, D.O.; LEE, C.; MANIS, J.; FLEMING, J.; GAO, Y.; MORTON, C.C.; ALT, F.W. “Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations”. *Cell*, **109**: 811, 2002.

8. PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

-Evaluation of antimicrobial activity of silver nanoparticles for applications in films of carboxymethylcellulose for use in food packaging

Journal of Nanoscience and Nanotechnology – v. 14, 1-6, 2014.

DOI: 10.1166/JNN.2014.8991.

-Em redação: Toxicity and distribution of Silver Nanoparticles exposure to rats following 28 days repeated oral dose;

-Em redação: Genotoxicity of silver nanoparticles with different sizes in allium cepa;

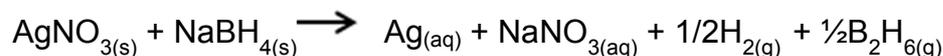
- VII Workshop de Nanotecnologia aplicada ao Agronegócio: “Caracterização e avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata para incorporação em matriz polimérica em uso de embalagens”, 2013;

- ESBP: Europeum Symposium on Biopolymers: “Evaluation of antimicrobial activity of silver nanoparticles for carboxymethylcellulose film applications for use in food packaging”, 2013;

- XI Encontro Anual da Sociedade Brasileira em Pesquisas de Materiais. “Evaluation of antimicrobial activity of edible films of carboxymethylcellulose incorporated with silver nanoparticles”, 2012;

APÊNDICE 1

A. Síntese de Nanopartículas de Prata-PVA



Utilizou-se 10 mL de AgNO_3 $0,08\text{g L}^{-1}$ ($8 \times 10^{-4}\text{g}$), 10 mL de NaBH_4 $0,04\text{g L}^{-1}$ ($4 \times 10^{-4}\text{g}$) e 20 mL de PVA $0,2\text{g L}^{-1}$ ($4 \times 10^{-3}\text{g}$).

$$\begin{array}{l} \text{AgNO}_3: 1 \text{ mol} - 169\text{g} \\ x - 8 \times 10^{-4}\text{g} \end{array} \quad x = 4,70 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

$$\begin{array}{l} \text{NaBH}_4: 1 \text{ mol} - 37,8\text{g} \\ x - 4 \times 10^{-4}\text{g} \end{array} \quad x = 1,05 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

$$\begin{array}{l} \text{Formará } 4,70 \times 10^{-6} \text{ mol de Ag: } 1 \text{ mol} - 107,9\text{g} \\ 4,7 \times 10^{-6} \text{ mol} - x \end{array} \quad x = 5,08 \times 10^{-4}\text{g}$$

Esse valor em 40 mL. Assim, $[\text{Ag}] = 12,40\mu\text{g mL}^{-1}$.

Relação molar $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ é 1:2,2.

A massa de PVA utilizada foi igual a 4,00 mg. Assim, para um volume final de 40 mL tem-se $[\text{PVA}] = 100\mu\text{g mL}^{-1}$.

Da mesma forma, serão formados $4,7 \times 10^{-6}$ mol de NaNO_3 , $2,35 \times 10^{-6}$ mol de B_2H_6 e $2,35 \times 10^{-6}$ mol de H_2 .

$$\begin{array}{l} \text{B}_2\text{H}_6: 1 \text{ mol} - 27,6\text{g} \\ 2,35 \times 10^{-6} \text{ mol} - x \end{array} \quad x = 0,06\text{mg}$$

$$\begin{array}{l} \text{H}_2: 1 \text{ mol} - 2\text{g} \\ 2,35 \times 10^{-6} \text{ mol} - x \end{array} \quad x = 4,7 \times 10^{-3}\text{mg}$$

A massa total de sólidos é igual a 5,13mg:

(0,80 mg de AgNO_3 + 0,40 mg de NaBH_4 + 4,00 mg de PVA) – (0,06mg de B_2H_6 + $4,7 \times 10^{-3}\text{mg}$ de H_2).

$$\begin{array}{l} \text{NaNO}_3: 1 \text{ mol} - 85\text{g} \\ 4,7 \times 10^{-6} \text{ mol} - x \quad \quad x=0,40\text{mg} \end{array}$$

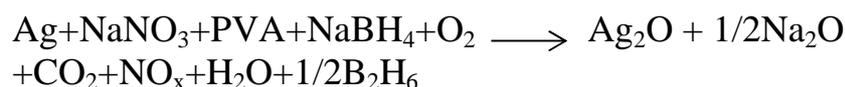
Em 5,13 g da massa total de sólidos, tem-se:
 0,51mg de Ag + 0,40mg de NaNO₃ + 4,00mg de PVA = 4,91mg.

O restante desse valor é devido ao NaBH₄ em excesso:
 $1,05 \times 10^{-5} \text{ mol} - 4,7 \times 10^{-6} \text{ mol} = 5,8 \times 10^{-6} \text{ mol} = 0,22\text{mg}$.

%Na em relação ao total de NaBH₄ é 60% (23g/37,8g). Então, de 0,40mg iniciais de NaBH₄ 0,24g são equivalentes ao sódio.

Na formação das nanopartículas de prata-PVA, na presença de O₂, há 2 possibilidades dos seguintes resíduos esperados:

Possibilidade 1: Todo sódio vai a óxido de sódio e prata vai a óxido de prata:



Início: 1 mol Na (0,24mg) (23g mol⁻¹)

Final: 1/2 mol Na₂O (62 g mol⁻¹) = 0,33mg = 6,37% de resíduo

Início: 1 mol de Ag (0,51mg) (107,9 g mol⁻¹)

Final: 1/2 mol de Ag₂O (231,8 g mol⁻¹) = 0,54mg = 10,62% de resíduo

Total de resíduos: 16,99%.

Possibilidade 2: Todo sódio vai a óxido de sódio e prata como prata:

Início: 1 mol Na (0,24mg) (23g mol⁻¹)

Final: 1/2 mol Na₂O (62 g mol⁻¹) = 0,33mg = 6,37% de resíduo

Início: 1 mol de Ag (0,51mg) (107,9 g mol⁻¹)

Final: 1 mol de Ag (107,9 g mol⁻¹) = 0,51mg = 9,94% de resíduo

Total de resíduos: 16,31%.

Assim, a massa total de sólidos é igual a 5,13mg onde:

Massa Ag = 0,51mg	9,94% (m/m)
Massa NaNO ₃ = 0,40mg	7,80%

Massa PVA =4,00mg	77,98%
Massa NaBH ₄ =0,22mg	4,28%

B. Obtenção da solução filmogênica CMC/(NPAg-PVA) e do filme CMC/(NPAg-PVA)

À solução de nanopartículas de prata-PVA obtida, adicionou-se 1% de CMC (m/v). Assim, 0,40g de CMC foram adicionados aos 40 mL de solução de nanopartículas de prata-PVA.

Dessa forma, no filme, temos uma massa sólida total de:
 5,13mg (demonstrado anteriormente) + 400,00mg de CMC = 405,13mg
 Assim, no filme sólido CMC/(NPAg-PVA):

CMC = 400,00mg	98,73% (m/m)
Ag = 0,51mg	0,13%
NaNO ₃ = 0,40mg	0,10%
PVA = 4,00mg	0,98%
NaBH ₄ = 0,22mg	0,06%