UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

PATRICIA COELHO LOMBARDO CARNIATTO

***Deposição fotoquímica de nanopartículas de prata em
argilas e avaliação da sua atividade antimicrobiana***

São Carlos
2016

PATRICIA COELHO LOMBARDO CARNIATTO

Deposição fotoquímica de nanopartículas de prata em argilas e avaliação da sua atividade antimicrobiana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para a obtenção do título Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro.

Versão corrigida
Original na unidade

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

C289d   Carniatto, Patricia Coelho Lombardo
Deposição fotoquímica de nanopartículas de prata em argilas e avaliação da sua atividade antimicrobiana / Patricia Coelho Lombardo Carniatto; orientadora Carla Cristina Schmitt Cavalheiro. São Carlos, 2016.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento Caracterização e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Nanopartículas de prata. 2. Argila. 3. Fotorredução. 4. Atividade antimicrobiana. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **PATRÍCIA COELHO LOMBARDO CARNIATTO**.

Título da tese: "Deposição fotoquímica de nanopartículas de prata em argila e avaliação da sua atividade antimicrobiana".

Data da defesa: 17/06/2016.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Carla Cristina Schmitt Cavalheiro**
(Presidente)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Titular **Miguel Guillermo Neumann**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

APROVADO

Profa. Dra. **Beatriz Eleutério Goi**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP – Presidente Prudente)

APROVADO

Profa. Dra. **Eliane Trovatti**
(Centro Universitário de Araraquara/UNIARA)

aprovado

Dra. **Joyce Laura da Silva Gonçalves**
(Pós-Doutoranda/IQSC)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Titular **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Dedicatória

Aos meus pais, José e Cacilda Mara, e aos meus irmãos, Solange e Alexandre, pelo carinho, apoio e incentivo na realização de mais um sonho.

Ao Mateus, pelo carinho e pelo grande companheiro que tenho ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro pela orientação, confiança, amizade e oportunidade de trabalho junto ao Grupo de Fotoquímica.

À Dra. Alessandra Lima Poli Leves à amizade e total apoio durante o meu doutorado.

Aos colegas do Grupo de Fotoquímica pela amizade e convivência diária.

À Letícia Felipe Abdias Pinto pela amizade e companheirismo durante o doutorado.

Ao Laboratório de Análise Térmica, Eletroanalítica e Química de Soluções, nas pessoas do Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro e do aluno Marco Antonio Horn Junior, pelo suporte na realização dos experimentos de Fotocalorimetria.

Aos Grupos de Biofísica Molecular e Eletroquímica, nas pessoas do Prof. Dr. Marcel Taback e do Prof. Dr. Ernesto Rafael Gonzalez, pelo suporte na realização dos experimentos de Espalhamento de Luz Dinâmico.

Ao Grupo de Fotossensibilizadores, nas pessoas da Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi e do aluno Lucas Fernandes Castro, pelo suporte na realização dos ensaios microbiológicos.

Ao Instituto de Bionanotecnología (Institute of Bionanotechnology) at the Universidad Nacional de Santiago del Estero (National University of Santiago del Estero).

À todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a execução desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais pela oportunidade de desenvolver o Doutorado.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Universidade de São Paulo.

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser”.

Chico Xavier

RESUMO

CARNIATTO, P. C. L. **Deposição fotoquímica de nanopartículas de prata em argilas e avaliação da sua atividade antimicrobiana.** 2016. 122 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

No presente trabalho nanopartículas de prata (NPsAg) foram preparadas via fotoquímica na presença de citrato de sódio ou argila (SWy-1, SYn-1 e Laponita B) como estabilizantes e, Irgacure 2959 ou Lucirin TPO como fotorredutores. As NPsAg foram caracterizadas por Espectroscopia de UV-Vis, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Difração de raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Durante a síntese fotoquímica, foi observado o aparecimento de uma banda de absorção plasmônica por volta de 400 nm, seguida pela alteração da coloração da solução, passando de incolor para amarela, indicando a formação das nanopartículas. As imagens de MET revelaram que durante a formação ocorre a rápida redução da prata, originando pequenas partículas esféricas, como também grandes aglomerações de prata. Durante a irradiação os aglomerados maiores desaparecem por fotofragmentação, as partículas menores coalescem até atingirem certa estabilidade e, no final da irradiação, apenas partículas de morfologia esférica estão em solução. O tipo de estrutura (intercalada ou esfoliada) obtida após a fotorredução da prata mostrou ser um fator determinante no tamanho e estabilidade das NPsAg. Os resultados de DRX mostraram que as amostras de NPsArg/Lap B, NPsLuc/Lap B e NPsLuc/SWy-1 apresentaram alguma esfoliação da argila após a redução da prata. Nesse caso, as NPsAg obtidas foram mais uniformes e com menores diâmetros (~3 nm). A esfoliação da argila promove uma maior área de adsorção e estabilidade para as NPsAg. Por outro lado as amostras com estrutura intercalada (NPsArg/SWy-1) e não intercalada (NPsArg/SYn-1 e NPsLuc/SYn-1) revelaram partículas com diâmetros maiores (5-12 nm), não uniformes e agregação de algumas partículas. A atividade antimicrobiana das argilas puras, NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila, foi investigada contra as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). A amostra de NPsLuc/SWy-1 apresentou uma ótima atividade antimicrobiana contra ambas as bactérias testadas (~ 4% de índice de sobrevivência). Por outro lado, a argila Laponita B e NPsLuc/Lap B não demonstraram nenhuma atividade antimicrobiana. A presença de sítios ácidos na região interlamelar da argila SWy-1 contribui na liberação de íons Ag^+ da superfície das NPsAg e, conseqüentemente, melhora a atividade antimicrobiana das NPsAg. Os resultados de fotocalorimetria (PCA) mostraram que os valores da porcentagem de conversão e da velocidade de polimerização (R_p) diminuem com a adição de NPsAg (5 e 10% v/v). A porcentagem de conversão mudou de 61%, na ausência de NPsAg/Citrato e NPsAg/Argila, para aproximadamente 53% na presença de de NPsAg/Citrato e NPsAg/Argila. A presença das nanopartículas pode ser responsável por uma menor penetração de luz ao sistema. Portanto, a fotólise do fotoiniciador pode ser menos eficiente.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, argila, fotorredução, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

CARNIATTO, P. C. L. **Photochemical deposition of silver nanoparticles on clays and evaluation their antimicrobial activity**. 2016. 122 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

In the present work was obtained by photochemical method silver nanoparticles (AgNPs) in the presence of citrate or clay (SWy-1, SYn-1, and Laponite B) as stabilizers and Irgacure 2959 or Lucirin TPO as photoreductors. AgNPs were characterized using UV-Vis spectroscopy, Dynamic Light Scattering (DLS), X ray Diffraction (XRD) and Transmission Electron Microscopy (TEM). During the photochemical synthesis was observed a plasmon absorption band around 400 nm, followed by a change of colour in the solution, from colorless to yellow, indicating the formation of nanoparticles. TEM images revealed that during the formation occurs a fast silver reduction, resulting in spherical particles and large silver clusters. During the irradiation, large aggregates disappeared for photofragmentation, smaller particles coalesce to achieve some stability and in the end of irradiation only spherical morphology particles were in solution. The typical structure (intercalated or exfoliated) obtained after silver photoreduction proved to be a determining factor in the size and stability of AgNPs. XRD results showed that NPslrg/Lap B, NPsluc/Lap B and NPsluc/SWy-1 samples presented some clay exfoliation after the silver reduction. The XRD results of AgNPs samples stabilized with Laponite B (NPslrg/Lap B e NPsluc/Lap B) and NPsluc/SWy-1 presented exfoliated and partially exfoliated structures, respectively. In this case, AgNPs obtained were more uniform and presented smaller diameters (~ 3 nm). The clay exfoliation promoted greater absorption area and stability for AgNPs. On the other hand, samples with intercalated (NPslrg/SWy-1) and non intercalated (NPslrg/SYn-1 e NPsluc/SYn-1) structure, presented particles with larger diameters (5-12 nm), non uniform and some aggregation of these particles. The antimicrobial activities of pure clays, NPsluc/Citrate and NPsluc/Clay were investigated against *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). The NPsluc/SWy-1 sample showed good antimicrobial activity against both tested species ($\sim 4\%$ survival index). On the other hand, Laponite B and NPsluc/Lap B samples did not demonstrate any antimicrobial activity. The presence of the acid sites in the interlayer region of the SWy-1 clay contributed to the Ag^+ ions release from the AgNPs surface, and consequently improving the AgNPs antimicrobial activity. The results showed that the conversion degree and the polymerization rate (R_p) values decreased with the addition of AgNPs (5 and 10% v/v). The conversion degree changed from 61%, in the absence of AgNPs/Clay, to 53% in the presence of the AgNPs/Clay. The presence of silver nanoparticles can be responsible for less light penetration into system. Therefore, the photolysis of the photoinitiator can be less efficient.

Keywords: Silver nanoparticles, clay, photoreduction, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cálice de Lycurgus verde quando reflete a luz e vermelho quando a luz é transmitida.....	30
Figura 2: Ilustração esquemática da ressonância plasmônica de superfície para uma nanopartícula metálica de morfologia esférica.....	31
Figura 3: Ilustração esquemática das abordagens Top-down e Bottom-up para a síntese de nanopartículas metálicas.....	32
Figura 4: Representação dos mecanismos de estabilização de nanopartículas metálicas: (A) estabilização eletrostática, (B) estabilização estérica.....	39
Figura 5: Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila do tipo (A) 1:1 e (B) 2:1.....	43
Figura 6: Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila do tipo Montmorilonita.....	44
Figura 7: Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila hectorita.....	45
Figura 8: Formas de associação entre partículas de argila em solução aquosa...	46
Figura 9: Espectros de emissão da lâmpada e absorção da amostra de Irgacure 2959 de concentração $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$	55
Figura 10: Espectro de emissão das lâmpadas germicidas e espectro de absorção do Lucirin TPO em metanol ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$).....	56
Figura 11: Ilustração esquemática da seção transversal do sistema de PCA.....	60
Figura 12: Espectro de emissão da lâmpada e espectro de absorção da solução de Irgacure 369.....	61

Figura 13: (A) Espectros de UV-Vis das soluções contendo NPsAg em diferentes intervalos de tempo de irradiação UV ($\lambda = 254$ nm) do Irg 2959. (B) Aumento da banda plasmônica no comprimento de onda fixo em 391 nm em função do tempo de irradiação UV.....	64
Figura 14: Acompanhamento visual da mudança da intensidade de cor da solução contendo Irg 2959, AgNO_3 e citrato de sódio em função do tempo de irradiação UV.....	64
Figura 15: (A) Espectros de UV-Vis das soluções contendo NPsAg em diferentes intervalos de tempo de irradiação UV ($\lambda = 254$ nm) do Lucirin TPO, (B) Aumento da banda plasmônica no comprimento de onda fixo em 400 nm em função do tempo de irradiação.....	66
Figura 16: Acompanhamento visual da mudança da intensidade de cor da solução contendo a solução de Lucirin TPO, AgNO_3 e citrato de sódio em função do tempo de irradiação UV.....	67
Figura 17: Distribuição do tamanho de partícula para (A) NPsIrg/Citrato e (B) NPsLuc/Citrato em porcentagem de volume obtidas por DLS.....	69
Figura 18: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada pelas imagens de MET para as amostras de (A e B) NPsIrg/Citrato e (C e D) NPsLuc/Citrato sintetizadas via fotoquímica.....	70
Figura 19: Ilustração esquemática da estabilização de NPsAg com citrato de sódio.....	71
Figura 20: Espectros de UV-Vis das NPsAg em diferentes intervalos de tempo de irradiação UV para as amostras estabilizadas com as argilas (A) NPsIrg/SWy-1, (B) NPsIrg/SYn-1, (C) NPsIrg/Lap B, (D) NPsLuc/SWy-1, (E) NPsLuc/SYn-1 e (F) NPsLuc/Lap B.....	73

Figura 21: Distribuição do tamanho de partícula em diferentes tempo de irradiação para (A) NPslrg/Citrato, (B) SWy-1 e NPslrg/SWy-1, (C) NPsluc/Citrato, (D) SWy-1 e NPsluc/SWy-1 em porcentagem de volume obtidas por DLS.....	76
Figura 22: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada pelas imagens de MET das alíquotas recolhidas a partir da reação de formação das NPslrg/Citrato em função do tempo (A) 5 segundos, (B) 20 segundos e (C) 5 minutos de irradiação UV.....	79
Figura 23: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada pelas imagens de MET das alíquotas recolhidas a partir da reação de formação das NPslrg/SWy-1 em função do tempo (A e B) 5 segundos, (C e D) 20 segundos e (E e F) 5 minutos de irradiação UV.....	81
Figura 24: Proposta de mecanismo de formação das NPslrg (A) estabilizadas com citrato de sódio e (B) estabilizadas com argila em função do tempo de irradiação UV investigadas por MET.....	83
Figura 25: Distribuição do tamanho de partícula para (A) SWy-1 e NPslrg/SWy-1, (B) SYn-1 e NPslrg/SYn-1, (C) Lap B e NPslrg/Lap B, (D) SWy-1 e NPsluc/SWy-1, (E) SYn-1 e NPsluc/SYn-1 e (F) Lap B e NPsluc/Lap B em porcentagem de volume obtidas por DLS.	85
Figura 26: Difrátogramas de raios X para as amostras (A e B) SWy-1, NPslrg/SWy-1 e NPsluc/SWy-1, (C e D) SYn-1, NPslrg/SYn-1 e NPsluc/SYn-1, (E e F) Lap B, NPslrg/Lap B e NPsluc/Lap B.....	88
Figura 27: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada pelas imagens de MET para as (A) NPslrg/SWy-1, (B) NPslrg/SYn-1 e (C) NPslrg/Lap B sintetizadas via fotoquímica.....	92
Figura 28: Ilustração esquemática de formação de NPslrg intercaladas na argila...	93
Figura 29: Ilustração esquemática de formação de NPslrg adsorvidas nas lamelas esfoliadas de argila Laponita B.....	94

Figura 30: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada por MET para as (A-C) NPsLuc/SWy-1, (D-F) NPsLuc/SYn-1 e (G-I) NPsLuc/Lap B.....	96
Figura 31: Espectros de absorção UV-Vis em função do tempo para as amostras de (A) NPslrg/Citrato e (B) NPsLuc/Citrato.....	98
Figura 32: Espectros de absorção UV-Vis em função do tempo para as amostras de (A-C) NPslrg/Argila e (D-F) NPsLuc/Argila.....	99
Figura 33: Índice de Sobrevivência das bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> incubadas por 24 h a 37 °C com argilas puras, NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila.....	102
Figura 34: Porcentagem de conversão dos sistemas HEMA/EGDMA com 5 e 10% (v/v) de (A) NPslrg/Citrato, (B) NPslrg/Argila, (C) NPsLuc/Citrato e (D) NPsLuc/Argila.....	107
Figura 35: Velocidade de polimerização (R_p) em função do tempo de irradiação, para os sistemas HEMA/EGDMA com 5 e 10% (v/v) de (A) NPslrg/Citrato, (B) NPslrg/Argila, (C) NPsLuc/Citrato e (D) NPsLuc/Argila.....	108

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esquema de fotorredução direta para a formação de nanopartículas metálicas.....	35
Esquema 2: Esquema de redução fotossensibilizada para a formação de nanopartículas metálicas.....	36
Esquema 3: Mecanismo de formação via fotoquímica de NPsAg com Irgacure 2959 como fotorredutor.....	65
Esquema 4: Síntese de NPsAg via fotoquímica utilizando o Lucirin TPO como fotorredutor.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos principais reagentes utilizados.....	50
Tabela 2: Propriedades e composição dos argilominerais utilizados.....	52
Tabela 3: Distâncias interlamelares (d_{001}) das argilas antes e após a redução fotoquímica da prata.....	89
Tabela 4: Diâmetros das NPsAg obtidos por DRX.....	91
Tabela 5: Distribuição de tamanho para as amostras de NPsIrg/Citrato, NPsIrg/Argila, NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila obtido por DRX, MET e DLS.....	97
Tabela 6: Comprimento de onda inicial (λ_0) e final (λ), $[Ag^+]$ liberados após 1 e 30 dias e variação da intensidade da banda de absorção plasmônica após 30 dias de síntese.....	101
Tabela 7: Índice de sobrevivência para as bactérias com argilas puras, NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila. Os experimentos foram realizados em triplicata e utilizou-se o valor médio.....	104
Tabela 8: Velocidades de polimerização e porcentagens de conversão total dos polímeros obtidos a partir dos sistemas HEMA/EGDMA com 5 e 10% (v/v) de NPsIrg/Citrato, NPsIrg/Argila, NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NPs - nanopartículas

NPsAg - Nanopartículas de prata

NaBH₄ - borohidreto de sódio

PVP - polivinilpirrolidona

SDS - dodecilsulfato de sódio

AgNO₃ - nitrato de prata

Ag⁺ - íons de prata

M⁰ - nanopartícula metálica

NaOH - hidróxido de sódio

HCl - ácido clorídrico

NaCl - cloreto de sódio

Irg 2959 - Irgacure 2959

Irg 369 - Irgacure 369

SWy-1 - argilomineral montmorilonita natural - SWy-1

SYn-1 - argilomineral montmorilonita sintética - SYn-1

Lap B - argilomineral hectorita sintética - Laponita B

EGDMA - Dimetacrilato de etilenoglicol

HEMA - 2-Hidroxietil metacrilato

SPB - *Surface Plasmon Band*

CTC - capacidade de troca catiônica

CFU/mL - unidades formadoras de colônia por mL

PBS - tampão fosfato salina

R_p - velocidades de polimerização

E. coli - *Escherichia coli*

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

NPslrg/Citrato - nanopartículas de prata preparadas com Irgacure 2959 estabilizadas com citrato de sódio

NPsluc/Citrato - nanopartículas de prata preparadas com Lucirin TPO estabilizadas com citrato de sódio

NPslrg/Argila - nanopartículas de prata preparadas com argila

NPslrg/SWy-1 - nanopartículas de prata preparadas com Irgacure 2959 e argila SWy-1

NPslrg/SYn-1 - nanopartículas de prata preparadas com Irgacure 2959 e argila SYn-1

NPslrg/Lap B - nanopartículas de prata preparadas com Irgacure 2959 e argila Laponita B

NPsluc/SWy-1 - nanopartículas de prata preparadas com Lucirin TPO e argila SWy-1

NPsluc/SYn-1 - nanopartículas de prata preparadas com Lucirin TPO e argila SYn-1

NPsluc/Lap B - nanopartículas de prata preparadas com Lucirin TPO e argila Laponita B

UV-Vis - Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

DLS - Espalhamento de luz dinâmico (*Dinamic Light Scattering*)

DRX - Difração de raios X

PCA - Fotocalorimetria

MTT - (3- (4,5-dimetiltiazol, 2-yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina

SUMÁRIO

---

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. NANOTECNOLOGIA.....	29
1.2. NANOPARTÍCULAS DE PRATA	29
1.2.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	32
1.2.2. ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	38
1.2.3. MECANISMOS DE AÇÃO DA PRATA.....	40
1.3. ARGILAS	42
1.3.1. Estrutura cristalina e classificação de um argilomineral	42
1.3.2. Propriedades de um argilomineral.....	45
1.4. NANOCOMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA/ARGILA	47
2. OBJETIVOS.....	49
3. PARTE EXPERIMENTAL	50
3.1. MATERIAIS	50
3.2. MÉTODOS	53
3.2.1. Purificação da argila	53
3.2.2. Síntese das NPsAg com Irgacure 2959.....	54
3.2.3. Síntese das NPsAg preparadas com Lucirin TPO	55
3.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO UTILIZADAS.....	56
3.3.1. Espectroscopia na região do UV-Visível	56
3.3.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	57
3.3.3. Difração de raios X (DRX)	58
3.3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	58
3.4. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	59
3.5. FOTOCALORIMETRIA (PCA).....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
4.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NPsAg).....	63
4.1.1. NPsAg/Citrato preparadas com Irg 2959 (NPsIrg/Citrato) e Lucirin TPO (NPsLuc/Citrato).....	63
4.1.2. NPsAg preparadas com Irg 2959 (NPsIrg/Argila) e Lucirin TPO (NPsLuc/Argila) estabilizadas com diferentes argilas.....	72

4.1.3. Estudo do mecanismo de formação das NPsAg	74
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NPSAG	84
4.2.1. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	84
4.2.2. Difração de raios X (DRX).....	87
4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	91
4.3 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS NPSAG	98
4.4. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	102
4.5. APLICAÇÃO DE NPSAG EM POLIMERIZAÇÃO FOTOINICIADA	106
5. CONCLUSÕES	111
6. REFERÊNCIAS	113

INTRODUÇÃO

1.1. Nanotecnologia

Em 1959 as ideias e conceitos por trás da nanotecnologia e nanociência foram inicialmente abordados pelo físico Richard Feynman em sua palestra intitulada “Há espaço de sobra lá embaixo”, do inglês “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, em uma reunião da American Physical Society no California Institute of Technology (Caltech). Em sua palestra Richard Feynman descreve a possibilidade de cientistas em manipular e controlar átomos e moléculas individualmente (TOLOCHKO, 2009; GAMA, 2013).

O termo “nanotecnologia” foi introduzido em 1974, na Universidade de Ciências de Tóquio pelo professor Norio Taniguchi para descrever a manufatura precisa de materiais com dimensões nanométricas (TOLOCHKO, 2009).

O termo foi reinventado e sua definição expandida pelo professor K. Eric Drexler do Massachusetts Institute of Technology - MIT, mais especificamente em seu livro “Engines of Creation - The Coming Era of Nanotechnology”, de 1986 (TOLOCHKO, 2009).

Dessa maneira, o termo nanotecnologia pode ser definido como o estudo, a produção, a manipulação e a caracterização de partículas que possuem dimensões em escala nanométrica entre 1 e 100 nm (IRAVANI et al., 2014).

1.2. Nanopartículas de Prata

O uso de nanomateriais tem ganhado cada vez mais destaque devido suas propriedades em escala nanométrica (10^{-9} m) que podem ser diferentes daquelas apresentadas quando em escala macroscópica (DURAN; MORAIS; MATTOSO, 2006).

Desde o tempo dos romanos, artefatos antigos já utilizavam nanomateriais em sua composição, como por exemplo, o cálice de Lycurgus pelos romanos (FREESTONE et al., 2007), pinturas e esculturas maias que utilizavam nanopartículas de óxidos e metais para obtenção da coloração azul (JOSE-YACAMAN et al., 1996). Os pigmentos utilizados para decorar o cálice de Lycurgus

são uma suspensão de partículas de ouro e prata com diâmetro de 70 nm. Devido à presença dessas nanopartículas metálicas o cálice apresenta diferentes colorações (Figura 1), coloração verde quando a luz é refletida e, coloração vermelha para luz transmitida (ROGERS; PENNATHUR; ADAMS, 2011).

Figura 1: Cálice de Lycurgus verde quando reflete a luz e vermelho quando a luz é transmitida. Fonte: FREESTONE et al., 2007.

Um dos aspectos mais fascinantes das nanopartículas metálicas são suas propriedades ópticas. Muitos metais em escala nanométrica, como a prata e o ouro, exibem forte absorção na região do visível do espectro eletromagnético, proporcionando-lhes colorações características, coloração amarela para nanopartículas de prata e coloração roxa para nanopartículas de ouro de morfologia esférica. Essa absorção é atribuída à oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução em resposta a um campo eletromagnético incidente. Essa absorção óptica é denominada como banda de ressonância plasmônica de superfície (do inglês, *Surface Plasmon Band* - SPB) ou banda de absorção plasmônica. A Figura 2 ilustra como ocorre a oscilação dos elétrons de uma partícula esférica frente a um campo elétrico (LIZ-MARZÁN, 2006; ZHANG; NOGUEZ, 2008).

Figura 2: Ilustração esquemática da ressonância plasmônica de superfície para uma nanopartícula metálica de morfologia esférica. Fonte: Adaptação de ZHANG; NOGUEZ, 2008.

A posição e o perfil da banda de absorção plasmônica, bem como a coloração do material obtido após a síntese está relacionado com o tamanho e morfologia das partículas. Dessa maneira, para um metal como a prata ou ouro, é possível obter uma ampla faixa de absorção na região do espectro eletromagnético através do controle da morfologia ou da estrutura do nanomaterial (ZHANG; NOGUEZ, 2008).

Dentre as nanopartículas metálicas que têm recebido bastante atenção estão as nanopartículas de prata (NPsAg) devido suas propriedades físicas, químicas e biológicas. NPsAg apresentam distintas propriedades físico-químicas, incluindo alta condutividade térmica e elétrica, estabilidade química e atividade catalítica. Devido essas propriedades as NPsAg podem ser aplicadas em diversas áreas como, na saúde, medicina, cosméticos, alimentação, ambiental, fabricação de sensores, óptica, eletrônica e microeletrônica, eletromagnética, catálise, células fotovoltaicas, entre outras (IRAVANI et al., 2014). Além disso, NPsAg exibem atividade antimicrobiana para um amplo espectro de bactérias e fungos, tornando possível sua aplicação em vários produtos de consumo, incluindo plásticos, pastas, sabonetes, cosméticos, comida e produtos têxteis (TRAN; NGUYEN; LE, 2013).

1.2.1. Síntese de Nanopartículas de Prata

Em geral, os métodos utilizados no preparo de nanopartículas metálicas podem ser agrupados em duas diferentes abordagens: de-cima-para-baixo (*Top-down*) ou de-baixo-para-cima (*Bottom-up*) (Figura 3). O primeiro, *Top-down*, envolve a utilização de partículas macroscópicas que são reduzidas para a escala nanométrica por processos físicos, químicos ou mecânicos. Enquanto que o *Bottom-up* estruturas orgânicas e inorgânicas são formadas átomo por átomo, molécula por molécula, cluster por cluster. Nesta categoria os materiais são sintetizados a partir de átomos ou moléculas via reações químicas (MUZAMIL et al., 2014; PACIONE et al., 2015).

Figura 3: Ilustração esquemática das abordagens Top-down e Bottom-up para a síntese de nanopartículas metálicas. Fonte: Adaptação de ZAHMAKIRAN; OZKAR, 2011.

Com isso, nanopartículas de prata podem ser preparadas por dois métodos: os métodos físicos e químicos. No método físico as nanopartículas são sintetizadas

por evaporação/condensação e por irradiação por pulso de laser. No método químico, os íons metálicos são reduzidos por redução química utilizando agentes orgânicos ou inorgânicos. Geralmente, o processo de síntese por redução química necessita de três componentes principais: o precursor metálico, um agente redutor e um agente estabilizante em meio aquoso ou em solventes orgânicos. Na síntese das NPsAg via redução química, uma grande diversidade de agentes redutores são utilizados, pode-se citar o borohidreto de sódio (NaBH_4) (PATAKFALVI; DÉKÁNY, 2004; POLTE et al., 2012; CHHATRE et al., 2012), metanol (SU et al., 2011), hidrazina (SAKAI et al., 2006), ácido ascórbico (SONDI; GOIA; MATIJEVIĆ, 2003), β -D-glucose (RAVEENDRAN; FU; WALLEN, 2003) e formaldeído (PRAUS et al., 2010). O método de redução química é o método mais utilizado para a síntese de NPsAg. Além disso, técnicas eletroquímicas têm sido utilizadas na síntese de nanoestruturas metálicas (ZHANG; NOGUEZ, 2008).

Um método de decomposição térmica foi desenvolvido por Lee e Kang para sintetizar NPsAg em forma de pó. As NPsAg foram formadas por decomposição de um complexo de Ag^+ /oleato, o qual foi preparado a partir da reação de nitrato de prata (AgNO_3) e oleato de sódio em solução aquosa à temperatura de 290 °C. Os autores obtiveram nanopartículas com tamanho médio de 9,5 nm $\pm$ 0,7 nm. Isso indica que as NPsAg sintetizadas possuem uma estreita distribuição de tamanho (LEE; KANG, 2004).

Em outro trabalho Jung et al, reportaram a síntese de nanopartículas metálicas (Ag) por evaporação/condensação usando um pequeno aquecedor de cerâmica com área de aquecimento local no qual os metais podem ser evaporados. O aquecedor de cerâmica é capaz de atingir temperaturas de até 1500 °C em 10 segundos em uma área de aquecimento local de 5x10 mm². Os resultados mostram que o diâmetro geométrico médio, o desvio padrão geométrico e a concentração total de nanopartículas aumenta com a temperatura da superfície de aquecimento, e que as nanopartículas de Ag obtidas eram esféricas e não aglomeradas. O diâmetro geométrico médio e o desvio padrão geométrico obtido para as NPsAg variaram de 6,2-21,5 nm e 1,23-1,88 nm, respectivamente (JUNG et al., 2006).

Sun e Xia sintetizaram nanocubos de prata monodisperso em grande quantidade pela redução química de AgNO_3 com etileno glicol na presença do polímero polivinilpirrolidona (PVP). Nesse caso o etileno glicol foi utilizado tanto

como agente redutor como solvente no preparo dos nanocubos de prata. Os estudos mostraram que a morfologia e o tamanho dos nanocubos de prata possuem forte dependência com a presença e proporção molar de PVP com relação ao AgNO_3 (SUN; XIA, 2002).

Song et al obtiveram nanopartículas de prata via redução química AgNO_3 com borohidreto de sódio (NaBH_4) na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) como estabilizante. As amostras foram caracterizadas por MET e as imagens mostraram que a porção de agregados de partículas é dependente da razão molar de $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$. Para quantidades menores de NaBH_4 grande formação de agregados de nanopartículas de prata foi observado. No entanto, com o aumento da concentração de NaBH_4 , reduziu a quantidade de agregados de nanopartículas e o seu grau de dispersão melhorou consideravelmente (SONG et al., 2009).

É descrito por Wojtysiak e Kudelski, na síntese de nanopartículas de prata através da redução química de AgNO_3 com NaBH_4 , que a presença de oxigênio influencia no tamanho das nanopartículas de prata. Os autores observaram que as nanopartículas obtidas na presença de oxigênio apresentaram tamanhos maiores em relação as que foram sintetizadas em solução de aerada (WOJTYSIAK; KUDELSKI, 2012).

Wanga et al. reportaram a produção de nanopartículas de prata via redução química de morfologia esférica com tamanho entre 20-80 nm. As nanopartículas foram sintetizadas em solução contendo PVP pela redução do nitrato de prata com glucose na presença de hidróxido de sódio para melhorar a velocidade da reação (WANG et al., 2005).

Outro método que tem atraído grande atenção devido ao controle espacial, temporal e a grande versatilidade da técnica no preparo de nanopartículas metálicas é a redução via fotoquímica. Com a redução fotoquímica é possível obter nanopartículas em diversos meios, como por exemplo, emulsão, micelas de surfactantes, filmes de polímeros, vidros, entre outros (SAKAMOTO; FUJISTUKA; MAJIMA, 2009). Na redução via fotoquímica as nanopartículas podem ser formadas de duas maneiras distintas, pela fotorredução direta ou pela redução fotossensibilizada do precursor metálico.

Na fotorredução direta, nanopartículas metálicas (M^0) são formadas através da excitação direta do precursor metálico em solução (Esquema 1). Nesse caso, os

elétrons são gerados pelo processo de fotólise do solvente e, ocorre a transferência de elétrons do solvente para íons de prata (Ag^+). Por ser um método isento de agentes de redução, a síntese de NPs metálicas pode ser realizada em vários meios, incluindo filmes de polímeros, vidros, etc (SAKAMOTO; FUJISTUKA; MAJIMA, 2009).

Esquema 1: Esquema de fotorredução direta para a formação de nanopartículas metálicas. Fonte: Adaptação de SAKAMOTO; FUJISTUKA; MAJIMA, 2009.

Hada et al. investigaram a formação de NPs_{Ag} via excitação direta do perclorato de prata (AgClO_4) em solução aquosa e alcoólica. De acordo com o mecanismo proposto pelos autores, a fotorredução ocorre pela transferência de elétrons da molécula de solvente para os íons Ag^+ gerando Ag^0 , que por associação formam as NPs_{Ag}. Os autores estudaram a importância da reatividade da molécula do solvente na formação das NPs_{Ag} (HADA; YONEZAWA; KURAKAKE, 1976).

Sato-Berrú et al. em seu trabalho prepararam nanopartículas de prata por meio da fotorredução direta de AgNO_3 na presença de citrato de sódio com diferentes fontes de luz (UV, branca, azul, ciano, verde e laranja) à temperatura ambiente. Os autores mostraram que este processo de modificação da fonte de iluminação no preparo das nanopartículas (NPs) resultou em um colóide com propriedades ópticas distintas, que podem estar relacionadas com o tamanho e morfologia das partículas (SATO-BERRÚ et al., 2009).

O método de redução fotossensibilizada usa reagentes fotoativos que geram intermediários por fotoirradiação, estes intermediários reduzem o precursor metálico para a forma M^0 (Esquema 2).

Esquema 2: Esquema de redução fotossensibilizada para a formação de nanopartículas metálicas. Fonte: Adaptação de SAKAMOTO; FUJISTUKA; MAJIMA, 2009.

Esses reagentes que irão gerar moléculas excitadas e radicais são chamados de fotossensibilizadores e podem ser classificados em dois grupos de acordo com o mecanismo de formação: abstração de hidrogênio e clivagem de ligação (SAKAMOTO; FUJISTUKA; MAJIMA, 2009).

A vantagem do método de redução fotossensibilizada é a rápida e eficiente formação de nanopartículas metálicas quando comparada à fotorredução direta. Outra vantagem é a flexibilidade do comprimento de onda de excitação, uma vez que não depende da fonte do metal precursor das nanopartículas, mas sim do sensibilizador utilizado na síntese (SAKAMOTO; FUJISTUKA; MAJIMA, 2009).

Zaarour et al. sintetizaram NPsAg em suspensão de cristais de zeólita por irradiação com lâmpada de Xe-Hg (200 W) na presença de um agente redutor fotoativo (2-hidroxy-2-metilpropiofenona). Os resultados de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que as NPsAg estão localizados predominantemente dentro dos microporos e em menor quantidade na superfície externa dos cristais de zeólita com tamanho de 5-6 nm (ZAAROUR et al., 2014).

Stamplecoskie e Scaiano sintetizaram NPsAg a partir da irradiação UVA de uma solução de $AgNO_3$, Irgacure 2959 como fotorredutor e citrato de sódio como estabilizante. Após a irradiação os autores obtiveram NPsAg com aproximadamente 3 nm de diâmetro e morfologia esférica. Essa solução de NPsAg foi irradiada com LEDs de diferentes comprimentos de onda. Os autores demonstraram a versatilidade de se obter nanopartículas de prata com diferentes tamanhos e morfologias (esféricas, dodecaédricas, nanoplacas e nanobastões, etc) (STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2010). Em outro trabalho, os autores estudaram a

formação e estabilidade de dímeros de prata (Ag_2) em solução coloidal levando a formação de NPsAg. As NPsAg foram sintetizadas em solução de tolueno utilizando como precursor de prata o acetato de prata (AgCF_3COO), Irgacure 2959 como agente redutor fotoquímico e como estabilizante a ciclohexilamina (CHA). A cinética de formação foi monitorada pela técnica de fotólise por pulso de laser em 355 nm de irradiação. As mudanças de absorção em 450 nm, decorrente da formação de Ag_2 , foram monitoradas ao longo do tempo de irradiação. Com os experimentos os autores concluíram que a formação de aglomerados de Ag_2 é controlada por difusão (STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2011). Scaiano et al. em outros trabalhos prepararam via fotorredução, nanopartículas de ouro e cobalto, utilizando como agentes redutores os fotoiniciadores Irgacure 2959 e Irgacure 907, respectivamente (MARIN; MCGILVRAY; SCAIANO, 2008; WEE et al., 2011).

Jradi et al. prepararam nanopartículas de prata e nanofios de prata via redução fotossensibilizada na presença de Irgacure 819 e isopropanol sendo as amostras irradiadas com luz azul (405 nm). Neste estudo avaliou-se as condições de irradiação sobre o tamanho e quantidade de NPsAg formada. Para baixas intensidades de luz os autores observaram a formação de um número limitado de nanopartículas com tamanho médio de 100 nm. Enquanto que, o aumento de intensidade levou a formação de uma maior quantidade de nanopartículas de menor tamanho (50 nm). Em experimento adicional, os autores produziram nanofios de prata na extremidade de um polímero por fotopolimerização e fotorredução da prata simultaneamente (JRADI et al., 2010).

As principais vantagens de utilizar as sínteses via fotoquímica, direta e fotossensibilizada, são:

- processos limpos, de alta resolução espacial;
- produção *in situ* de agentes redutores que controlam a formação de nanopartículas pela fotoirradiação;
- possui grande versatilidade, pois a síntese fotoquímica permite a síntese de nanopartículas em vários meios incluindo emulsão, micelas de surfactantes, filmes poliméricos, vidros, células, etc (TRAN; NGUYEN; LE, 2013).

1.2.2. Estabilização das Nanopartículas de Prata

Em nanotecnologia alguns termos como aglomeração, agregação e coalescência são definidos de acordo com a ISO Standard 27687. De acordo com a ISO Standard 27687, aglomeração é definida como uma “coleção de partículas ligadas fracamente ou agregados ou misturas desses dois, em que a área superficial externa é similar a soma das superfícies das nanopartículas individuais. As forças que mantêm o aglomerado unido são forças fracas, como por exemplo, força de Van der Waals, ou uma simples atração física”. O termo agregação é descrito como “partículas fortemente ligadas ou fundidas em que a superfície externa pode ser significativamente menor do que a soma das áreas das superfícies calculadas em relação aos componentes individuais. As forças que mantêm o agregado unido são forças fortes, como ligações covalentes e/ou forças resultantes de sinterização”. Por fim, coalescência é definida pela IUPAC Compendium of Chemical Terminology como um “processo em que dois domínios de composição essencialmente idêntico em contato um com o outro origina um domínio de fase maior. O processo de coalescência causa uma redução na área de superfície total” (POLTE et al., 2012).

As agregações e/ou aglomerações podem ser causadas pela combinação das forças atrativas de Van der Waals e dos movimentos Brownianos das nanopartículas em suspensão que provocam a colisão das nanopartículas umas com as outras. Independente da metodologia empregada para obtenção das NPsAg, é necessário a adição de estabilizantes durante a síntese ou estocagem para aumentar seu tempo de uso e, promover a homogeneidade da dispersão coloidal. (GARCIA, 2011).

Para estabilizar e evitar a agregação das nanopartículas metálicas dois mecanismos são utilizados: estabilização eletrostática e estabilização (Figura 4 A e B).

Figura 4: Representação dos mecanismos de estabilização de nanopartículas metálicas: (A) estabilização eletrostática, (B) estabilização estérica. Fonte: Adaptação de GARCIA, 2011.

O primeiro tipo, a estabilização eletrostática, ocorre por causa da presença de cargas na superfície das nanopartículas (Figura 4 A). Nesse caso ocorre a formação de uma dupla camada elétrica que protege as partículas de agregarem devido à repulsão eletrostática de cargas de mesma natureza. No segundo mecanismo, a estabilização estérica (Figura 4 B), moléculas orgânicas como polímeros e biopolímeros, surfactantes, DNA e peptídeos são ligadas à superfície das nanopartículas que criam uma barreira entre as mesmas impedindo a agregação (SONDI; GOIA; MATIJEVIĆ, 2003; DONG; TSAI; LIN, 2011; CHADHA; MAITI; KAPOOR, 2014).

1.2.3. Mecanismos de ação da Prata

O efeito antimicrobiano de sais de prata é conhecido desde a antiguidade. Durante séculos a prata tem sido utilizada contra queimaduras e feridas crônicas, bem como para o tratamento de doenças venéreas, fístula de glândula salivares, ossos e abscesso perianal. Com a introdução da penicilina houve uma diminuição do uso de prata nos tratamentos de infecções bacterianas. No entanto, a utilização excessiva de antibióticos resultou num grande número de bactérias resistentes a vários antibióticos, fazendo com que o interesse pela prata retornasse (RAI; YADAV; GADE, 2009).

As NPsAg, em relação aos outros metais, têm apresentado maior efeito antimicrobiano contra um amplo espectro de microrganismos, como bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos e vírus. Por apresentarem maior área superficial, promovem melhor contato com os microrganismos (RAI; YADAV; GADE, 2009; ACTIS et al., 2015; MARYAN; MONTAZER, 2015).

A ação antimicrobiana de NPsAg, íons de prata e compósitos de prata tem sido investigada na literatura (SOHRABNEZHAD et al., 2014).

Segundo Prabhu e Poulouse, o mecanismo exato de como as NPsAg agem para causar o efeito antimicrobiano não é claramente elucidado (PRABHU; POULOSE, 2012). No entanto, vários mecanismos da ação da prata metálica, íons de prata e nanopartículas de prata têm sido sugeridos. Esses mecanismos baseiam-se na morfologia e alterações estruturais encontradas nas células bacterianas (RAI; YADAV; GADE, 2009).

As NPsAg possuem a habilidade de prender-se à parede celular bacteriana e também de penetrar no interior da bactéria causando a morte da célula (PRABHU; POULOSE, 2012).

A formação de radicais livres pelas NPsAg pode ser considerado um dos mecanismos de ação da prata que provoca a morte do microrganismo. Nesse caso, estudos sugerem que os radicais livres formados quando em contato com o microrganismo causam danos na membrana celular provocando a formação de poros e consequentemente levando a célula bacteriana à morte (PRABHU; POULOSE, 2012).

Além disso, é proposto que a atividade antimicrobiana de NPsAg possa estar relacionada com a liberação de íons Ag^+ da superfície das nanopartículas. Esses íons podem interagir com grupos tiol (-SH) de várias enzimas acarretando sua inativação. A inativação das enzimas pelos íons Ag^+ promove a formação de espécies reativas de oxigênio que desencadeiam reações bioquímicas resultando na morte celular (PRABHU; POULOSE, 2012).

As NPsAg podem interagir com organelas dentro da célula bacteriana que possuem em sua composição enxofre e fósforo, como o DNA. Nesse caso, essa interação promove problemas na replicação do DNA da bactéria, causando a morte celular (PRABHU; POULOSE, 2012).

Vários trabalhos a respeito da ação antimicrobiana de NPsAg principalmente contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* têm sido publicados (FENG et al., 2000; KIM et al., 2007; LARA et al., 2009; NANDA; SARAVANAN, 2009; CHANDRAKANTH et al., 2014; MUZAMIL et al., 2014).

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria Gram negativa encontrada no trato intestinal de alguns animais, inclusive do ser humano. As bactérias *E. coli* contidas no intestino humano não causam problemas de saúde. No entanto existem outras cepas de *E. coli* que são potenciais causadoras de diarreia. A *E. coli* é a segunda fonte mais comum de infecção cujos pacientes requerem hospitalização (17,3%), ficando atrás somente da *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (18,8%) (ANVISA, 2013).

A *S. aureus* é uma bactéria Gram positiva que pode ser encontradas na pele e nas fossas nasais dos seres humanos. No entanto, esse tipo de bactéria pode causar desde simples infecções, como por exemplo, espinhas, furúnculos e celulites, como também infecções mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras. Devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência aos antibióticos, *S. aureus* tornou-se uma das bactérias de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS et al., 2007).

1.3. Argilas

A definição de argila pode apresentar diferentes sentidos e interpretações de acordo com os setores científicos e tecnológicos que utilizam este material. Por exemplo, para um ceramista a argila é um material que ao ser misturado com água resulta em uma pasta plástica; para um sedimentologista argila se refere a um termo granulométrico que abrange todo o sedimento em que dominam partículas com diâmetro esférico equivalentes ou menores que 2 μm ; já para o petrologista o termo argila se refere a uma rocha composta por partículas finas de minerais (GOMES, 1988; SANTOS, 1989).

A definição clássica denomina argila como sendo um material natural, terroso, com granulação fina, que adquire certa plasticidade quando umedecido com água. Os minerais constituintes das argilas são os argilominerais. Esses são silicatos hidratados de alumínio e ferro, com estrutura em camadas constituídas por folhas contínuas formadas por tetraedros de silício (ou alumínio) e oxigênio, e folhas formadas por octaedros de alumínio (magnésio ou ferro), oxigênio e hidroxilas (GOMES, 1988; SANTOS, 1989).

1.3.1. Estrutura cristalina e classificação de um argilomineral

Existem vários tipos de argilominerais que estão organizados em folhas (lamelas) e camadas. Os argilominerais também são conhecidos como filossilicatos (do grego phyllon, folha) e estão divididos em duas classes gerais: a) silicatos cristalinos com estrutura em camada ou lamelar e b) silicatos cristalinos com estrutura fibrosa (GOMES, 1988; SANTOS, 1989).

Os silicatos cristalinos com estrutura lamelar podem ser classificados em grupos ou famílias de acordo com a maneira que as folhas tetraédricas estão ligadas as octaédricas: **a)** camadas 1:1 ou difórmicos e **b)** camadas 2:1 ou trifórmicos. Por exemplo, quando o argilomineral é formado pela combinação de uma folha octaédrica com uma folha tetraédrica forma-se um argilomineral do tipo 1:1, no entanto, quando ocorre a combinação de uma folha octaédrica com duas folhas tetraédricas, como um sanduíche, origina-se um argilomineral do tipo 2:1 (GOMES,

1988; SANTOS, 1989). A Figura 5 A e B representa a combinação das camadas de um argilomineral do tipo 1:1 e 2:1.

Figura 5: Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila do tipo (A) 1:1 e (B) 2:1. Fonte: Adaptação de GOMES, 1988

Outra forma de classificação dos argilomimerais está relacionada ao cátion que pode ocupar a folha octaédrica. Se o cátion da folha octaédrica for divalente, Mg^{2+} , por exemplo, todos os sítios octaédricos estarão ocupados e o mineral será classificado como sendo do tipo trioctaédrico. Para íons trivalentes (Al^{3+}), só 2/3 dos sítios estarão ocupados, resultando em um silicato dioctaédrico (GOMES, 1988; SANTOS, 1989).

Montmorilonita (MMT) é um argilomineral pertencente ao grupo das esmectitas, cuja fórmula química geral é dada pela $M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}-(OH)_4$. Pertence ao grupo dos filossilicatos do tipo 2:1 o qual é constituído por duas folhas tetraédricas de silicato e uma folha central octaédrica. As camadas sucessivas estão ligadas fracamente entre si e camadas de água ou de moléculas polares, com espessuras variáveis, podem entrar entre elas. Entre o espaçamento interlamelar existem cátions trocáveis como Na^+ , Ca^{2+} , Li^+ , fixos eletrostaticamente e com a função de compensar as cargas negativas geradas por substituições isomórficas que ocorrem no reticulado, como por exemplo, Al^{3+} por Mg^{2+} ou Fe^{2+} , ou Mg^{2+} por Li^+ (GOMES, 1988; SANTOS, 1989) (Figura 6).

Figura 6: Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila do tipo Montmorilonita. Fonte: Adaptação de ALEXANDRE; DUBOIS, 2000.

Uma vez que suas camadas são carregadas negativamente, ela apresenta grande capacidade de troca catiônica de 40-150 meq/100g de argila. Esta propriedade torna a MMT capaz de incorporar entre suas lamelas vários compostos orgânicos e inorgânicos carregados positivamente. Quando hidratadas, as lamelas da montmorilonita são separadas umas das outras devido ao processo de inchamento que é controlado pelo cátion associado à estrutura da argila. No processo de secagem as partículas de MMT tendem a sofrer agregação de suas camadas estruturais (SANTOS, 1989).

Entre 1965 e 1970, as Indústrias Laporte desenvolveram e introduziram no mercado internacional uma hectorita sintética a partir de talco; a “*Laponite B*” que possui a estrutura e também as propriedades tecnológicas idênticas à hectorita-Na natural, além de ser livre de impurezas (COELHO; SANTOS; SANTOS, 2007).

Laponita é um silicato lamelar sintético com estrutura e composição similares a uma hectorita natural do grupo das esmectitas. Sua estrutura lamelar é do tipo 2:1 (duas folhas tetraédricas e uma central octaédrica) na forma de discos com aproximadamente 25 nm de diâmetro e 1 nm de espessura (Figura 7). Alguns íons de magnésio localizados na folha central (octaédrica) são substituídos por íons de lítio, resultando em uma carga líquida negativa da lamela, o qual é balanceada por íons trocáveis de sódio localizados entre as lamelas (LIU et al., 2007; (HUANG; YANG, 2008) (HILL; ZHANG; WHITTEN, 2015).

Figura 7: Modelo esquemático da estrutura básica de uma argila hectorita. Fonte: Adaptação de HARAGUCHI, 2011.

Devido à atração eletrostática entre a carga positiva na extremidade do cristal e a carga negativa sobre a superfície do disco, cristais de laponita formam um gel altamente tixotrópico em concentrações de aproximadamente 1% de Laponita, enquanto que em outras condições é observado a formação de um líquido viscoso (LIU et al., 2007; HUANG; YANG, 2008; HILL; ZHANG; WHITTEN, 2015).

1.3.2. Propriedades de um argilomineral

Algumas das propriedades das argilas advêm do fato de apresentarem uma carga líquida negativa em suas camadas, também chamadas de lamelas. A substituição isomórfica nas folhas tetraédricas de átomos de Si^{4+} por átomos de Al^{3+} ou, a substituição de Al^{3+} por Mg^{2+} nas folhas octaédricas, resulta em um excesso de carga negativa no cristal. Esse excesso de carga negativa é compensado pela adsorção de cátions nas superfícies externas das camadas. A extensão da substituição isomórfica, que corresponde à magnitude das cargas nas camadas, é medida pela quantidade de cátions adsorvidos necessária para neutralizar as cargas negativas nas camadas do material, chamada de capacidade de troca catiônica (CTC). A CTC das argilas do tipo esmectitas (montmorilonitas e hectoritas), está entre 40 e 150 meq/100g de argila (GOMES, 1988; SANTOS, 1989).

Outra característica importante das argilas está relacionada ao processo pelo qual o espaçamento basal (d_{001}) se expande além do seu limite original, como

resultado da adsorção de moléculas de água nos espaços interlamelares. Este processo é chamado inchamento (swelling) (SANTOS, 1989). O grau de inchamento depende de várias condições, entre elas, a carga da partícula de argila, natureza do contra-íon, energias de hidratação envolvidas, força iônica do meio e a água total contida.

A dispersão de argila em água é governada por um equilíbrio de ionização, estabelecido entre os cátions adsorvidos e as superfícies das partículas (GOMES, 1988). Se a argila se ionizar fortemente, o equilíbrio é deslocado no sentido da dissociação do cátion da argila e, como consequência, a carga resultante negativa das partículas de argila em suspensão será predominante, favorecendo a repulsão entre elas, e evitando a aproximação e aglomeração das partículas (floculação). Esse fato faz com que a suspensão adquira maior estabilidade.

Atuando sobre as partículas não existem apenas forças de natureza repulsiva, mas também as de natureza atrativa, como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas. A intensidade destas forças atrativas é maior quando as partículas de argila estão muito próximas entre si, e isso é observado quando se trabalha com suspensões mais concentradas (CIONE et al., 2000).

Existem várias formas pelas quais as partículas de argila podem se associar entre si, quando em suspensão aquosa, como mostra a Figura 8.

Figura 8: Formas de associação entre partículas de argila em solução aquosa.
Fonte: Adaptação de CAVALHEIRO, 1995.

Quando as partículas de argila interagem face-a-face, elas produzem pilhas, nas quais as dimensões maiores são semelhantes as das partículas não associadas,

sendo que a diferença está na espessura da pilha que resulta da associação das partículas (CAVALHEIRO, 1995).

Em um segundo tipo de interação, as partículas podem interagir aresta-aresta, levando as diferentes formas para as partículas associadas, tanto estruturas lamelares, como estruturas chamadas de “*card-house*”, que resultam em volumosos flocos (CAVALHEIRO, 1995).

Finalmente a associação face-a-aresta, difere das duas anteriores porque a interação predominante é eletrostática, nas quais as camadas difusas têm cargas opostas. Através das associações face-a-aresta, em altas concentrações de argilas, formam-se géis (CAVALHEIRO, 1995).

1.4. Nanocompósitos de Nanopartículas de Prata/Argila

Recentemente, alguns trabalhos descrevem a preparação de nanopartículas de prata usando argilas dispersas em um solvente (HUANG; YANG, 2008; MIYOSHI et al., 2010; SU et al., 2011).

Os íons Ag^+ podem ser trocados com cátions interlamelares do silicato. Durante a redução dos íons Ag^+ , as camadas de argila atuam como nanorreatores, ou seja, o espaço interlamelar das camadas de sílica na argila pode limitar o crescimento das partículas de prata. O resultando é a formação de nanopartículas dentro das lamelas da argila (KIM; IHN; NA, 2011).

Miyoshi et al. descreveram que o método de preparação de NPsAg na argila montmorilonita via redução química em hexanol foi muito efetivo para obtenção das NPsAg fotoativas, as quais permaneceram estáveis promovendo sítios para reações fotorredox (MIYOSHI et al., 2010).

Ahmad et al. prepararam NPsAg pelo método de redução química na presença da argila montmorilonita. As propriedades dos nanocompósitos de Ag/montmorilonita foram estudadas em função da concentração de AgNO_3 . Os resultados mostraram que a intensidade da banda de absorção plasmônica e o tamanho das NPsAg aumentam com o aumento da concentração de AgNO_3 . Em seus estudos as nanopartículas permaneceram estáveis em solução por um longo período de tempo (AHMAD et al., 2009).

Yang et al. sintetizaram AgNPs via redução química utilizando NaBH_4 como agente redutor na argila Laponita. Os autores observaram por UV-Vis a formação de uma nova banda na região de 545 nm associada a formação de agregados de NPsAg com o aumento da concentração de AgNO_3 (YANG; NAM; KIM, 2014).

Na literatura, muitos trabalhos reportam a obtenção de nanocompósitos de nanopartículas de prata/argila (NPsAg/Argila) por redução química (LIU et al., 2007; AHMAD et al., 2009; MIYOSHI et al., 2010; PRAUS et al., 2010; BURRIDGE; JOHNSTON; BORRMANN, 2011; SU et al., 2011; (YANG; NAM; KIM, 2014), porém poucos trabalhos descrevem a síntese via fotólise direta utilizando a luz UV como redutor (PATAKFALVI; DÉKÁNY, 2004; COURROL; DE OLIVEIRA SILVA; GOMES, 2007; HUANG; YANG, 2008; DARROUDI et al., 2009; BURRIDGE; JOHNSTON; BORRMANN, 2011; GIRASE et al., 2011).

Darroudi et al. sintetizaram NPsAg usando irradiação UV a partir da redução do sal AgNO_3 no espaço interlamelar da argila montmorilonita (MMT) sem a presença de agente redutor ou tratamento térmico. Estudos da distribuição de tamanho para as NPsAg foram realizados para diferentes períodos de irradiação e os resultados mostraram que aumentando o período de irradiação UV ocorre uma distribuição de tamanho de partículas menores (DARROUDI et al., 2009).

Em outro trabalho Shameli et al sintetizaram NPsAg entre o espaço interlamelar da argila montmorilonita (MMT) usando diferentes quantidades de irradiação- γ (1, 5, 10 20 e 40 kGy) na ausência de agente redutor ou tratamento térmico. Os autores observaram que quanto maior as doses de irradiação- γ maior foi a concentração de NPsAg formada. As NPsAg obtidas foram cúbicas de face centrada com diâmetro médio de 21,57-30,63 nm. Além disso, as suspensões de NPsAg/MMT sintetizadas foram estáveis durante um longo período de tempo (mais de 3 meses), sem qualquer sinal de precipitação (SHAMELI et al., 2010).

Neste contexto, no presente trabalho foi enfatizado a síntese via fotoquímica de nanopartículas de prata suportadas em argila (NPsAg/Argila), utilizando como fonte de radicais livres para a redução de íons Ag^+ dois tipos de fotoiniciadores. A principal vantagem de sintetizar nanopartículas de prata suportadas em argilas é que nesse caso as lamelas de argila promovem uma superfície e também agem como agente nucleante para a precipitação da prata, podendo gerar partículas pequenas e dispersas homogeneamente na superfície da argila.

OBJETIVOS

O principal objeto do trabalho foi obter via fotoquímica e caracterizar nanopartículas de prata (NPsAg) utilizando dois diferentes fotoiniciadores e diferentes argilas como estabilizantes.

Os objetivos específicos são:

- sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata utilizando como agente redutor Irgacure 2959 ou Lucirin TPO.
- sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata estabilizadas por citrato de sódio (NPsAg/Citrato) e argila (NPsAg/Argila) como estabilizantes.
- verificar a influência das argilas na morfologia e distribuição de tamanho das NPsAg.
- analisar a atividade antimicrobiana dos nanocompósitos NPsAg/argila contra as bactérias *Escherichia coli* (Gram negativa) e *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (Gram positiva) na presença das NPsAg.
- estudar a influência das nanopartículas de prata no processo de fotopolimerização de uma resina.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

Tabela 1: Lista dos principais reagentes utilizados.

Reagente	Estrutura	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Procedência	Pureza
Irgacure 2959* (Irg 2959)		224,25	Sigma Aldrich	98%
Lucirin TPO**		348,37	Sigma Aldrich	97%
Irgacure 369*** (Irg 369)		366,50	Sigma Aldrich	97%
2-Hidroxietil metacrilato (HEMA)		130,14	Sigma Aldrich	97%
Dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA)		198,22 g	Sigma Aldrich	98%
Citrato de sódio dihidratado		294,10	J.T.Baker	
Nitrato de prata		169,88	Tec Lab	

***Irgacure 2959:** 1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona

****Lucirin TPO:** óxido difenil -2,4,6-trimetilbenzoil fosfínico

*****Irgacure 369:** 2-Benzil-2-(dimetilamino)-4'-morfolinobutiropenona

As argilas empregadas neste trabalho são duas argilas montmorilonitas (SWy-1 e SYn-1) e uma argila hectorita (Laponita B). As argilas montmorilonitas foram obtidas do "Source Clay Repository" da "Clay Minerals Society", Universidade de Missouri, Columbia. A argila SWy-1 é uma montmorilonita natural de origem do Wyoming, U.S, com fórmula empírica: $(\text{Ca}_{0,12} \text{Na}_{0,32} \text{K}_{0,05})[\text{Al}_{3,01} \text{Fe(III)}_{0,41} \text{Mn}_{0,01} \text{Mg}_{0,54} \text{Ti}_{0,02}][\text{Si}_{7,98} \text{Al}_{0,02}]\text{O}_{20}(\text{OH})_4$.

A SYn-1 (Barasym SSM - 100) é uma montmorilonita sintética com fórmula: $(\text{Mg}_{0,06} \text{Ca}_{0,04} \text{Na}_{0,12} \text{Ktr})[\text{Al}_{3,99} \text{Fe(III)}_{\text{tr}} \text{Mn}_{\text{tr}} \text{Mg}_{0,54} \text{Ti}_{\text{tr}}][\text{Si}_{6,50} \text{Al}_{1,50}]\text{O}_{20}(\text{OH})_4$, com uma carga não balanceada de 1,17 e a presença de alumínio extra em localização estrutural não conhecida.

A Laponita B foi obtida da Southern Clay Products subsidiária da "Rockwood Specialties" (Laporte Ind.), é uma hectorita sintética com carga negativa de 0,7 por célula unitária, que pode ser neutralizada com Na^+ adsorvidos nas superfícies dos cristais. A fórmula empírica da Laponita B é dada como: $\text{Na}_{0,7}^+[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3})\text{O}_{20}(\text{OH})_{2,5}\text{F}_{1,5}]^{0,7-}$.

Algumas propriedades dos argilominerais utilizados são apresentadas na Tabela 2:

Tabela 2: Propriedades e composição dos argilominerais utilizados			
PROPRIEDADES	SWy-1	SYn-1	Laponita
CTC (meq/100g)	76,4	70-140	73,3
Área (m ² /g)	31,82	133,66	360
Tipo	natural	sintética	sintética
	montmorilonita	montmorilonita	hectorita
Origem	Wyoming, U.S	NL-Ind-	Laporte Ind
Composição (%)			
SiO ₂	62,9	49,7	66,03
Al ₂ O ₃	19,6	38,2	0,30
TiO ₂	0,090	0,023	0,02
Fe ₂ O ₃	3,35	0,02	0,06
FeO	0,32	-	-
MnO	0,006	-	0,01
MgO	3,05	0,014	29,03
CaO	1,68	-	0,34
Na ₂ O	1,53	0,26	3,19
K ₂ O	0,53	<0,01	0,04
Li ₂ O	-	0,25	0,98
P ₂ O ₅	0,049	0,001	0,02
S	0,05	0,10	-
F	0,111	0,76	-

Outros reagentes utilizados: Metanol (HPLC, Tedia). A água utilizada para a preparação das soluções foi destilada, deionizada e passada em sistema de purificação Easypure® RoDi.

3.2. Métodos

3.2.1. Purificação da argila

Em 1,5 L de água destilada dispersou-se 30,0 g da argila que permaneceu sob agitação constante durante 2 horas. Com agitação constante adicionou-se ácido clorídrico (HCl) $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ até pH 3,5 para remoção de carbonatos. Após 20 minutos a solução foi centrifugada com velocidade de 10.000 rpm, temperatura de 25 °C por 30 minutos. O procedimento foi repetido por mais duas vezes para eliminar sais solúveis.

O sedimento centrifugado foi ressuspendido em 1,5 L de água destilada e sob agitação constante foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) até se obter pH 8,0. A suspensão foi deixada em repouso por 12 horas. O sobrenadante foi sifonado e guardado em béquer. O sedimento depositado foi ressuspendido novamente em pH 8,0. Esse procedimento foi repetido até que o sobrenadante se tornou claro, sem material em suspensão.

Quando o sobrenadante se tornou claro, o material depositado no fundo do béquer foi descartado. Sob agitação constante foi adicionado HCl ao sobrenadante sifonado até atingir pH 3,5. Em seguida foi adicionado solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) para deixar a argila na forma homoiônica (argila - Na^+). A solução permaneceu em repouso por aproximadamente 12 horas até floculação total da argila. Após floculação rejeitou-se o sobrenadante, e a argila floculada foi submetida a centrifugação por 30 minutos com velocidade de 10.000 rpm a temperatura de 25 °C.

Após esse procedimento foi feita diálise da argila em membranas de celulose regenerada em formas de tubo, sendo estas amarradas em suas extremidades com barbantes e mergulhadas em água destilada e deionizada até teste negativo para íons cloreto usando AgNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

A argila purificada foi liofilizada. O produto final obteve coloração clara e consistência parecida com algodão (GESSNER; SCHMITT; NEUMANN, 1994; CAVALHEIRO, 1995).

3.2.2. Síntese das NPsAg com Irgacure 2959

As NPsAg foram sintetizadas via fotoquímica utilizando como modelo o procedimento descrito por Stampelcoskie e Scaiano (STAMPLECOSKIE; SCAIANO, 2010). NPsAg com Irgacure 2959 (Irg 2959) foram preparadas a partir de uma solução aquosa contendo o fotoiniciador Irg 2959 ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), nitrato de prata (AgNO_3) ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) e citrato de sódio (1 mmol L^{-1}) como agente estabilizante (NPsIrg/Citrato).

Para a síntese das NPsAg estabilizadas com a argila (NPsIrg/Argila), suspensões de SWy-1, SYn-1 e Laponita B foram preparadas em água Millipore (1 g L^{-1}) e permaneceram sob agitação constante por 24 horas. Em seguida foi preparada uma mistura de Irg 2959 ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), AgNO_3 ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) e argila ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) para a síntese das NPsAg.

Todas as soluções foram purgadas com gás nitrogênio (N_2) durante 30 minutos para remoção de oxigênio dissolvido, o qual compete com os radicais formados. Em seguida foram irradiadas por 5 minutos em câmara de irradiação contínua (TECNAL TE-383) com 8 lâmpadas germicidas UV à 25°C . A emissão e a potência das lâmpadas, na posição da amostra, foi de 254 nm e 584 mW.m^{-2} , e foi medida com um Espectrorradiômetro SPR-01 (Luzchem). O espectro de emissão das lâmpadas e o espectro de absorção do Irgacure 2959 estão apresentados na Figura 9.

Figura 9: Espectros de emissão da lâmpada e absorção da amostra de Irgacure 2959 de concentração $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

3.2.3. Síntese das NPsAg preparadas com Lucirin TPO

As NPsAg foram preparadas via fotoquímica em solução de água/metanol (90:10) contendo Lucirin TPO ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), AgNO_3 ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) e citrato de sódio como estabilizante (1 mmol L^{-1}) (NPsLuc/Citrato).

Assim como descrito acima, também foram preparadas amostras de nanopartículas com Lucirin TPO estabilizadas com argila (NPsLuc/Argila).

A emissão e a potência das lâmpadas, na posição da amostra, foi de 254 nm e 584 mW.m^{-2} , e foi medida com um Espectrorradiômetro SPR-01 (Luzchem). O espectro de emissão das lâmpadas e o espectro de absorção do Lucirin TPO estão apresentados na Figura 10.

Figura 10: Espectro de emissão das lâmpadas germicidas e espectro de absorção do Lucirin TPO em metanol ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$).

Todas as soluções foram purgadas com gás nitrogênio (N_2) durante 30 minutos para remoção de oxigênio dissolvido, o qual compete com os radicais formados. As soluções purgadas foram então irradiadas por 60 minutos em câmara de irradiação contínua (TECNAL TE-383) com 8 lâmpadas germicidas de 6 W cada, totalizando 48 W, temperatura constante de 25°C e potência de 548 mW m^{-2} .

3.3. Técnicas de caracterização utilizadas

3.3.1. Espectroscopia na região do UV-Vis

As medidas de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis das amostras de nanopartículas foram realizadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico em um espectrômetro UV-Vis, Shimadzu-UV-2550 de duplo feixe. Os espectros foram realizados de 200-800 nm com intervalo de 1 nm. A espectroscopia na região do UV-Vis foi utilizada com o objetivo de acompanhar a formação das NPsAg em soluções estabilizadas com citrato de sódio e argilas através da formação

de bandas de ressonância plasmônica na região de 400 nm. A técnica de espectroscopia também foi utilizada para estudar a estabilidade das soluções de NPsAg por meio do acompanhamento do decaimento da absorção da banda plasmônica por um período de 30 dias.

3.3.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering - DLS) é uma técnica não invasiva utilizada para medir o tamanho de partículas, macromoléculas e proteínas em escala sub-microns dispersas em um líquido. A análise de espalhamento de luz dinâmico está relacionada ao movimento aleatório (movimento Browniano) das partículas em suspensão. Quando uma fonte de luz laser entra em contato com a solução, as partículas espalham a luz com intensidades diferentes. A intensidade de flutuações em relação ao tempo é diretamente proporcional ao tamanho da partícula. Para partículas pequenas (< 60 nm, i.e. $< \lambda_{\text{laser}}/10$), que se movimentam rapidamente, a luz é espalhada randômicamente em todas as direções. No caso de partículas grandes o espalhamento não ocorre de maneira aleatória.

No caso em que somente partículas esféricas com o mesmo tamanho estão presentes na solução, o coeficiente de difusão da partícula pode ser calculado a partir das flutuações da intensidade de luz causada pela movimentação das partículas. Com o coeficiente de difusão, o raio hidrodinâmico (R_h) pode ser calculado a partir da relação Stokes-Einstein (Equação 1):

$$R_h = \frac{K_B T}{6\pi\eta D} \quad \text{Equação 1}$$

onde, K_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do meio e D a constante de difusão.

A técnica de DLS no presente trabalho foi utilizada para medir o tamanho das nanopartículas obtidas após a irradiação UV. As análises de tamanho das NPsAg foram realizadas utilizando um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern UK) operando com laser de He-Ne com comprimento de onda em 633 nm. Todas as

medidas foram feitas com ângulo fixo em 173° e temperatura de 25°C logo após a síntese das NPsAg.

3.3.3. Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X (DRX) é muito utilizada na determinação da estrutura cristalina ou fração cristalina de diversos materiais, como metais, materiais poliméricos e outros sólidos (CALLISTER JR, 2002; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). No caso de nanopartículas metálicas a técnica de DRX é uma medida direta utilizada para caracterizar o tamanho e obter informações a respeito do arranjo atômico das nanopartículas. A DRX é, em geral, não destrutiva e permite obter informações a respeito do conjunto de muitas partículas obtidas, em contraste a técnicas de imagem direta como microscopia eletrônica, em que uma pequena parte da amostra de nanopartículas é estudada e podem não representar todo o material. (INGHAM, 2015)

No presente trabalho a técnica foi utilizada com o objetivo de identificar o tipo de nanocompósito de NPsAg/Argila obtido após a fotorredução da prata e confirmar a existência das NPsAg, determinar sua estrutura cristalina e o tamanho médio dos cristalitos de prata. Para isso foi utilizado um difratômetro de raios X da marca Bruker modelo D8 Advance equipado com uma fonte de radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,154 \text{ nm}$). As medidas foram efetuadas no intervalo de 3 a 120° com um passo de $0,03^\circ$ e tempo de irradiação de 0,4 s.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) foi desenvolvido em 1931 pelos cientistas Max Knoll e Ernest Ruska. Enquanto que um microscópio fotônico convencional a fonte de irradiação é uma lâmpada, no MET um feixe de elétrons acelerado por alta tensão atravessa e interage com uma amostra transparente. De maneira geral, um MET é constituído por: (1) fonte de radiação (canhão de elétrons ou fonte de elétrons de alta energia); (2) sistema de lentes; (3) dispositivos para visualização e registro das imagens; (4) sistema de vácuo e (5) fontes de tensão (MANNHEIMER, 2002; CANEVAROLO JR, 2003).

A caracterização morfológica, bem como a distribuição de tamanho das amostras de NPsAg/Citrato e NPsAg/Argila foram analisadas por MET. Após a irradiação uma gota das diferentes suspensões de NPsAg foi depositada em grade de cobre revestida de carbono (CF-200 Cu, Electron Microscopy Sciences, USA) com posterior evaporação do solvente a temperatura ambiente.

As imagens foram feitas em um equipamento FEI TECNAI G² F20 HRTEM equipado com um espectrômetro de energia dispersa de raios X (EDS) operando a 200 kV. As imagens foram obtidas no modo STEM (do inglês, *Scanning Transmission Electron Microscopy*). As distribuições do tamanho de partículas foram estimadas baseadas nas imagens de MET usando o software ImageJ.

3.4. Ensaios Microbiológicos

A atividade antimicrobiana das amostras de NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila foram testadas contra as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (ATCC 33591). Para obter o índice de sobrevivência das bactérias testadas foi utilizado o método colorimétrico com MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio). Este método se baseia na redução do MTT, um composto amarelo, em sal de formazan (coloração roxa) que absorve em 560 nm (STEVENSON; OLSEN, 1993).

Para isso as culturas microbianas foram padronizadas em $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mL (CFU/mL) em um espectrofotômetro (Hitachi U-2800).

As culturas foram incubadas em tubos de 2,0 mL com agitação orbital à 37 °C por 24 h com 50 µL de AgNPs e 50 µL de caldo Muller Hinton. O controle foi feito com tampão fosfato salina (PBS). Após incubação as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1300 rpm e 50 µL de MTT (2 mg mL^{-1}) foi adicionado para precipitação. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos para permitir a redução do MTT para sal de formazan de coloração roxa para determinar o número de células vivas. Em seguida os tubos foram centrifugados por 5 minutos à 6000 rpm. Para solubilizar o sal de formazan adicionou-se 50 µL de etanol e 150 µL da mistura de isopropanol e PBS (1:1). O índice de sobrevivência foi determinado por colorimetria através da medida de absorbância em 560 nm por leitor de placas (Benchmark, BIO-RAD).

3.5. Fotocalorimetria (PCA)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC, do inglês, *Differential Scanning Calorimetry*) é um método térmico que analisa a velocidade de calor desprendido, bem como o calor total gerado em uma reação química. A aplicação da técnica de fotocalorimetria tem sido utilizada há anos em estudos de cura de compósitos dentários, reações químicas de fotopolimerização e fotodegradação, entre outros.

A Fotocalorimetria (PCA) é considerada como uma extensão da calorimetria exploratória diferencial clássica que envolve o uso de uma fonte luz visível ou ultravioleta para estudar o comportamento de sistemas fotorreativos. A PCA tem como objetivo determinar a entalpia ou alterações de energia interna que são iniciadas pela luz em temperatura constante. A técnica de PCA encontra aplicações específicas em revestimentos, filmes, tintas, adesivos, material dentário. A técnica pode ser utilizada para estudar a reatividade de vários iniciadores químicos sobre a velocidade de cura de sistemas poliméricos (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001)

Diferentes tipos de fotocalorímetros estão sendo construídos e utilizados, mas no geral são constituídos por (a) um calorímetro padrão, (b) um sistema de irradiação óptico e (c) uma conexão entre ambas essas duas partes, que as vezes pode estar incorporada a parte do calorímetro padrão. A Figura 11 apresenta um corte transversal do sistema óptico do sistema de fotocalorimetria utilizado no presente estudo.

Figura 11: Ilustração esquemática da seção transversal do sistema de PCA. Fonte: Adaptação de METTLER-TOLEDO, 2010.

Para a análise de PCA foram preparadas soluções de monômeros (HEMA/EDGMA) na proporção de 50:50 com 1% (m/m) de fotoiniciador Irgacure 369 (Irg 369). Às diversas misturas de HEMA/EGDMA e 1% de Irg 369 foram adicionados 5 e 10% (v/v) das diferentes amostras de NPsAg preparadas como citado anteriormente. Os experimentos fotocalorimétricos foram realizados em um módulo DSC Q 2000 (TA Instruments) com acessório para a realização das medidas fotocalorimétricas, fonte de irradiação OnmiCure Series 2000 e filtro de corte < 395 nm. As amostras foram irradiadas à temperatura constante de 25 °C em suporte de amostra de alumínio e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹. A massa das amostras utilizadas foi de 21 ± 1,2 mg. A Figura 12 apresenta os espectros de potência da lâmpada de vapor de mercúrio OmniCure com o filtro de corte e do espectro de absorção UV-Vis do fotoiniciador Irg 369. O espectro de emissão da lâmpada foi medido com Espectrorradiômetro SPR-01 da Luzchem.

Figura 12: Espectro de emissão da lâmpada e espectro de absorção da solução de Irgacure 369.

A partir dos dados coletados foi possível obter a porcentagem de conversão (%C) dos monômeros em polímero através da relação do calor da reação (ΔH_t) e do calor teórico da reação ($\Delta H_{teórico}$) (ABADIE; APPELT, 1989; DICKENS et al., 2003):

$$\%C = 100 \times \frac{\Delta H_t}{\Delta H_{teórico}} \quad \text{Equação 2}$$

Como as resinas compostas podem conter cargas e outros aditivos não reativos em sua composição, corrige-se o calor da reação por:

$$\Delta H_{resina} = \frac{\Delta H_{comp}}{X} \quad \text{Equação 3}$$

Sendo ΔH_{resina} o calor da reação corrigido, ΔH_{comp} o calor obtido na reação e X a fração de monômeros na resina composta.

A velocidade de polimerização (R_p) foi calculada a partir da Equação 4, em que k é a constante de primeira ordem da reação e $[M]$ é a concentração de monômeros.

$$R_p = k \times [M] \quad \text{Equação 4}$$

A constante k pode ser calculada a partir da Equação 5, sendo dH/dt o fluxo de calor da reação e F a fração dos monômeros não convertidos no máximo da curva DSC:

$$k = \frac{dH/dt}{\Delta H_{teórico} \times F} \quad \text{Equação 5}$$

A partir da Equação 6 pode-se calcular a velocidade de polimerização no pico máximo da curva kF vs. tempo. A equação passa a ser:

$$R_p = k \times F \times [M] \quad \text{Equação 6}$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Síntese das Nanopartículas de Prata (NPsAg)

As nanopartículas de prata (NPsAg) foram obtidas via fotoquímica utilizando duas moléculas diferentes como agentes redutores da prata (Irgacure 2959 e Lucirin TPO), como estabilizante foi utilizado o citrato de sódio (NPsAg/Citrato) ou argila (NPsAg/Argila). As argilas usadas nas sínteses foram: SWy-1, SYn-1 e Laponita B.

4.1.1. NPsAg/Citrato preparadas com Irg 2959 (NPslrg/Citrato) e Lucirin TPO (NPsLuc/Citrato)

A síntese e caracterização de NPsAg/Citrato foi realizada como referência para caracterização das NPsAg estabilizadas com argila.

Os espectros de UV-Vis em função do tempo de irradiação da solução de Irg 2959, AgNO_3 e citrato de sódio estão apresentados na Figura 13 A. Com o passar do tempo de irradiação observou-se uma diminuição na intensidade da banda de absorção em 280 nm referente a fotodegradação do Irg 2959.

Após 5 segundos de irradiação, é possível observar a formação de uma banda de absorção plasmônica em aproximadamente 410 nm referente à formação das NPsAg. No decorrer da irradiação ocorre um deslocamento hipsocrômico da banda e, após 5 minutos de irradiação a banda apresenta um máximo de absorção em 391 nm.

A Figura 13 B apresenta o gráfico de absorção da banda centrada em 391 nm em função do tempo de irradiação. Pode-se observar que a formação das NPsAg ocorre logo nos primeiros 30 segundos de reação, e não sofre alterações significativas após 1 minuto de irradiação.

Figura 13: (A) Espectros de UV-Vis das soluções contendo NPsAg em diferentes intervalos de tempo de irradiação UV ($\lambda = 254$ nm) do Irg 2959. (B) Aumento da banda plasmônica no comprimento de onda fixo em 391 nm em função do tempo de irradiação UV.

Após a irradiação observou-se alteração na coloração da solução, de incolor para amarela (Figura 14), sugerindo a formação de NPsAg que apresentam uma banda de absorção na região entre 350-500 nm (DEEPA; CHAITHANNEYA; RAMA, 2015). Além disso, pôde-se observar que as NPsIrg/Citrato apresentaram uma largura de banda relativamente estreita indicando a formação de NPsAg monodispersas após a irradiação.

Figura 14: Acompanhamento visual da mudança da intensidade de cor da solução contendo Irg 2959, AgNO_3 e citrato de sódio em função do tempo de irradiação UV.

O Irg 2959 apresenta excelente absorção na região do UVA. Quando excitado nessa região é capaz de sofrer clivagem Norrish Tipo I gerando radicais cetila que são bons agentes redutores de íons de Ag^+ para Ag^0 e, assim produzir NPsAg, como mostra o Esquema 3. A clivagem Norrish Tipo I pode ocorrer para cetonas alifáticas ou aromáticas, a partir de qualquer estado excitado singlete ou tripleto, no entanto, o tripleto é o mais comum de ocorrer em uma reação. Isso porque o estado excitado singlete tem, geralmente, tempo de vida de ns, que é um período muito curto para a reação ocorrer, mas estados excitados tripleto possuem tempo de vida de μs , o que fornece tempo suficiente para reações intramoleculares Norrish Tipo I ou II (STAMPLECOSKIE, 2013).

Esquema 3: Mecanismo de formação via fotoquímica de NPsAg com Irgacure 2959 como fotorredutor. Fonte: Stamplecoskie, K.G.; Scaiano, J. C. 2012.

A rápida síntese das NPsAg pode ser atribuída ao tempo de vida muito curto do estado tripleto dos radicais cetila, que por sua vez reflete uma boa eficiência no processo de fotoclivagem Norrish Tipo I do Irg 2959 (MARIN; MCGILVRAY; SCAIANO, 2008).

A Figura 15 A apresenta o espectro de absorção UV-Vis da solução de Lucirin TPO ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), AgNO_3 ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$), e citrato de sódio (1 mmol L^{-1}) em função do tempo de irradiação.

Figura 15: (A) Espectros de UV-Vis das soluções contendo NPsAg em diferentes intervalos de tempo de irradiação UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) do Lucirin TPO, (B) Aumento da banda plasmônica no comprimento de onda fixo em 400 nm em função do tempo de irradiação.

Irradiando-se a solução por aproximadamente 1 minuto, é possível observar a formação de uma banda de absorção plasmônica centrada em 415 nm referente a formação das NPsAg. Durante a irradiação ocorre o deslocamento desta banda para o azul, após 60 minutos de irradiação o máximo encontra-se em 400 nm. A Figura 15 B apresenta o gráfico de absorção em função do tempo de irradiação no comprimento de onda de 400 nm. A formação da banda das NPsLuc/Citrato ocorre no primeiro minuto de irradiação, e não sofre alterações significativas após 30 minutos de irradiação. Assim como observado para as NPsIrg/Citrato, as NPsLuc/Citrato também apresentam alteração na coloração da solução, de incolor para amarela após a irradiação (Figura 16).

Figura 16: Acompanhamento visual da mudança da intensidade de cor da solução contendo a solução de Lucirin TPO, AgNO_3 e citrato de sódio em função do tempo de irradiação UV.

O Lucirin TPO, assim como o Irg 2959, é um fotoiniciador do Tipo I, e apresenta absorção máxima na região de 380 nm sendo que na região do visível a absorção diminui chegando a valores nulos para comprimentos de onda acima de 450 nm. Após absorção de energia luminosa é capaz de sofrer α -clivagem Norrish Tipo I, produzindo radicais livres como: o óxido de difenilfosfinila e 2,4,6-trimetilbenzoíla (MEDSKER et al., 1998; SLUGGETT et al., 1995). Ambos os radicais podem promover o processo redox, gerando NPsAg e radicais catiônicos como mostra o Esquema 4.

Esquema 4: Síntese de NPsAg via fotoquímica utilizando o Lucirin TPO como fotorredutor. Fonte: Adaptação de ZAAROUR et al., 2014.

Yagci *et al.* descreveram a redução de Cu(II) e Cu(I) pelo método fotoquímico usando Lucirin TPO. Os autores mostraram que os radicais fosfinila são responsáveis pelo processo de redução do cobre, enquanto que os radicais benzoíla, produzidos na fotoclivagem do Lucirin TPO, não sofrem reações redox significativas. Segundo os autores os radicais fosfinila exibem maior eficiência devido à alta densidade eletrônica localizada no átomo de fósforo e as condições estéricas favoráveis decorrente de sua estrutura piramidal. No entanto, sua participação em reações de transferência de elétrons é fortemente dependente da substituição com grupos doadores e o potencial de redução do sal oxidante utilizado (YAGCI; TASDELEN; JOCKUSCH, 2014). Por outro lado, Zaarour *et al.* e Jradi *et al.* propuseram que a redução da prata também pode ocorrer a partir dos radicais benzoíla (JRADI *et al.*, 2010; ZAAROUR *et al.*, 2014).

A banda de absorção bem como a mudança de coloração das soluções observadas para ambas as NPsAg após a irradiação, independente do fotoiniciador utilizado, ocorre devido ao fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície, do inglês *Surface Plasmon Band* (SPB), e também à absorção dipolar de nanopartículas de prata com morfologia esférica (DONG; CHOU; LIN, 2009; SHAMELI *et al.*, 2011). A absorção plasmônica está relacionada à movimentação de um grande número de elétrons localizados na banda de condução do metal (MARETTI *et al.*, 2009).

O perfil da banda de absorção plasmônica depende de diferentes fatores, dentre os quais pode-se citar: tamanho e morfologia das nanopartículas, composição química do material, meio dielétrico e índice de refração da matriz utilizada. No entanto, a largura do pico e sua intensidade estão relacionadas com a distribuição do tamanho das partículas e com a concentração do precursor da prata utilizado. No caso de NPsAg menores que 100 nm e com morfologia esférica, o pico de absorção geralmente está localizado na região entre 400 e 450 nm do espectro de UV-Vis (DEHNAVI *et al.*, 2013).

A técnica de DLS foi utilizada com o objetivo de medir o diâmetro médio das NPsAg obtidas logo após a síntese. As NPsIrg/Citrato apresentaram uma única população na distribuição de tamanho de partícula com diâmetro modal centrado em 6,4 nm, como apresentado na Figura 17 A. A distribuição de tamanho das partículas de NPsLuc/Citrato em porcentagem de volume após 60 minutos de irradiação UV

está apresentada na Figura 17 B. As NPsLuc/Citrato apresentaram distribuição de partícula bimodal com diâmetros centrados em 12 nm e 72 nm. Sendo que, 93% da população consiste em partículas de tamanho de 12 nm.

Figura 17: Distribuição do tamanho de partícula para (A) NPsIrg/Citrato e (B) NPsLuc/Citrato em porcentagem de volume obtidas por DLS.

A Figura 18 A e C apresenta as imagens de MET para as NPsAg preparadas com o Irg 2959 e Lucirin TPO como agentes redutores, respectivamente. É possível observar que para ambas as amostras as NPsAg se encontram uniformes com morfologia esférica e diâmetros de 3,7 nm para as NPsIrg/Citrato (Figura 18 B) e 3,1 nm para as NPsLuc/Citrato (Figura 18 D).

Figura 18: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada pelas imagens de MET para as amostras de (A e B) NPsrlrg/Citrato e (C e D) NPLuc/Citrato sintetizadas via fotoquímica.

Os diâmetros das NPsAg obtidos por DLS são diferentes daqueles estimados usando a técnica de MET. As diferenças dos valores são principalmente devido ao processo envolvido na preparação das amostras. A técnica de MET faz uso das amostras em seu estado seco para determinar o tamanho das partículas, enquanto que o método de DLS as medidas do tamanho das partículas são feitas em seu estado hidratado. Dessa forma pode-se dizer que o tamanho das nanopartículas

obtidos pela MET é o tamanho verdadeiro das NPsAg, já que o diâmetro obtido pelo espalhamento de luz dinâmico é um diâmetro hidrodinâmico, que aparece sempre superestimado devido às fortes interações entre o solvente e outros constituintes das nanopartículas (COSERI et al., 2015).

Estes resultados indicam que NPsAg podem ser estabilizadas pelas moléculas de citrato de sódio em solução durante a irradiação UV. Quando o citrato de sódio é adicionado, os ânions e cátions de citrato de sódio ficam dispersos homogeneamente por toda a solução. Assim, o efeito de estabilização pode ser explicado em termos da adsorção de ânions de citrato de sódio na superfície das NPsAg durante o processo de formação (Figura 19). Dessa maneira, as NPsAg ficam carregadas negativamente e estabilizadas. Os contra íons de sódio dispersos na solução neutralizam a carga negativa das NPsAg e reduzem a energia livre do sistema (TSUJI; TSUJI; HASHIMOTO, 2011; PARK; SHUMAKER-PARRY, 2014).

Figura 19: Ilustração esquemática da estabilização de NPsAg com citrato de sódio. Fonte: Adaptação de REMANT BAHADUR; THAPA; BHATTARAI, 2014.

A presença dos íons de citrato de sódio adsorvidos na superfície das NPsAg geram uma repulsão eletrostática entre as nanopartículas prevenindo sua agregação (PARK; SHUMAKER-PARRY, 2014). Dependendo de sua concentração, o citrato de sódio apresenta uma forte influência no tamanho e na estrutura das partículas formadas (HENGLEIN; GIERSIG, 1999).

4.1.2. NPsAg preparadas com Irg 2959 (NPslrg/Argila) e Lucirin TPO (NPsluc/Argila) estabilizadas com diferentes argilas

As Figuras 20 A, B e C apresentam os espectros de UV-Vis em intervalos de tempo de irradiação para as NPsAg preparadas com Irg 2959 como fotoiniciador e estabilizadas com diferentes argilas (A) SWy-1 (NPslrg/SWy-1), (B) SYn-1 (NPslrg/SYn-1) e (C) Laponita B (NPslrg/Lap B). A banda de absorção plasmônica ocorre em aproximadamente 405 nm para todas as amostras preparadas na presença das argilas.

As NPslrg/SWy-1 (Figura 20 A) e NPslrg/SYn-1 (Figura 20 B) apresentaram uma banda de absorção plasmônica mais larga quando comparada com as NPslrg/Lap B (Figura 20 C). A largura da banda indica uma possível heterogeneidade na distribuição de tamanho das NPslrg/SWy-1 e NPslrg/SYn-1 obtidas após a síntese (BERNI NETO, 2010).

Comparando os resultados de UV-Vis da NPslrg/Citrato com os das NPslrg/Argila, nota-se que a banda de absorção plasmônica, em aproximadamente 405 nm para as NPslrg estabilizadas com a argila, aparece em 391 nm quando estabilizadas pelo citrato de sódio. Isto indica que as NPslrg estabilizadas com as argilas podem apresentar um maior diâmetro de partícula em relação às estabilizadas com o citrato de sódio. Grijalva et al. reportam através de cálculos teóricos da absorbância de nanopartículas de prata que a posição da banda de absorção plasmônica sofre deslocamento batocrômico com o aumento do raio da partícula (SLISTAN-GRIJALVA et al., 2005)

Além disso, as amostras de NPslrg/Citrato e NPslrg/Lap B apresentaram bandas de absorção plasmônica mais estreitas quando comparada com as amostras estabilizadas com as argilas SWy-1 e SYn-1. Os resultados indicam que as NPslrg estabilizadas pelo citrato de sódio e a amostra NPslrg/Lap B apresentam maior homogeneidade na distribuição de tamanho das nanopartículas obtidas após irradiação (SLISTAN-GRIJALVA et al., 2005).

Figura 20: Espectros de UV-Vis das NPs_{Ag} em diferentes intervalos de tempo de irradiação UV para as amostras estabilizadas com as argilas (A) NPsirg/SWy-1, (B) NPsirg/SYn-1, (C) NPsirg/Lap B, (D) NPsLuc/SWy-1, (E) NPsLuc/SYn-1 e (F) NPsLuc/Lap B.

Os espectros de UV-Vis para as NPsAg preparadas com o Lucirin TPO como fotoiniciador e estabilizadas com diferentes argilas estão apresentados na Figura 20 D, E e F, o qual mostra que na presença da argila, a banda de absorção plasmônica aparece na região de 405-412 nm. As nanopartículas obtidas em SWy-1, e Lap B apresentaram banda de absorção plasmônica em 405 nm (Figura 20 D e F), enquanto que a amostra de NPsLuc/SYn-1 apresentou após a síntese banda plasmônica em 412 nm (Figura 20 D). Isso indica que as NPsAg estabilizadas pela argila SYn-1 podem apresentar maiores diâmetros que as estabilizadas pelas argilas SWy-1 e Laponita B. (SLISTAN-GRIJALVA et al., 2005). A banda de absorção plasmônica para as NPsAg sintetizadas na presença de citrato de sódio (NPsLuc/Citrato) e NPsLuc/Lap B são mais estreitas quando comparadas com a banda plasmônica das amostras NPsLuc/SWy-1 e NPsLuc/SYn-1.

4.1.3. Estudo do mecanismo de formação das NPsAg

Em geral, nanopartículas de prata coloidal são sintetizadas através da redução de íons Ag^+ por agentes redutores (ou solventes redutores) ou por meio da redução térmica de compostos organometálicos na presença de moléculas que agem como estabilizantes das nanopartículas. O modelo básico utilizado para descrever a formação coloidal de nanocristais em solução foi apresentado por LaMer e Dinegar em 1950, que baseia-se na teoria clássica de nucleação desenvolvida por Becker e Döring em 1930. O aspecto principal do modelo de LaMer é que, após um período de nucleação devido a supersaturação, partículas são formadas durante um processo de crescimento (por exemplo, pela adição de monômero) (POLTE et al., 2012; SUN, 2013). Nesse modelo, um número elevado de núcleos primários é gerado em um curto intervalo de tempo que crescem sem que ocorra a formação de novos núcleos posteriores (PARK et al., 2007). Com esse modelo é possível entender e explicar os processos de supersaturação, nucleação e crescimento durante a formação de nanopartículas (GORUP, 2010).

Para entender o mecanismo de nucleação e crescimento de nanopartículas de prata, Henglein e Giersig prepararam soluções de prata coloidal por irradiação a partir de perclorato de prata (AgClO_4) na presença de propanol, óxido nitroso (N_2O) e diferentes concentrações de citrato de sódio. Em baixa concentração de citrato de

sódio partículas grandes, aglomeradas e com imperfeições são formadas. Com uma concentração intermediária de citrato de sódio, as partículas formadas não estão aglomeradas e apresentam pequenas imperfeições e distribuição relativamente estreita. Em altas concentrações de citrato de sódio, os autores observaram a coalescência de partículas de prata devido à desestabilização pela elevada força iônica da solução (HENGLEIN; GIERSIG, 1999).

Polte et al realizaram estudo por SAXS in situ e em tempo real em conjunto com as técnicas de UV-Vis e MET para acompanhar a formação de nanopartículas de prata, usando AgClO_4 e NaBH_4 com e sem a presença de polivinilpirrolidona (PVP). Em seus estudos os autores mostram que o mecanismo de formação ocorre por meio da coalescência das nanopartículas de prata, em que partículas de tamanho menores se unem para formar partículas maiores reduzindo assim o número de partículas em solução (POLTE et al., 2012).

Para o estudo do mecanismo de formação das NPsAg acompanhou-se a evolução da formação das NPsIrg/Citrato e NPsIrg/SWy-1 pelas técnicas de DLS e MET em diferentes tempos de irradiação. Para os sistemas NPsLuc/Citrato NPsLuc/SWy-1 a formação das NPsAg foram acompanhadas somente por DLS já que apresentaram o mesmo comportamento.

Para o DLS foram realizadas medidas do diâmetro hidrodinâmico das amostras de NPsIrg/Citrato e NPsIrg/SWy-1 em diferentes tempos de irradiação UV (5 s, 20 s e 5 min) e os resultados estão apresentados na Figura 21 A e B. Nos primeiros 5 segundos de irradiação as NPsIrg/Citrato apresentaram uma única distribuição de tamanho com partículas de diâmetro modal centrado em aproximadamente 134 nm. Após 20 segundos de irradiação não é observado alterações significativas no tamanho das partículas. Os diâmetros médios obtidos com 20 segundos e 5 minutos foram de 6,3 nm e 6,4 nm, respectivamente.

Figura 21: Distribuição do tamanho de partícula em diferentes tempo de irradiação para (A) NPslrg/Citrato, (B) SWy-1 e NPslrg/SWy-1, (C) NPsluc/Citrato, (D) SWy-1 e NPsluc/SWy-1 em porcentagem de volume obtidas por DLS.

A argila SWy-1 pura apresentou distribuição de partícula bimodal, sendo a majoritária (93%) constituída de partículas maiores (622 nm). Apenas 8% correspondem a partículas com diâmetro de 127 nm (Figura 21 B e D). As NPslrg/SWy-1 com 5 segundos de irradiação também apresentaram distribuição bimodal, com uma população de 10% de diâmetro em 105 nm e outra com 90% de diâmetro em 720 nm. Decorridos 20 segundos de irradiação é observado uma população com diâmetro centrado em aproximadamente 84 nm (37%) e outra com 549 nm (63%). No final da irradiação (5 minutos) a amostra de NPslrg/SWy-1 apresentou distribuição bimodal sendo uma população de 45% com diâmetro em

80 nm e outra população com 55% de diâmetro centrado em 502 nm. Com os resultados de DLS para a amostra de NPsIrg/SWy-1 foi possível acompanhar a formação das NPsAg, visto que, a distribuição de menor diâmetro observada no início da irradiação UV diminuiu de diâmetro (de 105 nm para 80 nm) no decorrer do processo de irradiação, acompanhado por um aumento em sua porcentagem (de 10% para 56%). Visto que a argila SWy-1 não apresentou diâmetro de partícula menor que 127 nm, estes resultados indicam a formação de NPsAg com distribuição de partículas com tamanhos entre 33 e 164 nm de diâmetro.

As diferentes distribuições de tamanho para as amostras de NPsLuc/Citrato e NPsLuc/SWy-1 em diferentes tempos de irradiação (1, 5, 10, 35 e 60 min) também foram obtidas por meio da técnica de DLS e os resultados estão apresentados na Figura 21 C e D. A amostra de NPsLuc/Citrato assim como a amostra de NPsIrg/Citrato, apresentou no início da irradiação partículas com diâmetros maiores, ou seja, com 1 minuto de reação é possível observar uma única distribuição de tamanho de partícula com diâmetro centrado em 69 nm. Com 5 minutos de irradiação nota-se a presença de uma nova distribuição de tamanho com aproximadamente 13 nm (8%). Por outro lado, a população de partículas com diâmetros maiores (92 nm) diminuiu sua porcentagem em relação ao tempo de 1 minuto (de 100% para 91%). Com 10 minutos de irradiação observou-se a formação de uma maior quantidade de partículas com diâmetro de 13 nm (94%) seguido por uma diminuição para 6% das partículas com diâmetros maiores (91 nm). Uma leve alteração no diâmetro das partículas foi observada entre os tempos de 35 e 60 minutos de irradiação. Com 35 minutos foi observado distribuição bimodal de partículas sendo a população majoritária (95%) de partículas menores com 12 nm de diâmetro e 5% de partículas com diâmetro centrado em aproximadamente 75 nm. A distribuição de tamanho das partículas para as NPsLuc/Citrato após 60 minutos de irradiação UV foi de 11 nm e 69 nm de diâmetro. Sendo que, 96% da população consiste em partículas de tamanho de 11 nm.

Para a amostra de NPsLuc/SWy-1 não foi possível acompanhar a formação das nanopartículas por DLS. Por outro lado, observou-se que, a população com diâmetro maior da argila aumentou de tamanho durante a síntese das NPsAg em relação à da SWy-1 pura (de 622 para 988 nm). Isto pode ser atribuído a uma possível adsorção de NPsAg na argila SWy-1.

As imagens de MET, em diferentes tempos de irradiação para a formação das NPsAg para o sistema NPsIrg/Citrato estão apresentadas na Figura 22 A-C.

Assim como os resultados de DLS, a formação das NPsIrg/Citrato iniciaram com a formação de nanopartículas com diâmetros maiores. A Figura 22 A mostra que nos primeiros 5 segundos de irradiação UV ocorre a rápida redução do precursor formando grandes aglomerados de prata com diâmetros de aproximadamente 100 nm que podem ter se formado via reações de condensação (HENGLEIN; GIERSIG, 1999). A natureza de alguns aglomerados de prata tem sido explicada por radiólise de pulso; eles geralmente possuem carga positiva, tais como Ag_2^+ , Ag_4^{2+} , Ag_9^+ , etc (ERSHOV; JANATA; HENGLEIN, 1993; PILLAI; KAMAT, 2004). Também é observado a presença de partículas menores com morfologia esférica e diâmetro de aproximadamente 1,0 nm. Tanto nanopartículas esféricas quanto aglomerados de prata irregulares foram verificados.

A Figura 22 B mostrou que com 20 segundos de irradiação essas estruturas grandes de aglomerados de prata desaparecem e apenas NPsAg de morfologia esférica estão presentes. Nessa etapa, as partículas possuem distribuição heterogênea com diâmetro médio de 2,2 nm e a agregação de algumas partículas. É possível que o desaparecimento dos aglomerados maiores de NPsAg podem ser resultante da fotofragmentação dos mesmos sob irradiação UV. Nanopartículas de prata podem fragmentar-se para partículas menores durante a irradiação e seus agregados unem-se para formar partículas maiores com morfologia esférica (TRIPATHY, 2008; LI; LENHART, 2012).

Figura 22: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada pelas imagens de MET das alíquotas recolhidas a partir da reação de formação das NPs_{lrg}/Citrato em função do tempo (A) 5 segundos, (B) 20 segundos e (C) 5 minutos de irradiação UV.

Kamat et al. produziram NPsAg pelo método de redução com citrato de sódio em meio aquoso. As nanopartículas obtidas após a síntese apresentaram 40-60 nm de diâmetro. Esses clusters de 40-60 nm foram fragmentados para partículas menores de 5-20 nm sob excitação de pulso de laser em comprimento de onda de 355 nm. Quando o comprimento de onda de excitação foi de 532 nm, os autores obtiveram nanopartículas maiores com formatos irregulares. Com os experimentos, os autores concluíram que a escolha do comprimento de onda de excitação fornece a seletividade de tamanho na fragmentação dos aglomerados (KAMAT; FLUMIANI; HARTLAND, 1998).

Com 5 minutos de irradiação (Figura 22 C) as NPsAg estão mais homogêneas em distribuição de tamanho com diâmetro médio de 3,5 nm. Os resultados estão corroborando com os espectros de UV-Vis, visto que, durante a formação das NPsAg foi observado que a banda de absorção plasmônica aparece no início da irradiação em comprimentos de ondas maiores e, desloca-se para comprimentos de onda menores (região do azul) no espectro eletromagnético. Essa mudança de posição da banda de absorção plasmônica é mais evidente para as amostras preparadas com o fotoiniciador Irgacure 2959.

As imagens de MET em função do tempo de irradiação UV para a amostra de NPs_{Irg}/SWy-1 estão apresentadas na Figura 23 A-F.

Figura 23: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada pelas imagens de MET das alíquotas recolhidas a partir da reação de formação das NPs_{lrg}/SW_y-1 em função do tempo (A e B) 5 segundos, (C e D) 20 segundos e (E e F) 5 minutos de irradiação UV.

As imagens de MET mostram a formação de grandes aglomerados ($> 1 \mu\text{m}$) de prata distantes das lamelas de argila nos 5 segundos de irradiação (Figura 23 B). Por outro lado, é possível observar a formação de uma pequena quantidade de NPsAg adsorvidas na argila SWy-1 com diâmetro médio de 2,2 nm e morfologia esférica (Figura 23 A). Com 20 segundos de irradiação verificou-se a existência de aglomerados de prata com diâmetros de aproximadamente 400 nm e uma maior quantidade de nanopartículas adsorvidas na argila com diâmetro médio de 6,3 nm (Figura 23 C e D). Ao final da irradiação (5 minutos) pode-se observar que as nanopartículas estão adsorvidas na argila (Figura 23 E), possuem morfologia esférica com 10,3 nm de diâmetro, apresentam tamanho não uniforme e a agregação de algumas partículas (Figura 23 F).

A Figura 24 A e B ilustra a proposta do mecanismo de formação das NPsAg/Citrato e NPsAg/Argila em função do tempo de irradiação, respectivamente.

Pode-se dizer que para os dois casos acima a formação das NPsAg ocorre devido a coalescência das partículas, em que partículas menores se unem para formar as partículas maiores. Por outro lado, podemos separar a formação das NPsAg em dois processos distintos, em que, em um primeiro momento ocorre a rápida redução da prata originando pequenas partículas, como também grandes aglomerações da prata. Em um segundo momento, os aglomerados maiores desaparecem por fotofragmentação e, as partículas menores coalescem até atingirem certa estabilidade. No final da irradiação, apenas nanopartículas com diâmetros menores e morfologia esférica prevalecem na solução.

No caso das amostras de NPsAg/Argila, a morfologia e distribuição do tamanho das partículas podem ser influenciadas pelo tipo de estrutura do material (intercalada ou esfoliada) obtida após a síntese das nanopartículas.

Figura 24: Proposta de mecanismo de formação das NPsAg (A) estabilizadas com citrato de sódio e (B) estabilizadas com argila em função do tempo de irradiação UV investigadas por MET. Fonte: Adaptação de POLTE et al., 2012.

4.2. Caracterização das NPsAg

4.2.1. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

As diferentes distribuições do tamanho das partículas de argila ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e para as NPsIrg/Argila estão apresentadas na Figura 25 A, B e C.

A argila SWy-1 pura apresentou distribuição de partícula bimodal, sendo a majoritária (92%) constituída de partículas maiores (771 nm). Apenas 8% correspondem a partículas com diâmetro de 153 nm. As NPsIrg/SWy-1 também apresentaram distribuição bimodal, com uma população de 38% de diâmetro em 78 nm e outra com 62% de diâmetro em 691 nm (Figura 25 A).

Para as nanopartículas preparadas na presença de SWy-1, observa-se que a população com diâmetro menor (78 nm) aumentou sua porcentagem em relação à da SWy-1 pura. Para SWy-1 pura essas partículas menores representavam 8% da distribuição, para as amostras de NPsIrg/SWy-1 as partículas menores foram 38% da distribuição. Estes resultados indicam a formação de NPsAg com diâmetro na faixa de 28 a 140 nm (Figura 25 A).

A argila SYn-1 apresentou uma única população com diâmetro modal centrado em aproximadamente 427 nm. No caso das NPsIrg/SYn-1 é possível observar uma distribuição bimodal com diâmetros centrados em 72 nm e 1021 nm, com 27% e 73%, respectivamente (Figura 25 B). Como a argila SYn-1 pura não apresenta em sua distribuição partículas pequenas ($< 100 \text{ nm}$), pode-se atribuir a população com diâmetro menor (72 nm) à formação de NPsAg após a síntese. O diâmetro da população de partículas maiores (1021 nm) da amostra de NPsIrg/SYn-1 foi maior que o diâmetro obtido para a argila SYn-1 pura. Isto pode ser atribuído a uma possível agregação da argila e/ou incorporação de nanopartículas na mesma.

A argila Laponita B apresentou uma única distribuição de tamanho de partícula, constituída de partículas com diâmetro médio de 39 nm. As NPsIrg/Lap B apresentaram diâmetro centrado em 19 nm (Figura 25 C). Nota-se que para NPsAg preparadas em Laponita B, as populações apresentaram diâmetros menores em relação aos diâmetros obtidos para Laponita B pura. Esses diâmetros em 19 nm devem ser devido à formação de NPsAg em solução.

Figura 25: Distribuição do tamanho de partícula para (A) SWy-1 e NPslrg/SWy-1, (B) SYn-1 e NPslrg/SYn-1, (C) Lap B e NPslrg/Lap B, (D) SWy-1 e NPsluc/SWy-1, (E) SYn-1 e NPsluc/SYn-1 e (F) Lap B e NPsluc/Lap B em porcentagem de volume obtidas por DLS.

As amostras de NPsLuc/Argila também foram caracterizadas por DLS para estimar o diâmetro médio das nanopartículas e, os resultados estão apresentados na Figura 25 D, E e F. Como pode ser observado na Figura 25 D, SWy-1 apresentou distribuição de partícula bimodal com uma população de 92% de partículas com 668 nm de diâmetro e 8% com 129 nm. As NPsLuc/SWy-1 apresentaram 94% da população 1082 nm e 6% com 122 nm de diâmetro. Os resultados indicam que as NPsAg estão adsorvidas nas lamelas de argila, não sendo possível determinar seu tamanho.

A argila SYn-1 apresentou diâmetro modal centrado em 413 nm (Figura 25 E), enquanto que as NPsLuc/SYn-1 obtiveram distribuição bimodal com 372 e 58 nm, o qual pode ser associado a NPsAg na SYn-1 e em suspensão, respectivamente.

A argila Laponita B mostrou uma única população com 37 nm, e NPsLuc/Lap B revelou distribuição de partícula com duas populações com 20 e 96 nm de diâmetro (Figura 25 F). A população de menor diâmetro (20 nm) pode ser atribuída a formação de NPsAg, e a população de 96 nm pode ser atribuída a NPsAg adsorvidas na superfície da argila. Os resultados de DLS para as amostras de NPsLuc/Argila são similares aos obtidos com o Irg 2959 como agente redutor da prata, ou seja, as nanopartículas estabilizadas com a argila Laponita B também apresentaram os menores diâmetros médio em relação as outras argilas (SWy-1 e SYn-1).

Como mencionado anteriormente, os diâmetros das NPsAg obtidos por DLS são maiores daqueles estimados usando a técnica de MET. As diferenças dos valores são principalmente devido ao processo envolvido na preparação das amostras. A técnica de MET faz uso das amostras em seu estado seco para determinar o tamanho das partículas, enquanto que o método de DLS as medidas do tamanho das partículas são feitas em seu estado hidratado. Dessa forma, o diâmetro obtido pelo DLS é um diâmetro hidrodinâmico, que aparece sempre superestimado devido às fortes interações entre o solvente e outros constituintes das nanopartículas (COSERI et al., 2015).

4.2.2. Difração de raios X (DRX)

O tamanho e a estrutura cristalina das NPsAg/Argila foram estimados por meio de análises de DRX. Para isso soluções de NPsAg/Argila foram preparadas via fotoquímica e em seguida liofilizadas. As análises de DRX foram realizadas das argilas puras (pó) e das amostras secas de NPsIrg/Argila e NPsLuc/Argila após a síntese e processo de liofilização e, estão apresentadas na Figura 26 A-F.

A distância interlamelar das argilas foi calculada usando a equação de Bragg ($n\lambda = 2d \sin \theta$) (CANEVAROLO JR, 2003). Como pode ser observado na Figura 26 A a argila SWy-1 apresentou pico de difração (d_{001}) em $2\theta = 7,64^\circ$, o qual corresponde a um espaçamento interlamelar de 1,16 nm. Para a amostras de NPsIrg/SWy-1 observou-se um deslocamento do pico da argila SWy-1 para valores 2θ menores ($2\theta = 5,17^\circ$) após a formação das nanopartículas, originando uma estrutura intercalada com espaçamento interlamelar de 1,71 nm.

No caso da amostra de NPsLuc/SWy-1 o pico (d_{001}) diminuiu de intensidade e deslocou-se para valores de 2θ menores ($2\theta = 4,10^\circ$) após a formação das nanopartículas, resultando em uma novo valor de espaço interlamelar de 2,15 nm. Isto sugere a ocorrência de intercalação, juntamente com alguma esfoliação da argila SWy-1 (XU; REN; HANNA, 2006). O Lucirin TPO, em comparação com o Irg 2959, é uma molécula maior estericamente e, dessa maneira pode favorecer uma maior expansão das lamelas da SWy-1, favorecendo assim, sua esfoliação.

Os íons Ag^+ podem se ligar não somente sobre as superfícies externas e extremidades das argilas, mas também no espaço interlamelar, que nesse caso, as nanopartículas formadas promovem o aumento da distância interlamelar da argila. Além disso, a diminuição das intensidades dos picos das argilas após as sínteses das NPsAg indicam que a estrutura altamente ordenada do argilomineral foi perturbada pela formação de partículas (DARROUDI et al., 2009).

Figura 26: Difractogramas de raios X para as amostras (A e B) SWy-1, NPsIrg/SWy-1 e NPsLuc/SWy-1, (C e D) SYn-1, NPsIrg/SYn-1 e NPsLuc/SYn-1, (E e F) Lap B, NPsIrg/Lap B e NPsLuc/Lap B.

Para as amostras estabilizadas com a argila SYn-1, indiferente do agente redutor, ocorreu uma diminuição na intensidade do pico d_{001} , no entanto, não foi observado alterações nos valores da distância interlamelar da argila SYn-1 após a redução da prata, o que indica a formação de uma estrutura não intercalada (Figura 26 C) (XU; REN; HANNA, 2006). A argila SYn-1 (Barasym SSM-100) é uma montmorilonita sintética do tipo 2:1, que apresenta camadas dioctaédricas expansíveis e não expansíveis aleatoriamente (interestratificada). Devido a sua elevada densidade de carga a argila SYn-1 apresenta menor capacidade de expansão quando comparada com a argila SWy-1, dificultando a intercalação das nanopartículas (MELGAR, 2009).

Para a amostra de NPslrg/LapB observou-se o deslocamento e uma diminuição significativa da intensidade do pico d_{001} da argila Laponita B após a redução da prata, sugerindo a formação de uma mistura de estruturas intercaladas e esfoliadas. Enquanto que para a amostra de NPsluc/Lap B o pico em $2\theta = 6,41^\circ$ desapareceu devido a total expansão das galerias da argila, o que indica a formação de uma estrutura esfoliada (Figura 26 E) (XU; REN; HANNA, 2006).

A Tabela 3 apresenta os valores de 2θ e das distâncias interlamelares (d_{001}) para as argilas antes e após a formação das NPsluc para cada fotoiniciador utilizado nas sínteses.

Tabela 3: Distâncias interlamelares (d_{001}) das argilas antes e após a redução fotoquímica da prata

Amostras	2θ ($^\circ$)	d_{001} das argilas (nm)
SWy-1	7,64	1,16
SYn-1	7,90	1,12
Lap B	6,41	1,38
NPslrg/SWy-1	5,17	1,71
NPsluc/SWy-1	4,10	2,15
NPslrg/SYn-1	7,90	1,12
NPsluc/SYn-1	7,90	1,12
NPslrg/Lap B	5,46	1,62
NPsluc/Lap B	-	-

As Figuras 26 B, D e F mostram a presença de picos de difração por volta de $2\theta = 38,2^\circ$, $44,4^\circ$, $64,7^\circ$ e $77,6^\circ$ atribuídos aos planos cristalográficos (111), (200), (220) e (311), respectivamente, indicando a formação de NPsAg com estrutura cristalina cúbica de face centrada (cfc) (MASROURI; KASSAEE, 2014; MOVAHEDI; MASROURI; KASSAEE, 2014; COSERI et al., 2015). Nenhum outro pico de difração da prata foi observado o que indica a existência da prata metálica pura (DEHNAVI et al., 2013).

As amostras NPs_{Irg}/Lap B, NPs_{Luc}/SWy-1 e NPs_{Luc}/Lap B e apresentam um maior alargamento do pico cristalográfico (111) em comparação as outras amostras. Esse alargamento do pico pode ser atribuído à formação de partículas com menores diâmetros (HUANG; YANG, 2008). Além disso, há um pico característico na região de $2\theta = 62,1^\circ$ relacionado as argilas SWy-1, SYn-1 e Laponita B como um substrato estável (DARROUDI et al., 2009; SHAMELI et al., 2011).

Darroudi et al com os resultados de DRX da argila MMT pura e da amostra de Ag/MMT observaram a formação de uma estrutura intercalada após 96 h de irradiação UV. O tamanho interlamelar da argila MMT antes da redução da prata foi de 1,24 nm e, após o tempo de irradiação aumentou para 1,41 nm ($2\theta = 6,26^\circ$ para 96 h de irradiação) devido a intercalação das nanopartículas de prata (DARROUDI et al., 2009).

Miyoshi et al. preparam NPsAg em argila montmorilonita com diferentes concentrações de Ag^+ via redução química em n-hexanol. Após a síntese os autores também observaram um aumento da distância interlamelar da argila e a presença dos picos de difração da prata com estrutura cristalina cúbica de face centrada (MIYOSHI et al., 2010).

A partir da largura média do pico de difração (111) das NPsAg e utilizando a equação de Scherrer (INGHAM, 2015) (Equação 7) determinou-se o tamanho médio dos cristalitos de prata (D) para as NPsAg estabilizadas com as argilas SWy-1, SYn-1 e Lap B, e os valores estão apresentados na Tabela 4.

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Equação 7}$$

na qual, D é o diâmetro médio do cristalito de prata, k a constante de proporcionalidade (0,9) assumindo que as partículas são de morfologia esférica, λ o

comprimento de onda da radiação do Cu (0,154 nm) e β a largura a meia altura do pico (rad).

Tabela 4: Diâmetros das NPsAg obtidos por DRX

Amostras	Diâmetro (nm)
NPsIrg/SWy-1	11,9
NPsLuc/SWy-1	3,3
NPsIrg/SYn-1	7,1
NPsLuc/SYn-1	5,4
NPsIrg/Lap B	2,9
NPsLuc/Lap B	2,8

As amostras de NPLuc/SWy-1, NPsIrg/Lap B e NPsLuc/Lap B apresentaram os menores diâmetros de partículas (aproximadamente 3,0 nm) quando comparadas as NPsIrg/SWy-1, NPsIrg/SYn-1 e NPsLuc/SYn-1. Isso ocorre devido a capacidade de esfoliação das argilas SWy-1. Lamelas de argilas esfoliadas podem ser mais eficientes na estabilização em comparação as lamelas não esfoliadas. A estabilidade das NPsAg pode ser atribuída a alta área de superfície disponível das lamelas esfoliadas das argilas para estabilização das NPsAg (CHIU; HONG; LIN, 2011).

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os resultados de DLS foram complementados com análises de MET. A Figura 27 A-I apresentam as imagens de MET para as NPsIrg/Argila.

As imagens mostram que as nanopartículas estão localizadas principalmente nas argilas e apresentam morfologia esférica independente da argila utilizada na síntese (Figura 27 A, D e G).

As NPsIrg/SWy-1 apresentaram tamanho não uniforme e agregação de algumas partículas (Figura 27 B). Como observado nos resultados de raios x, as NPsIrg/SWy-1 estão intercaladas entre as lamelas da argila, o que favorece sua agregação e a formação de nanopartículas com maiores diâmetros (11,3 nm).

Figura 27: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada pelas imagens de MET para as (A) NPsIrg/SWY-1, (B) NPsIrg/SYN-1 e (C) NPsIrg/Lap B sintetizadas via fotoquímica.

Segundo Chih-Wei et al. durante a redução do AgNO_3 as NPs crescem e ficam aderidas nas superfícies das argilas. Como as argilas utilizadas possuem cátions trocáveis, os íons de Ag^+ podem ser trocados com os íons de Na^+ e adsorvidos nas regiões interlamelares da argila (Figura 28) (CHIU; HONG; LIN, 2011).

Figura 28: Ilustração esquemática de formação de NPsAg intercaladas na argila. Adaptação de PATAKFALVI; DÉKÁNY, 2004.

A redução de íons metálicos intercalados podem originar nanopartículas metálicas anisotrópicas entre as lamelas da argila. A estabilização das NPs pode ocorrer desde que sítios carregados nas partículas de argila promovam ligação cooperativa com íons metálicos de Ag (AIHARA; TORIGOE; ESUMI, 1998).

As NPs Irg/SYn-1 (Figura 27 E) de acordo com os resultados de DRX não foram intercaladas entre as lamelas da SYn-1, visto que esta é uma argila com menor capacidade de expansão quando comparada com a argila SWy-1, dificultando assim a intercalação das nanopartículas. Por consequência, as nanopartículas obtidas não são uniformes, apresentam alguns agregados e diâmetros maiores (10,8 nm).

No caso das NPs Irg/Lap B (Figura 27 H) em que foi observado a formação de uma estrutura esfoliada após a formação das nanopartículas, as mesmas se encontram mais uniformes e apresentam menores tamanhos (4,8 nm) em relação as AgNPs estabilizadas por SWy-1 e SYn-1 (Figura 29).

Figura 29: Ilustração esquemática de formação de NPsAg adsorvidas nas lamelas esfoliadas de argila Laponita B. Adaptação de Su, H-L et al., 2009.

Estes resultados estão de acordo com propriedades de inchamento e capacidade de troca catiônica (CTC) destas argilas. O inchamento é inversamente proporcional à densidade de carga (ξ) das argilas, ou seja, para densidade de carga superficial maior, menor será o inchamento dos espaços interlamelares da argila (CAVALHEIRO, 1995).

Czímerová et al. em seus estudos mostram que a CTC é diretamente proporcional com a densidade de carga das argilas, ou seja, quanto maior a CTC, maior a densidade de carga e consequentemente menor o inchamento da argila (CZÍMEROVÁ; BUJDÁK; DOHRMANN, 2006).

A argila Laponita B possui o menor valor de CTC (73,3 meq/100g) e a maior área superficial de 360 m²/g (Tabela 2) em relação as demais argilas. Essas características fazem com que a Laponita B tenha alta capacidade de esfoliação, com partículas menores e maior área superficial disponível para adsorção, apresentando um bom comportamento como estabilizante das NPsAg (CHIU; HONG; LIN, 2011).

Assim como as amostras preparadas com o Irg 2959, as imagens de MET para as amostras de NPsLuc/Argila mostram que as nanopartículas estão localizadas principalmente nas argilas e também apresentam morfologia esférica (Figuras 30 A-I). No entanto, as NPsAg adsorvidas na SYn-1 (Figura 30 E) apresentam distribuição de tamanho não uniforme e maiores diâmetros (5,1 nm) devido as propriedades de não expansão e intercalação da argila SYn-1.

A amostra de NPsLuc/SWy-1 (Figura 30 B) e NPsLuc/Lap B (Figura 30 H) são mais uniformes e possuem menores diâmetros que aquelas preparadas com a argila SYn-1. Como observado nos resultados de DRX, a molécula de Lucirin TPO pode favorecer a esfoliação da argila SWy-1 dando origem a uma mistura de estruturas intercaladas e esfoliadas após a síntese, proporcionando assim a formação de nanopartículas pequenas (2,6 nm). No caso da Laponita B que apresenta alta capacidade de esfoliação as nanopartículas apresentaram diâmetro médio de 3,8 nm.

Devido a capacidade de esfoliação, com partículas menores e maior área superficial disponível para adsorção, as argilas SWy-1 e Laponita B apresentam um bom comportamento como estabilizantes das NPsAg. Lamelas de argila esfoliadas podem ser mais eficientes que as lamelas não esfoliadas. A estabilidade das NPsAg pode ser atribuída a alta área de superfície das lamelas de argila (CHIU; HONG; LIN, 2011).

Figura 30: Imagens de MET (campo escuro) e distribuição do tamanho de partícula estimada por MET para as (A-C) NPsLuc/SWy-1, (D-F) NPsLuc/SYn-1 e (G-I) NPsLuc/Lap B

A Tabela 5 apresenta a distribuição de tamanho das NPsAg obtidos por DRX, MET e DLS.

Tabela 5: Distribuição de tamanho para as amostras de NPslrg/Citrato, NPslrg/Argila, NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila obtido por DRX, MET e DLS.

Amostras	Diâmetro das NPsAg (nm)		
	DRX	TEM	DLS
NPslrg/Citrato	-	3,7	6,4
NPslrg/SWy-1	11,9	11,3	78,0
NPslrg/SYn-1	7,1	10,8	72,0
NPslrg/Lap B	2,9	4,8	19,0
NPsLuc/Citrato	-	3,0	12,0
NPsLuc/SWy-1	3,3	2,6	-
NPsLuc/SYn-1	5,4	5,1	58,0
NPsLuc/Lap B	2,8	3,8	20,0

Igualmente aos resultados obtidos para as NPsAg estabilizadas com citrato de sódio, os diâmetros obtidos por DLS para as amostras de NPsAg/Argila são diferentes daqueles estimados usando a técnica de MET. As diferenças dos valores são principalmente devido ao processo envolvido na preparação das amostras. O diâmetro das NPsAg obtido pelo espalhamento de luz dinâmico é um diâmetro hidrodinâmico, que aparece sempre superestimado devido às fortes interações entre o solvente e outros constituintes das nanopartículas (COSERI et al., 2015).

Dessa maneira, foi possível obter NPsAg de maneira rápida, após 5 minutos e 60 minutos de irradiação UV na presença dos fotoiniciadores Irgacure 2959 e Lucirin TPO, respectivamente. Alguns trabalhos, focam na síntese de NPsAg via irradiação UV na presença de argilas, no entanto na ausência de um fotoiniciador. Porém, as nanopartículas são obtidas após um longo período de irradiação (aproximadamente 3-96 horas), e apresentam ampla distribuição e partículas com maior tamanho que aquelas obtidas no presente trabalho (HUANG; YANG, 2008; DARROUDI et al., 2009; GIRASE et al., 2011).

4.3. Estudo da Estabilidade das NPsAg

A estabilidade química das soluções de NPsAg preparadas via fotoquímica foram acompanhadas por UV-Vis. As diferentes soluções de NPsAg permaneceram em temperatura ambiente e na ausência da luz. Os espectros de UV-Vis foram obtidos em função do tempo durante 30 dias.

A Figura 31 A e B apresenta os espectros de absorção antes (logo após a síntese) e após exposição ao ar para as NPs_{lrg}/Citrato e NPs_{Luc}/Citrato.

Figura 31: Espectros de absorção UV-Vis em função do tempo para as amostras de (A) NPs_{lrg}/Citrato e (B) NPs_{Luc}/Citrato.

Após um dia de síntese é observado para ambas amostras uma leve diminuição da intensidade e um deslocamento do máximo da banda de absorção plasmônica para comprimentos de onda maiores. Esse efeito continua lentamente no decorrer dos 30 dias. A amostra de NPs_{lrg}/Citrato apresentou absorção inicial de 390 nm e após 30 dias a banda deslocou-se para 405 nm. No caso da amostra de NPs_{Luc}/Citrato, o deslocamento foi de 401 para 405 nm. Todas as amostras estabilizadas com as argilas apresentaram o mesmo comportamento observado acima, ou seja, diminuição da intensidade da banda de absorção plasmônica acompanhada pelo seu deslocamento para comprimentos de onda maiores (Figura 32 A-F).

Figura 32: Espectros de absorção UV-Vis em função do tempo para as amostras de (A-C) NPslrg/Argila e (D-F) NPsLuc/Argila.

De acordo com os resultados, pode-se dizer que as soluções de NPsAg/Citrato e NPsAg/Argila são sensíveis ao oxigênio e que as alterações observadas nos espectros de absorção são atribuídas à oxidação das NPsAg (HENGLEIN, 1998).

A liberação de íons Ag^+ de nanopartículas de prata é um processo de oxidação que envolve prótons (H^+) e oxigênio (O_2) dissolvido no meio. Em uma solução simples contendo nenhum outro agente oxidante ou redutor, a reação global de oxidação de NPsAg é dada como (LIU; HURT, 2010):

No entanto, Liu e Hurt inferem que a oxidação de NPsAg para Ag^+ não ocorre apenas pelo processo de transferência de elétrons que reduz O_2 diretamente da água, mas sim através de uma reação redox que produz intermediários de peróxidos. Os autores em seus estudos de fluorescência utilizaram um peróxido para detectar possíveis intermediários de H_2O_2 durante a liberação de Ag^+ . O resultado encontrado foi que o H_2O_2 é um oxidante mais poderoso do que o O_2 , e reage mais rapidamente com as NPsAg em condições ambientais (Equação 9). A reação de NPsAg/ H_2O_2 é rápida, e a etapa inicial de oxidação é o fator limitante da velocidade da reação (LIU; HURT, 2010).

Segundo a literatura a adsorção de íons Ag^+ desloca o máximo de absorção do espectro de UV-Vis segundo a relação (HENGLEIN, 1998; BERTÉ, 2013):

$$\lambda = \lambda_0 \left(1 + \frac{[Ag^+]}{[Ag]} \right)^{1/2} \quad \text{Equação 10}$$

na qual, λ_0 e λ são comprimentos de onda da absorção máxima antes e após a liberação de íons Ag^+ , respectivamente. $[Ag]$ é a concentração de prata presente nas soluções, nesse caso, a concentração de precursor utilizado nas sínteses

(0,2 mmol L⁻¹) e [Ag⁺] a concentração de íons Ag⁺ adsorvidos equivalente a prata oxidada. Com essa relação é possível estimar a quantidade de íons Ag⁺ que é liberado no meio em função do tempo.

A Tabela 6 apresenta todos os valores de λ_o , λ e as concentrações de Ag⁺ referente a prata oxidada após um 1 dia e após um período de tempo de 30 dias.

Tabela 6: Comprimento de onda inicial (λ_o) e final (λ), [Ag⁺] liberados após 1 e 30 dias e variação da intensidade da banda de absorção plasmônica após 30 dias de síntese

Amostras	λ_o (nm)	λ (nm)	[Ag ⁺] ($\mu\text{mol L}^{-1}$) após 1 dia	[Ag ⁺] ($\mu\text{mol L}^{-1}$) após 30 dias	Δ da intensidade de absorção
NPslrg/Citrato	390	405	14,6	15,7	0,8
NPslrg/SWy-1	400	424	13,2	24,7	1,2
NPslrg/SYn-1	405	418	7,9	13,0	0,8
NPslrg/Lap B	402	410	8,0	8,0	0,8
NPsluc/Citrato	401	408	6,0	7,0	0,8
NPsluc/SWy-1	402	419	11,1	17,3	1,3
NPsluc/SYn-1	408	420	7,9	12,0	1,0
NPsluc/Lap B	400	411	10,1	11,2	1,0

No geral, as amostras estabilizadas com a argila SWy-1 apresentaram os maiores valores de concentração de íons Ag⁺ liberados no meio após os 30 dias, com um total de 24,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 17,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as NPslrg/SWy-1 e NPsluc/SWy-1, respectivamente. Como a oxidação da Ag⁰ para Ag⁺ é dependente de H⁺ e oxigênio, logo é favorecida em meios ácidos (LIU; HURT, 2010). Assim, a presença de sítios ácidos na região interlamelar da argila SWy-1 pode contribuir para a maior liberação de íons Ag⁺ da superfície das NPslrg.

4.4. Ensaios Microbiológicos

A atividade antimicrobiana das argilas puras, e das amostras de NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila foram investigadas contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados de índice de sobrevivência em porcentagem contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* estão apresentados na Figura 33.

Figura 33: Índice de sobrevivência das bactérias *E. coli* e *S. aureus* incubadas por 24 h a 37 °C com argilas puras, NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila.

A Figura 33 mostra que as amostras de NPsLuc/Citrato, SWy-1 e SYn-1 levaram a uma diminuição do índice de sobrevivência para *E. coli* e *S. aureus*, evidenciando um pequeno efeito antimicrobiano. Isso pode ser resultado da interação das NPsAg com a fase aquosa, que promove a liberação oxidativa de íons Ag^+ da superfície das NPsAg. Portanto, um dos mecanismos antimicrobiano da ação dos íons Ag^+ envolve a ligação de íons Ag^+ em grupos funcionais de proteínas e enzimas da bactéria promovendo a inativação e inibição de processos celulares causando a sua morte (SOHRABNEZHAD et al., 2014).

Sob condições fisiológicas, a parede celular da bactéria é carregada negativamente devido a grupos carboxilas, fosfato e hidroxilas presentes na superfície de lipoproteínas (SOHRABNEZHAD et al., 2014). Por outro lado, a argila pura dispersa em água exibe carga negativa. Consequentemente, bactérias não seriam significativamente atraídas pela argila, o qual justifica a fraca atividade antimicrobiana da argila (HERRERA; BURGHARDT; PHILLIPS, 2000).

H-L. Su et al em seus estudos observaram que ambas as amostras de argila pura e NPsAg suportadas em argila lucentite SWN aderem em bactérias, sugerindo a presença de uma força de atração eletrostática entre as camadas de silicato e a bactéria (SU et al., 2009).

Resultados similares foram obtidos por Hu e Xia, que estudaram a ação antimicrobiana da montmorilonita contra *Escherichia coli* K₈₈. Eles observaram que a argila montmorilonita (MMT) apresentou alguma habilidade para reduzir a quantidade de bactérias (HU; XIA, 2006).

As NPsLuc/SYn-1 e NPsLuc/SWy-1 mostraram um efeito na unidade formadora de colônia (CFU), no entanto um índice de sobrevivência muito menor, especialmente para a amostra de NPsLuc/SWy-1 foi observado, comparado com os resultados obtidos para as argilas puras e NPsLuc/Citrato (Tabela 8).

A amostra de NPsLuc/SWy-1 mostrou a melhor atividade antimicrobiana contra ambas as espécies testadas e o menor índice de sobrevivência de 3,9% e 4,3% contra *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. A melhor atividade antimicrobiana apresentada pela amostra de NPsLuc/SWy-1 pode ser atribuída a maior quantidade de íons Ag⁺ liberados da superfície das NPsAg. A amostra de NPsLuc/SWy-1 nos estudos de estabilidade das NPsAg apresentou a maior quantidade de liberação de Ag⁺ (17,3 µmol L⁻¹) em comparação com as outras amostras (NPsLuc/SYn-1 e NPsLuc/LapB). A presença de sítios ácidos na região interlamelar da argila SWy-1 contribui para a liberação de íons Ag⁺ da superfície das NPsAg e, consequente melhorando a atividade antimicrobiana das NPsAg.

A Tabela 7 apresenta os resultados de índice de sobrevivência para as bactérias *E. coli* e *S.aureus* na presença das NPsLuc/Citrato, argilas e NPsLuc/Argila.

Tabela 7: Índice de sobrevivência para as bactérias com argilas puras, NPsLuc/Citrato e NPsLuc/Argila. Os experimentos foram realizados em triplicata e utilizou-se o valor médio.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Controle	100 ± 0	100 ± 0
Lap_B	122,3 ± 35,5	147,2 ± 30,9
SYn-1	75,9 ± 0,6	67,8 ± 1,9
SWy-1	68,1 ± 1,8	91,4 ± 12,1
NPsLuc/Citrato	83,0 ± 4,6	71,5 ± 6,5
NPsLuc/Lap B	119,8 ± 9,7	109,2 ± 23,1
NPsLuc/SYn-1	65,3 ± 4,5	66,6 ± 7,8
NPsLuc/SWy-1	3,9 ± 0,1	4,3 ± 0,1

Alguns trabalhos demonstram a dependência da atividade antimicrobiana com o tamanho (MORONES et al., 2005) e com a morfologia de NPsAg (PAL; TAK; SONG, 2007).

Agnihotri et al. estudaram a eficácia bacteriana de NPsAg com diferentes tamanhos (5-100 nm) contra quatro cepas de bactérias. Em seus experimentos de concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC), os autores observaram que o efeito bacteriostático/bactericida foram dependente do tamanho e quantidade de NPsAg contra as quatro bactérias testadas. O efeito bactericida das NPsAg contra todas as bactérias foi melhorado significativamente quando o diâmetro das nanopartículas foi reduzido de 10-5 nm (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014).

Actis et al. prepararam via redução química três geometrias diferentes de NPsAg (esférica, triangular e cúbica) e avaliaram suas ações microbianas contra *S. aureus* e *S. aureus* resistente a meticilina durante em um período de 24 horas. Os autores observaram que a atividade antimicrobiana não foi dependente da morfologia e sim da concentração das NPsAg utilizadas. Em seus resultados todas as geometrias de NPsAg apresentaram 0% de viabilidade bacteriana para a concentração mais alta (0,5 nM) de nanopartículas testada, enquanto que,

concentrações mais baixas não mostraram redução na viabilidade bacteriana para as células testadas (ACTIS et al., 2015).

No presente estudo a atividade antimicrobiana não foi influenciada pelo tamanho das NPsAg, visto que, a amostra de NPsLuc/Lap B que também possui menores diâmetros de partículas de prata (~ 3 nm), não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana. Resultados similares também foram obtidos por Hong-Lin et al, em que a inibição do crescimento bacteriano foi independente do tamanho das partículas. Isso sugere que a interação entre a argila carregada de NPsAg com a superfície da bactéria, também é um fator importante na contribuição da ação antimicrobiana de NPsAg/Argila (SU et al., 2009).

Segundo Wei et al., o papel do suporte das nanopartículas é entregar as NPsAg até a superfície bacteriana. A natureza das finas camadas e a intensidade das cargas da superfície das argilas sobre as nanopartículas pode favorecer a condução do material para aderir à bactéria (WEI et al., 2013).

Para sistemas de suporte sólido, alguns trabalhos têm demonstrado que íons Ag^+ liberados da superfície das NPsAg são responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (SHAMELI et al., 2011). Girase et al. através de seus estudos sugerem que ocorre em um primeiro momento uma rápida liberação de íons Ag^+ do topo da superfície de estruturas híbridas de Ag-argila, seguida por uma liberação relativamente lenta e controlada por difusão de íons Ag^+ das camadas subsequentes da argila. Segundo os autores, a liberação íons Ag^+ pode ser controlada pelos espaços interlamelares da argila ou pelo grau de intercalação (GIRASE et al., 2011).

Assim a presença de espaços interlamelares na argila ou o grau de intercalação pode promover a liberação de Ag^+ através de um processo de difusão controlada. A estrutura em camadas paralelas e empilhadas da SWy-1 juntamente com o pequeno diâmetro das NPsAg favoreceu a atividade antimicrobiana do material.

As amostras de Laponita B e NPsLuc/Lap B, não demonstraram nenhuma atividade antimicrobiana. Consequentemente, a Laponita pode ser considerada como inativa pois os resultados sugerem um leve aumento no número de bactérias (multiplicação) na presença dessa argila (HILL; ZHANG; WHITTEN, 2015; MAURIN et al., 2014). Esses resultados são similares aos de Ghadiri et al. (GHADIRI; CHRZANOWSKI; ROHANIZADEH, 2014), que estudaram a eficiência antimicrobiana

e citotoxicidade da argila Laponita. Em seus estudos, a Laponita não mostrou nenhuma propriedade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*, bem como nenhum efeito citotóxico sobre células de fibroblastos. Além disso, os autores notaram um aumento no número de fibroblastos na presença de Laponita.

4.5. Aplicação de NPsAg em Polimerização Fotoiniciada

Foi estudada a polimerização HEMA/EGDMA (50:50) utilizando-se como sistema iniciador Irgacure 369 (1% m/m) e diferentes concentrações de NPsAg. A cinética de polimerização foi acompanhada por meio da técnica de fotocalorimetria (PCA). As proporções dos monômeros e do fotoiniciador foram mantidas constantes, variando-se apenas a quantidade de nanopartículas adicionada a mistura 5 e 10% (v/v) da solução irradiada. Os seguintes sistemas foram estudados, com o objetivo de analisar a influência das NPsAg durante o processo de fotopolimerização:

- HEMA/EGDMA (50:50), 1% Irg 369
- HEMA/EGDMA (50:50), 1% Irg 369 e NPslrg/Citrato (5 e 10% v/v)
- HEMA/EGDMA (50:50), 1% Irg 369 e NPsluc/Citrato (5 e 10% v/v)
- HEMA/EGDMA (50:50), 1% Irg 369 e NPslrg/Argila (5 e 10% v/v)
- HEMA/EGDMA (50:50), 1% Irg 369 e NPsluc/Argila (5 e 10% v/v)

Foram obtidas as conversões de monômero em polímero de cada uma das amostras e ainda as curvas de velocidade de reação.

A Figura 34 A-D ilustra as porcentagens de conversão dos monômeros em polímero em função do tempo de irradiação para os sistemas de HEMA/EGDMA (50:50) com 1% de Irg 369, na ausência e presença de NPsAg. Todas as soluções de NPsAg foram utilizadas logo após as sínteses.

Figura 34: Porcentagem de conversão dos sistemas HEMA/EGDMA com 5 e 10% (v/v) de (A) NPslrg/Citrato, (B) NPslrg/Argila, (C) NPsLuc/Citrato e (D) NPsLuc/Argila.

A porcentagem de conversão foi calculada a partir da Equação 6. Para os cálculos, foi considerada a entalpia teórica de reação da dupla ligação como 57 kJ mol^{-1} (DICKENS et al., 2003). Como os monômeros são difuncionais considerou-se a entalpia total teórica da reação como 114 kJ mol^{-1} .

Os perfis das curvas de porcentagem de conversão das misturas dos monômeros HEMA/EGDMA em polímero mostram que a adição de NPsAg influenciou na porcentagem de conversão total das misturas estudadas. Os resultados indicaram que com a adição de NPsAg (5 e 10% v/v) ocorre uma diminuição da conversão das amostras em todo o tempo de irradiação e, quanto maior a quantidade de solução de NPsAg (10% v/v) adicionada menor foi

a porcentagem de polimerização da mistura de monômeros em polímero (Tabela 8). Ao adicionar 10% (v/v) de NPsAg observou-se uma diminuição de aproximadamente 13% na porcentagem de conversão total de polimerização.

A Figura 35 A-D apresenta o gráfico da velocidade de polimerização (R_p) em função do tempo para os sistemas de HEMA/EGDMA, na ausência e presença das soluções de NPsAg (5 e 10% v/v).

Figura 35: Velocidade de polimerização (R_p) em função do tempo de irradiação, para os sistemas HEMA/EGDMA com 5 e 10% (v/v) de (A) NPsrg/Citrato, (B) NPsrg/Argila, (C) NPsLuc/Citrato e (D) NPsLuc/Argila.

Como observado anteriormente, os perfis das curvas de velocidade de polimerização (R_p) mostram que com a adição de 5 e 10% (v/v) de solução de NPsAg ocorre uma diminuição nas velocidades de polimerização para todos os sistemas quando comparado ao sistema HEMA/EGDMA com 1% de Irg 369 sem adição de NPsAg. Foi observada uma diminuição da velocidade de polimerização de $2,9 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para $1,9 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ao adicionar 5% (v/v) de NPsAg e de $2,9 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para aproximadamente $1,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ com a adição de 10% (v/v) de NPsAg.

Melinte et al. estudaram o efeito de pequenas quantidades de nanopartículas de Ag na fotopolimerização de dimetacrilatos de uretana com ou sem radicais carbonila em sua estrutura. Os autores observaram uma diminuição de aproximadamente 10% na conversão total de polimerização (de 85,35% para 77,23%) com a adição de 2,5% (m/m) de nanopartículas metálicas de prata (MELINTE et al., 2012).

A diminuição nos valores da percentagem de conversão e da velocidade de polimerização (R_p) pode ser atribuída à presença das NPsAg no sistema que, provavelmente, devido sua absorção na região de 400 nm são responsáveis por uma menor penetração de luz. Portanto a fotólise do fotoiniciador pode se tornar menos eficiente. Além disso, a adição de NPsAg pode aumentar a viscosidade do meio causando uma baixa mobilidade molecular das espécies reativas (MAURIN et al., 2014).

A Tabela 8 apresenta os valores de velocidade de polimerização (R_p), e a conversão máxima dos polímeros obtidos dos sistemas estudados.

Tabela 8: Velocidades de polimerização e porcentagens de conversão total dos polímeros obtidos a partir dos sistemas HEMA/EGDMA com 5 e 10% (v/v) de NPslrg/Citrato, NPslrg/Argila, NPsluc/Citrato e NPsluc/Argila.

Sistemas	R_p máximo (mol L⁻¹ min⁻¹)	% de conversão total
HEMA/EGDMA	2,9	61,0
5% NPslrg/Citrato	1,9	60,0
5% NPslrg/SWy-1	1,9	58,0
5% NPslrg/SYn-1	2,1	57,0
5% NPslrg/Lap B	2,0	58,0
10 % NPslrg/Citrato	1,4	52,0
10 % NPslrg/SWy-1	1,4	53,0
10 % NPslrg/SYn-1	1,4	54,0
10 % NPslrg/Lap B	1,4	52,0
5% NPsluc/Citrato	2,1	60,0
5% NPsluc/SWy-1	2,3	59,0
5% NPsluc/SYn-1	2,1	59,0
5% NPsluc/Lap B	2,1	59,0
10% NPsluc/Citrato	1,7	52,0
10% NPsluc/SWy-1	1,6	52,0
10% NPsluc/SYn-1	1,7	51,0
10% NPsluc/Lap B	1,6	53,0

CONCLUSÕES

Nanopartículas de prata (NPsAg) foram sintetizadas em solução contendo citrato de sódio ou argila (SWy-1, SYn-1, Laponita B) como estabilizantes pelo método de redução via fotoquímica, usando fotoiniciadores do Tipo I para reduzir a prata. Essa metodologia foi uma boa ferramenta para obter NPsAg/Argila de maneira rápida, após 5 minutos ou 60 minutos de irradiação UV na presença dos fotoiniciadores Irgacure 2959 e Lucirin TPO, respectivamente.

A formação das AgNPs estabilizadas com citrato de sódio para ambos os fotoiniciadores foi acompanhada pela formação de uma banda de absorção plasmônica em torno de 400 nm, enquanto que para as amostras estabilizadas com as argilas (NPsAg/Argila) a banda ficou em torno de 405 e 412 nm. Análises de DLS e MET, em função do tempo de irradiação, revelaram que a formação das nanopartículas ocorre a partir de uma rápida redução da prata, formando pequenas partículas esféricas, que coalescem até atingirem certa estabilidade para formar as NPsAg. Observou-se a presença de grandes aglomerados de prata no início das sínteses que desaparecem por fotofragmentação durante a irradiação.

As imagens de microscopia revelaram NPsAg com morfologia esférica após a fotoirradiação das amostras. O tipo de estrutura das amostras de NPsAg/Argila obtida após a síntese influenciou no tamanho e estabilidade das NPsAg. No caso das amostras que exibiram estruturas parcialmente esfoliadas (NPsIrg/Lap B e NPsLuc/SWy-1) e totalmente esfoliadas (NPsLuc/Lap B) apresentaram NPsAg com grande homogeneidade e diâmetros menores em comparação com as NPsIrg/SWy-1 (estrutura intercalada), NPsIrg/SYn-1 e NPsLuc/SYn-1 (estruturas não intercaladas). A esfoliação das argilas proporciona uma maior área superficial disponível para adsorção das NPsAg, que são mais eficientes na estabilização das NPsAg em comparação as lamelas não esfoliadas.

A amostra de NPsLuc/SWy-1 apresentou uma grande atividade antimicrobiana contra ambas as bactérias *E. coli* e (Gram negativa) *S. aureus* (Gram positiva). É conhecido que bactérias Gram negativas são mais difíceis de matar para qualquer método utilizado, o que torna esse resultado muito importante com significância clínica.

Para os experimentos de fotocalorimetria (PCA) a adição de pequenas quantidades de NPsAg ao sistema de HEMA/EGDMA tornou menos eficiente a fotólise do fotoiniciador Irg 369. Como resultado foi observado a diminuição nos valores da porcentagem de conversão e da velocidade de polimerização (R_p) dos monômeros.

REFERÊNCIAS

ABADIE, M.J.; APPELT, B.K. Photocalorimetry of light-cured dental composites **Dental Materials**, v.5, n.1, p.6–9, 1989.

ACTIS, L. et al. Effect of silver nanoparticle geometry on methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*, and osteoblast viability. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v.26, n.7, p.215, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Módulo 3: principais síndromes infecciosas. Brasília: ANVISA, 2010. Disponível em: <file:///C:/Users/Carniatto/Downloads/Modulo+003 (1).pdf>. Acesso em: 19 abr. 2016.

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, v.4, n.8, p.3974–3983, 2014.

AHMAD, M.B. et al. Synthesis and characterization of silver/clay nanocomposites by chemical reduction method. **American Journal of Applied Sciences**, v.6, n.11, p.1909–1914, 2009.

AIHARA, N.; TORIGOE, K.; ESUMI, K. Preparation and characterization of gold and silver nanoparticles in layered laponite suspensions. **Langmuir**, v.14, n.17, p.4945–4949, 1998.

ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering: R**, v.28, n.1-2, p.1–63, 2000.

BERNI NETO, E.A. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas**. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

BERTÉ, R. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata conjugadas com peptídeos antimicrobianos**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

BURRIDGE, K.; JOHNSTON, J.; BORRMANN, T. Silver nanoparticle–clay composites. **Journal of Materials Chemistry**, v.21, n.3, p.734–742, 2011.

CANEVAROLO JR., S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003.

CAVALHEIRO, C.C.S. **Estudos das interações entre corantes catiônicos e partículas de argila em suspensão**. 1995. 207 f. Tese (Doutorado em Física Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

CHADHA, R.; MAITI, N.; KAPOOR, S. Reduction and aggregation of silver ions in aqueous citrate solutions. **Materials Science & Engineering C: materials for biological applications**, v.38, p.192–196, 2014.

CHANDRAKANTH, R.K. et al. Potential bactericidal effect of silver nanoparticles synthesised from enterococcus species. **Oriental Journal of Chemistry**, v.30, n.3, p.1253–1262, 2014.

CHHATRE, A. et al. Color and surface plasmon effects in nanoparticle systems: case of silver nanoparticles prepared by microemulsion route. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v.404, p.83–92, 2012.

CHIU, C.W.; HONG, P.D.; LIN, J.J. Clay-mediated synthesis of silver nanoparticles exhibiting low-temperature melting. **Langmuir**, v.27, n.18, p.11690–11696, 2011.

CIONE, A.P.P. et al. The Effect of added salt on the aggregation of clay particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.226, n.2, p.205–209, 2000.

COELHO, A.C.V.; SANTOS, P.S.; SANTOS, H.S. Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. **Química Nova**, v.30, n.1, p.146–152, 2007.

COSERI, S. et al. Green synthesis of the silver nanoparticles mediated by pullulan and 6-carboxypullulan. **Carbohydrate Polymers**, v.116, p.9–17, 2015.

COURROL, L.C.; OLIVEIRA SILVA, F.R.; GOMES, L. A Simple method to synthesize silver nanoparticles by photo-reduction. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v.305, n.1-3, p.54–57, 2007.

CZÍMEROVÁ, A.; BUJDÁK, J.; DOHRMANN, R. Traditional and novel methods for estimating the layer charge of smectites. **Applied Clay Science**, v.34, n.1-4, p.2–13, 2006.

DARROUDI, M. et al. Synthesis and characterization of UV-irradiated silver/montmorillonite nanocomposites. **Solid State Sciences**, v.11, n.9, p.1621–1624, 2009.

DEHNAVI, A.S. et al. Preparation and characterization of polyethylene/silver nanocomposite films with antibacterial activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v.127, n.2, p.1180–1190, 2013.

DEEPA, PR.; CHAITHANNEYA; RAMA, B. P. Phytochemical properties and antimicrobial activities of leaf, bark, fruit extracts and silver nanoparticles of *Samadera indica* Gaertner. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v.3, n.12, p.30–37, 2015.

DICKENS, S.H. et al. Photopolymerization kinetics of methacrylate dental resins. **Macromolecules**, v.36, n.16, p.6043–6053, 2003.

DONG, R.X.; CHOU, C.C.; LIN, J.J. Synthesis of immobilized silver nanoparticles on ionic silicate clay and observed low-temperature melting. **Journal of Materials Chemistry**, v.19, n.15, p.2184, 2009.

DONG, R.X.; TSAI, W.C.; LIN, J.J. Tandem synthesis of silver nanoparticles and nanorods in the presence of poly(oxyethylene)-amidoacid template. **European Polymer Journal**, v.47, n.7, p.1383–1389, 2011.

DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 2006.

ERSHOV, B.G.; JANATA, E.; HENGLEIN, A. Growth of silver particles in aqueous solution: long-lived “magic” clusters and ionic strength effects. **The Journal of Physical Chemistry**, v.97, n.2, p.339–343, 1993.

FENG, Q.L. et al. A Mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, n.4, p.662–668, 2000.

FREESTONE, I. et al. The Lycurgus cup — a roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, v.40, n.4, p.270–277, 2007.

GAMA, C.F. **Uma proposta para o ensino de nanociência e da nanotecnologia, nas aulas de física do ensino médio**. 2013. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Educação, Instituto de Física, Instituto de Química e Instituto de Biociências, São Paulo, 2013.

GARCIA, M.V.D. **Síntese , caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2011.

GESSNER, F.; SCHMITT, C.C.; NEUMANN, M.G. Time-dependent spectrophotometric study of the interaction of basic dyes with clays. i. methylene blue and neutral red on montmorillonite and hectorite. **Langmuir**, v.10, n.10, p.3749–3753, 1994.

GHADIRI, M.; CHRZANOWSKI, W.; ROHANIZADEH, R. Antibiotic eluting clay mineral (Laponite®) for wound healing application: an in vitro study. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v.25, n.11, p.2513–2526, 2014.

GIRASE, B. et al. Silver–clay nanohybrid structure for effective and diffusion-controlled antimicrobial activity. **Materials Science and Engineering: C**, v.31, n.8, p.1759–1766, 2011.

GOMES, C.F. **Argilas: o que são e para que servem**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986.

GORUP, L.F. **Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos**. 2010. 127 f. Dissertação (Mestrado em Físico Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

HADA, H.; YONEZAWA, Y.; KURAKAKE, A. Photoreduction of silver ion in aqueous and alcoholic solutions. **The Journal of Physical Chemistry**, v.80, n.25, p.2728–2731, 1976.

HARAGUCHI, K. Synthesis and properties of soft nanocomposite materials with novel organic/inorganic network structures. **Polymer Journal**, v.43, n.3, p.223–241, 2011.

HENGLEIN, A. Colloidal silver nanoparticles: photochemical preparation and interaction with O₂, CCl₄, and some metal ions. **Chemistry of Materials**, v.10, n.1, p.444–450, 1998.

HENGLEIN, A.; GIERSIG, M. Formation of colloidal silver nanoparticles: capping action of citrate. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.103, n.44, p.9533–9539, 1999.

HERRERA, P.; BURGHARDT, R.C.; PHILLIPS, T.D. Adsorption of salmonella enteritidis by cetylpyridinium-exchanged montmorillonite clays. **Veterinary Microbiology**, v.74, n.3, p.259–272, 2000.

HILL, E.H.; ZHANG, Y.; WHITTEN, D.G. Aggregation of cationic p-phenylene ethynylenes on Laponite clay in aqueous dispersions and solid films. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.449, p.347–356, 2015.

HU, C.H.; XIA, M.S. Adsorption and antibacterial effect of copper-exchanged montmorillonite on Escherichia coli K88. **Applied Clay Science**, v.31, n.3-4, p.180–184, 2006.

HUANG, H.; YANG, Y. Preparation of silver nanoparticles in inorganic clay suspensions. **Composites Science and Technology**, v.68, n.14, p.2948–2953, 2008.

INGHAM, B. X-ray scattering characterisation of nanoparticles. **Crystallography Reviews**, v.21, n.4, p.229–303, 2015.

IRAVANI, S. et al. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v.9, n.6, p.385–406, 2014.

JOSE-YACAMAN, M. et al. Maya blue paint: an ancient nanostructured material. **Science**, v.273, n.5272, p.223–225, 1996.

JRADI, S. et al. Spatially controlled synthesis of silver nanoparticles and nanowires by photosensitized reduction. **Nanotechnology**, v.21, n.9, p.095605, 2010.

JUNG, J.H. et al. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. **Journal of Aerosol Science**, v.37, n.12, p.1662–1670, 2006.

KAMAT, P.V.; FLUMIANI, M.; HARTLAND, G.V. Picosecond dynamics of silver nanoclusters. photoejection of electrons and fragmentation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.102, n.17, p.3123–3128, 1998.

KIM, J.Y.; IHN, K.J.; NA, J.S. Synthesis of silver nanoparticles within intercalated clay/polymer nanocomposite via in situ electron transfer reaction. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.17, n.2, p.248–253, 2011.

KIM, J.S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v.3, n.1, p.95–101, 2007.

LARA, H.H. et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.4, p.615–621, 2009.

LEE, D.K.; KANG, Y.S. Synthesis of silver nanocrystallites by a new thermal decomposition method and their characterization. **ETRI Journal**, v.26, n.3, p.252–256, 2004.

LI, X.; LENHART, J.J. Aggregation and dissolution of silver nanoparticles in natural surface water. **Environmental Science & Technology**, v.46, n.10, p.5378–5386, 2012.

LIU, J.; HURT, R.H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. **Environmental Science & Technology**, v.44, n.6, p.2169–2175, 2010.

LIU, J. et al. Preparation of high concentration of silver colloidal nanoparticles in layered laponite sol. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v.302, n.1-3, p.276–279, 2007.

LIZ-MARZÁN, L.M. Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. **Langmuir**, v.22, n.1, p.32–41, 2006.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

MANNHEIMER, W.A. **Microscopia dos materiais: uma introdução**. Rio de Janeiro: E-papers, 2002.

MARETTI, L. et al. Facile photochemical synthesis and characterization of highly fluorescent silver nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v.131, n.39, p.13972–13980, 2009.

MARIN, M.L.; MCGILVRAY, K.L.; SCAIANO, J.C. Photochemical strategies for the synthesis of gold nanoparticles from Au(III) and Au(I) using photoinduced free radical generation. **Journal of the American Chemical Society**, v.130, n.49, p.16572–16584, 2008.

MARYAN, A.S.; MONTAZER, M. Natural and organo-montmorillonite as antibacterial nanoclays for cotton garment. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.22, p.164–170, 2015.

MAURIN, V. et al. UV powder coatings containing synthetic Ag-beidellite for antibacterial properties. **Applied Clay Science**, v.96, p.73–80, 2014.

MEDSKER, R.E. et al. ^{31}P -NMR characterization of chain ends in polymers and copolymers prepared using lucirin tpo as a photoinitiator. **Acta Chimica Slovenica**, v.45, n.4, p.371–388, 1998.

MELGAR, L.Z. **Estudo das interações entre os fungicidas (carbendazim e fuberidazole) e as partículas de argila em suspensão aquosa. Adsorção, fotofísica e fotoquímica.** 2009. 128 f. Tese (Doutorado em Físico Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MELINTE, V. et al. Photocrosslinkable acid urethane dimethacrylates from renewable natural oil and their use in the design of silver/gold polymeric nanocomposites. **Reactive and Functional Polymers**, v.72, n.4, p.252–259, 2012.

METTLER-TOLEDO AG, ANALYTICAL. **DSC-Photocalorimetry system:** study of photoinitiated reactions. Switzerland, 2010.

MIYOSHI, H. et al. Characterization and photochemical and antibacterial properties of highly stable silver nanoparticles prepared on montmorillonite clay in n-hexanol. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.345, n.2, p.433–441, 2010.

MORONES, J.R. et al. The Bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v.16, n.10, p.2346–2353, 2005.

MOVAHEDI, F.; MASROURI, H.; KASSAEE, M.Z. Immobilized silver on surface-modified ZnO nanoparticles: as an efficient catalyst for synthesis of propargylamines in water. **Journal of Molecular Catalysis A: chemical**, v.395, p.52–57, 2014.

MUZAMIL, M. et al. Synthesis of silver nanoparticles by silver salt reduction and its characterization. **IOP Conference series: materials science and engineering**, v.60, n.1, p.012034, 2014.

NANDA, A.; SARAVANAN, M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v.5, n.4, p.452–456, 2009.

NOWACK, B.; KRUG, H.F.; HEIGHT, M. 120 Years of nanosilver history : implications for policy makers. **Environmental Science & Technology**, v.45, n.4, p.1177–1183, 2010.

PACIONE, N.L. et al. Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles: a mechanistic perspective. In: ALARCON, E.I. (Ed.). **Silver nanoparticle applications, engineering materials**. Switzerland: Springer International, 2015. p.13-46.

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*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.6, p.1712–1720, 2007.

PARK, J. et al. Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. **Angewandte Chemie International Edition**, v.46, n.25, p.4630–4660, 2007.

PARK, J.W.; SHUMAKER-PARRY, J.S. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v.136, n.5, p.1907–1921, 2014.

PATAKFALVI, R.; DÉKÁNY, I. Synthesis and intercalation of silver nanoparticles in kaolinite/DMSO complexes. **Applied Clay Science**, v.25, n.3-4, p.149–159, 2004.

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**, v.108, n.3, p.945–951, 2004.

POLTE, J. et al. Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: analogies and differences to the growth of gold nanoparticles. **ACS Nano**, v.6, n.7, p.5791–5802, 2012.

PRABHU, S.; POULOSE, E.K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, v.2, n.1, p.32, 2012.

PRAUS, P. et al. Characterization of silver nanoparticles deposited on montmorillonite. **Applied Clay Science**, v.49, n.3, p.341–345, 2010.

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

RAVEENDRAN, P.; FU, J.; WALLEN, S.L. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, n.46, p.13940–13941, 2003.

REMANT BAHADUR, K.C.; THAPA, B.; BHATTARAI, N. Gold nanoparticle-based gene delivery: promises and challenges. **Nanotechnology Reviews**, v.3, n.3, p.269–280, 2014.

ROGERS, B.; PENNATHUR, S.; ADAMS, J. **Nanotechnology**: understanding small systems. 2nded. Boca Raton: CRC, 2011.

SAKAI, H. et al. Preparation of highly dispersed core/shell-type titania nanocapsules containing a single Ag nanoparticle. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, n.15, p.4944–4945, 2006.

SAKAMOTO, M.; FUJISTUKA, M.; MAJIMA, T. Light as a construction tool of metal nanoparticles: synthesis and mechanism. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: photochemistry reviews**, v.10, n.1, p.33–56, 2009.

SANTOS, D.O. et al. Staphylococcus aureus : visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.6, p.413–423, 2007.

SANTOS, P.S. **Ciência e tecnologia de argilas**. 2.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1989. v.1.

SATO-BERRÚ, R. et al. Silver nanoparticles synthesized by direct photoreduction of metal salts. Application in surface-enhanced raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.40, n.4, p.376–380, 2009.

SHAMELI, K. et al. Synthesis of silver/montmorillonite nanocomposites using γ -irradiation. **International Journal of Nanomedicine**, v.5, p.1067–1077, 2010.

_____. Synthesis of silver nanoparticles in montmorillonite and their antibacterial behavior. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.581–590, 2011.

SLISTAN-GRIJALVA, A. et al. Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol. **Physica E: low-dimensional systems and nanostructures**, v.27, n.1-2, p.104–112, 2005.

SLUGGETT, G.W. et al. (2,4,6-trimethylbenzoyl) diphenylphosphine oxide photochemistry. a direct time-resolved spectroscopic study of both radical fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v.117, n.18, p.5148–5153, 1995.

SOHRABNEZHAD, S. et al. Study of antibacterial activity of Ag and Ag₂CO₃ nanoparticles stabilized over montmorillonite. **Spectrochimica Acta: part A, molecular and biomolecular spectroscopy**, v.136PC, p.1728–1733, 2014.

SONDI, I.; GOIA, D.V.; MATIJEVIĆ, E. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.260, n.1, p.75–81, 2003.

SONG, K.C. et al. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.26, n.1, p.153–155, 2009.

STAMPLECOSKIE, K. **Silver nanoparticle controlled synthesis and implications in spectroscopy, biomedical and optoelectronics applications**. 2013. 177 f. Thesis (PhD Chemistry) - University of Ottawa, Ottawa, 2013.

STAMPLECOSKIE, K.G.; SCAIANO, J.C. Light emitting diode irradiation can control the morphology and optical properties of silver nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, n.6, p.1825–1827, 2010.

_____. Kinetics of the formation of silver dimers: early stages in the formation of silver nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v.133, n.11, p.3913–3920, 2011.

STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. **Journal of Immunological Methods**, v.157, n.1-2, p.225–231, 1993.

SU, H.L. et al. The Disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. **Biomaterials**, v.30, n.30, p.5979–5987, 2009.

_____. Novel nanohybrids of silver particles on clay platelets for inhibiting silver-resistant bacteria. **PloS one**, v.6, n.6, p.e21125, 2011.

SUN, Y. Controlled synthesis of colloidal silver nanoparticles in organic solutions: empirical rules for nucleation engineering. **Chemical Society Reviews**, v.42, n.7, p.2497–2511, 2013.

SUN, Y.; XIA, Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. **Science**, v.298, n.5601, p.2176–2179, 2002.

TOLOCHKO, N.K. History of nanotechnology. In: KHARKIN, V. et al. (Ed.). **Nanoscience and nanotechnologies**. Oxford: EOLSS, 2009. (Encyclopedia of Life Support Systems).

TRAN, Q.H.; NGUYEN, V.Q.; LE, A.T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. **Advances in Natural Sciences: nanoscience and nanotechnology**, v.4, n.3, p.033001, 2013.

TRIPATHY, S.K. Nanophotothermolysis of poly-(vinyl) alcohol capped silver particles. **Nanoscale Research Letters**, v.3, n.4, p.164–167, 2008.

TSUJI, T.; TSUJI, M.; HASHIMOTO, S. Utilization of laser ablation in aqueous solution for observation of photoinduced shape conversion of silver nanoparticles in citrate solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry**, v.221, n.2-3, p.224–231, 2011.

WANG, H. et al. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v.256, n.2-3, p.111–115, 2005.

WEE, T.L. et al. Photochemical synthesis of a water oxidation catalyst based on cobalt nanostructures. **Journal of the American Chemical Society**, v.133, n.42, p.16742–16745, 2011.

WEI, J.C. et al. Enhancing silver nanoparticle and antimicrobial efficacy by the exfoliated clay nanoplatelets. **RSC Advances**, v.3, n.20, p.7392, 2013.

WOJTYSIAK, S.; KUDELSKI, A. Influence of oxygen on the process of formation of silver nanoparticles during citrate/borohydride synthesis of silver sols. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v.410, p.45–51, 2012.

XU, Y.; REN, X.; HANNA, M.A. Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v.99, n.4, p.1684–1691, 2006.

YAGCI, Y.; TASDELEN, M.A.; JOCKUSCH, S. Reduction of Cu(II) by photochemically generated phosphonyl radicals to generate Cu(I) as catalyst for atom transfer radical polymerization and azide-alkyne cycloaddition click reactions. **Polymer**, v.55, n.16, p.3468–3474, 2014.

YANG, S.K.; NAM, J.W.; KIM, Y. Preparation of exfoliated ag-laponite nanocomposites through a freeze-drying of laponite sols. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v.35, n.4, p.1218–1220, 2014.

ZAAROUR, M. et al. Photochemical preparation of silver nanoparticles supported on zeolite crystals. **Langmuir**, v.30, n.21, p.6250–6256, 2014.

ZAHMAKIRAN, M.; OZKAR, S. Metal nanoparticles in liquid phase catalysis; from recent advances to future goals. **Nanoscale**, v.3, n.9, p.3462–3481, 2011.

ZHANG, J.Z.; NOGUEZ, C. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. **Plasmonics**, v.3, n.4, p.127–150, 2008.