UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JULIANA DOS SANTOS GABRIEL

**Bionanocompósitos de derivados de
quitosana/montmorilonita/nanopartículas de prata preparadas
via Fotoquímica**

São Carlos
2017

JULIANA DOS SANTOS GABRIEL

Bionanocompósitos de derivados de
quitosana/montmorilonita/nanopartículas de prata preparadas
via Fotoquímica

Versão Revisada

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro

São Carlos

2017

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Gabriel, Juliana dos Santos
Bionanocompósitos de derivados de
quitosana/montmorilonita/nanopartículas de prata preparadas via Fotoquímica
/ Juliana dos Santos Gabriel. — São Carlos, 2017.
120 f.

Tese (Doutorado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2017.
Edição revisada

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro

1. Nanopartículas. 2. Nanocompósitos. 3. Quitosana. 4. Argila. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

Aos meus pais, João e Jacira, e aos meus irmãos, que sempre me apoiaram, me incentivaram, acreditaram em meu trabalho e me ensinaram a importância da palavra: amor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João e Jacira, que estiveram ao meu lado em todos os momentos até aqui vividos, me apoiando, me aconselhando, me ensinando a ser quem eu sou. A vocês todo meu amor e minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, Gabriela, Alexandre, Karin e Kleber, que com paciência e cumplicidade me ensinam todos os dias que a vida pode ser enxergada e vivida de diferentes formas, sendo a coragem e o respeito elementos importantes nessa jornada.

À Michelle e Amanda, por todo carinho e por todos os momentos de descontração em família.

Ao meu companheiro Airton, pela paciência, cumplicidade e carinho dispensados a mim que, principalmente nos momentos mais difíceis, me fortaleceram e impulsionaram à conclusão desse trabalho.

À Prof. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro, pela confiança e amizade durante esses quatro anos. Obrigada por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos amigos do Grupo de Fotoquímica, especialmente à Virgínia, Rafael, Patrícia, Marco, Anderson, Henrique, Bruno, Mariana e Brenda, que dividiram comigo suas experiências profissionais e de vida, me ouvindo nos momentos difíceis e me fazendo rir nos demais.

Ao Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro e ao Laboratório de Análise Térmica, Eletroanalítica e Química de Soluções, pela amizade e pelo apoio para a realização deste projeto.

À amiga Dra. Alessandra Lima Poli Leves com a qual eu dividi momentos de descontração e de muito trabalho. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e pela paciência.

Às amigas Virgínia, Daniella e Joice que me fizeram sorrir nos momentos mais difíceis, tornando meus dias muito mais alegres e leves durante esses últimos 4 anos.

Aos amigos Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera e Prof. Dr. Marcio José Tiera, que mesmo à distância sempre estiveram presentes de alguma forma durante esse período.

Aos amigos Profa. Dra. Iêda Aparecida Pastre Fertoni e Prof. Dr. Fernando Luís Fertoni pelo carinho e incentivo.

Ao Prof. Dr. Luc Avérous e todos os membros do BioTeam, da École Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux (ECPM), Université de Strasbourg (Estrasburgo, França), que me acolheram durante o doutorado sanduíche e com quem aprendi muito.

Aos queridos amigos Gabriela, Mirelle, Vítor, Hellen, Lívia, Andrea, Danilo e Toni, pelo carinho, companheirismo e amizade de sempre.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro que juntamente com o programa Ciências sem Fronteiras (Processo 200672/2015-0) tornaram a execução deste projeto possível.

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo por oferecer a infraestrutura necessária para execução deste projeto. E a todos os funcionários da USP, que direta ou indiretamente, foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Meu mais sincero obrigada.

“Ninguém nasce odiando outra pessoa pela cor de sua pele, por sua origem ou ainda por sua religião. Para odiar, as pessoas precisam aprender, e se podem aprender a odiar, elas podem ser ensinadas a amar.”

Nelson Mandela

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”

Chico Xavier

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

GABRIEL, Juliana dos Santos. **Bionanocompósitos de derivados de quitosana/montmorilonita/nanopartículas de prata preparados via Fotoquímica**. 2017. 120 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

O presente trabalho apresenta a síntese e a caracterização de derivados de quitosana, bem como o preparo e caracterização de filmes de nanocompósitos à base de quitosana comercial (ou seus derivados), argila (MMT) e nanopartículas de prata (NPs-Ag), obtidas *via* Fotoquímica. Para tanto, foram preparados, a partir da quitosana comercial (QC), os derivados: quitosana desacetilada (Q30des), quitosana purificada (QP), quitosanas parcialmente despolimerizadas (QD30, QD21 e QD5), quitosanas hidrofílicas (QD21-40DEAE e QD5-49DEAE) e quitosanas anfífilas (QD21-40DEAE-6DD, QD21-40DEAE-18DD, QD5-49DEAE-6DD e QD5-49DEAE-17DD). O grau médio de desacetilação das QC, QP e Q30des e de substituição por grupos DEAE e dodecila foram determinados por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H). Ademais, os biopolímeros foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR-ATR), Viscosimetria, Análise Termogravimétrica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Em seguida, foi estudada a síntese de nanopartículas de prata, sob radiação UV, em filmes de nanocompósitos de quitosana comercial ou seus derivados e argila. Em um primeiro momento, estudou-se a formação das NPs-Ag em filmes de QC com diferentes formulações e posteriormente em filmes de derivados de quitosana contendo 10% de MMT (m/m). A técnica de Difração de Raios-X (DRX) foi utilizada para a determinação do espaçamento interlamelar da argila montmorilonita pura e nos compósitos preparados. A síntese das NPs-Ag foi acompanhada por Espectrofotometria de Absorção Molecular no UV-vis, e monitorada após um ano de sua formação, sendo suas características morfológicas, bem como a dispersão da argila nos nanocompósitos examinados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Por fim, a atividade antimicrobiana dos filmes de nanocompósitos foi avaliada pelo método de Disco de Difusão contra as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, quitosana, derivados de quitosana, montmorilonita, filmes de nanocompósitos, irradiação UV, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

GABRIEL, Juliana dos Santos. Bionanocomposites of chitosan derivatives/montmorillonite/silver nanoparticles prepared by Photochemistry. 2017. 120 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

The present work presents the synthesis and characterization of chitosan derivatives, as well as the preparation and characterization of nanocomposite films based on commercial chitosan (or its derivatives), clay (MMT) and silver nanoparticles (NPs-Ag) obtained by photochemical method. Therefore, were prepared from commercial chitosan (QC): deacetylated chitosan (Q30des); purified chitosan (QP); partially depolymerized chitosans (QD30, QD21 and QD5); hydrophilic chitosans (QD21-40DEAE and QD5-QD5) and amphiphilic chitosans (QD21-40DEAE-6DD, QD21-40DEAE-18DD, QD5-49DEAE-6DD and QD5-49DEAE-17DD). The deacetylation degrees of QC, QP and Q30des were determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H -NMR). This technique also used to determine the degrees of substitution by DEAE and dodecyl groups. In addition, the biopolymers were characterized by Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR), Viscosimetry, Thermogravimetry and Scanning Electron Microscopy. Moreover, the NPs-Ag synthesis under UV radiation was studied on nanocomposite films of commercial chitosan or its derivatives and clay. At first, the Ag-NPs formation was studied on QC films with different formulations and secondarily, on films of chitosan derivatives containing 10 wt % of MMT. The X-Ray Diffraction (XRD) was used to determine the interlamellar spacing of pure montmorillonite clay and in the nanocomposites prepared. The synthesis of the NP-Ag was accompanied by UV-vis Spectroscopy. Its morphological characteristics, as well as the clay dispersion in the nanocomposites were examined by Electron Transmission Electron Microscopy (TEM). Finally, the antimicrobial activities of materials were investigated by the disk diffusion method against the bacteria *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Keywords: silver nanoparticles, chitosan, chitosan derivatives, montmorillonite, nanocomposites films, UV irradiation, antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural idealizada de (a) quitosana ($x \geq y$) e quitina ($x < y$) e (b) celulose.	25
Figura 2 – Mecanismo de degradação de macromoléculas de quitosana quando submetidas à radiação UV.	28
Figura 3 – Representação de um (a) tetraedro constituído por um átomo de silício central e quatro átomos de oxigênio nos vértices e (b) octaedro constituído por um átomo de alumínio e seis hidroxilas nos vértices.	29
Figura 4 - Esquema ilustrativo da estrutura lamelar da montmorilonita.	30
Figura 5 - Esquema ilustrativo das diferentes disposições polímero-silicato na formação de compósitos.	33
Figura 6 - Esquema ilustrativo dos métodos de obtenção de nanopartículas metálicas.	34
Figura 7 - Esquema ilustrativo da ressonância plasmônica de superfície para uma nanopartícula metálica esférica.	36
Figura 8 – Esquema das etapas seguidas para a purificação da argila.	42
Figura 9 - Esquema da rota de síntese utilizada para obtenção dos derivados anfífilos de quitosana com diferentes massas molares	46
Figura 10 - Esquema ilustrativo dos compósitos preparados, no qual a cor vermelha indica variação de massa de QC e a cor azul indica variação de massa da MMT.	47
Figura 11 - Espectros de emissão das lâmpadas germicidas de UV, e de absorção da argila MMT e dos filmes de nanocompósitos QC/10%MMT/AgNO ₃ , QD30/10%MMT/AgNO ₃ e QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/AgNO ₃	50
Figura 12 - Mecanismo de reação de desacetilação da quitosana em meio básico.	56
Figura 13 - Espectro de RMN de ¹ H das quitosanas QC, QP e Q30des em D ₂ O/HCl, onde R = -C(O)CH ₃ ou H.	57
Figura 14 - Espectros de FTIR-ATR da quitosana comercial (QC), da quitosana purificada QP e da quitosana desacetilada (Q30des).....	59
Figura 15 - Espectros de FTIR-ATR da quitosana purificada (QP) e das quitosanas parcialmente despolimerizadas QD30, QD21 e QD5.....	59

Figura 16 – Mecanismo de reação de substituição por grupos DEAE.	61
Figura 17 - Mecanismo de reação de alquilação para a síntese dos derivados anfifílicos de quitosana.	62
Figura 18 – Fórmula estrutural idealizada dos derivados anfifílicos de quitosana sintetizados.	63
Figura 19 - Espectros de RMN de ^1H dos derivados de quitosana QD5-49DEAE e QD21-40DEAE em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$	64
Figura 20 - Espectros de FTIR-ATR do DEAE, da quitosana purificada (QP), dos polímeros modificados apenas com grupos DEAE.	65
Figura 21 - Espectros de RMN de ^1H das quitosanas modificadas QD21-40DEAE-6DD e QD21-40DEAE-18DD em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$	67
Figura 22 - Espectros de RMN de ^1H das quitosanas modificadas QD5-49DEAE-6DD e QD5-49DEAE-17DD em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$	68
Figura 23 - Espectros de FTIR-ATR dos polímeros QP, derivado hidrofílico e dos derivados anfifílicos das duas séries distintas de massa molar média (a) QD21 e (b) QD5.	69
Figura 24 - Imagens da superfície da quitosana purificada (QP) nos aumentos de 500 (A) e 5000 (B) vezes, respectivamente.	71
Figura 25 - Imagens da superfície da quitosana QD5-49DEAE nos aumentos de 500 (A) e 5000 (B) vezes, respectivamente.	71
Figura 26 - Imagens da superfície da quitosana QD5-49DEAE-6DD nos aumentos de 500 (A) e 5000 (B) vezes, respectivamente.	72
Figura 27 - Imagens da superfície da quitosana QD5-49DEAE-17DD nos aumentos de 500 (A) e 5000 (B) vezes, respectivamente.	72
Figura 28 – Curvas (a) TG e DTG do polímero QP e (b) TG dos polímeros QP, QD21 e QD5.	74
Figura 29 – Curvas TG e DTG do polímero QD5-49DEAE.	74
Figura 30 – Curvas TG e DTG do polímero QD5-49DEAE-6DD.	75

Figura 31 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC/2,5%MMT*/NPs-Ag, (b) QC/5%MMT/NPs-Ag, (c) QC/10%MMT*/NPs-Ag e (d) QC/NPs-Ag, durante o processo de irradiação.	77
Figura 32 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos QD30/10%MMT/NPs-Ag, Q30des/10%MMT/NPs-Ag e QC/10%MMT/NPs-Ag.....	79
Figura 33 - Esquema do mecanismo de quelação de metais por meio do processo de troca de cátions.	80
Figura 34 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e (b) QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag durante o processo de irradiação.	81
Figura 35 - Difratomogramas das argilas MMT comercial, MMT purificada e do filme de quitosana comercial (QC).....	82
Figura 36 - Difratomogramas dos nanocompósitos preparados com QC (a) variando-se a concentração de QC e (b) variando-se a concentração de MMT.	83
Figura 37 - Difratomogramas dos nanocompósitos QD30/10%MMT/NPs-Ag, Q30des/10%MMT/NPs-Ag, QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag.	84
Figura 38 - Imagens de MET e gráfico de distribuição de tamanho de partículas dos nanocompósitos (a-c) QC*/2,5%MMT/NPs-Ag, (d-f) QC/5%MMT/NPs-Ag e (g-i) QC*/10%MMT/NPs-Ag.....	86
Figura 39 - Imagens de MET e gráfico de distribuição de tamanho de partículas dos nanocompósitos (a-c) QC/2,5%MMT*/NPs-Ag e (d-f) QC/10%MMT*/NPs-Ag.	87
Figura 40 - Imagens de MET e gráfico de distribuição de tamanho de partículas dos nanocompósitos (a-c) QD30/10%MMT/NPs-Ag e (d-f) Q30des/10%MMT/NPs-Ag... ..	88
Figura 41 - Imagens de MET e gráfico de distribuição de tamanho de partículas dos nanocompósitos (a-c) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag, (d-f) QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e (g-i) QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag.	89
Figura 42 - Comparação das zonas de inibição dos filmes (a) QC e (b) QC/10%MMT/NPs-Ag contra <i>B. subtilis</i>	91

Figura 43- Espectros de UV-vis dos filmes de (a) QC, (b) QC/10%MMT/NPs-Ag, (c) QD30/10%MMT/NPs-Ag, (d) Q30des/10%MMT/NPs-Ag e (e) QD21/10%MMT/NPs-Ag, obtidos após o processo de irradiação e depois de um ano de armazenamento.	92
Figura 44 – Espectros de UV-vis do filme de quitosana comercial QC logo após seu preparo e após um ano de armazenamento.	93
Figura 45 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e (b) QD21-40DEAE/NPs-Ag, obtidos após o processo de irradiação e depois de um ano de armazenamento.	94
Figura 46 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC*/2,5%MMT, (b) QC*/2,5%MMT/NPs-Ag e (c) QC*/NPs-Ag durante o processo de irradiação.	112
Figura 47 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC/5%MMT, (b) QC/5%MMT/NPs-Ag e (c) QC/NPs-Ag durante o processo de irradiação.	112
Figura 48 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC*/10%MMT, (b) QC*/10%MMT/NPs-Ag e (c) QC*/NPs-Ag durante o processo de irradiação.	113
Figura 49 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC/2,5%MMT*, (b) QC/2,5%MMT*/NPs-Ag e (c) QC/NPs-Ag durante o processo de irradiação.	113
Figura 50 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC/10%MMT*, (b) QC/10%MMT*/NPs-Ag e (c) QC/NPs-Ag durante o processo de irradiação.	113
Figura 51 - Espectro de UV-vis do nanocompósito QD30/10%MMT/NPs-Ag durante o processo de irradiação.	114
Figura 52 - Espectro de UV-vis do nanocompósito Q30des/10%MMT/NPs-Ag durante o processo de irradiação.	114
Figura 53 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21/10%MMT, (b) QD21/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD21/NPs-Ag durante o processo de irradiação.....	114
Figura 54 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT, (b) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD21-40DEAE/NPs-Ag durante o processo irradiação.	115
Figura 55 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE-6DD/10%MMT, (b) QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD21-40DEAE-6DD/NPs-Ag durante o processo irradiação.	115

Figura 56 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE-18DD/10%MMT, (b) QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD21-40DEAE-18DD/NPs-Ag durante o processo de irradiação.....	115
Figura 57 - Espectro de UV-vis do nanocompósito QD5/10%MMT/NPs-Ag durante o processo de irradiação.	116
Figura 58 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD5-49DEAE/10%MMT, (b) QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD5-49DEAE /NPs-Ag durante o processo de irradiação.	116
Figura 59 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD5-49DEAE-6DD/10%MMT, (b) QD5-49DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD5-49DEAE-6DD /NPs-Ag durante o processo de irradiação.	116
Figura 60 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD5-49DEAE-17DD/10%MMT, (b) QD5-49DEAE-17DD/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD5-49DEAE-17DD/NPs-Ag durante o processo de irradiação.....	117
Figura 61 - Difrátogramas dos filmes de nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag, QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag e (b) QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag, QD5-49DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e QD5-49DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag.....	118
Figura 62 - Imagens de MET dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag, (b) QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag, (c) QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag e (d) QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag durante processo de irradiação.	119
Figura 63- Espectros de UV-vis do filme QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag após 1,5 e 2 horas de irradiação UV e após um ano de armazenamento.....	120
Figura 64- Espectros de UV-vis do filme QD21-40DEAE-6DD/NPs-Ag após 0,75 horas de irradiação UV e após um ano de armazenamento.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.....	40
Tabela 2 - Valores de massa de quitosana e nitrito de sódio, e tempo de reação a 4 °C para obtenção dos derivados parcialmente despolimerizados.	44
Tabela 3 - Descrição da composição dos compósitos preparados.	48
Tabela 4 - Valores de massa molar viscosimétrica média e viscosidade intrínseca para os polímeros QC, QP, Q30des, QD30, QD21 e QD5.....	60
Tabela 5 - Valores do grau de substituição por grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos dos derivados de quitosana.	70
Tabela 6 - Valores de temperatura referente a 30% de perda de massa, porcentagens de massa perdida e porcentagens de massa residual para os polímeros sob atmosfera oxidante.	76
Tabela 7 - Valores de espaçamento interlamelar (d) para os filmes de nanocompósitos estudados.	84
Tabela 8 - Medida da atividade antibacteriana para os filmes de quitosana pelo método de disco de difusão.	90
Tabela 9 - Valores de rendimento de reação para cada síntese realizada.	111

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
d	Espaçamento interlamelar
d_{NP-Ag}	Diâmetro médio das nanopartículas de prata
d_{zi}	Diâmetro médio da zona de inibição
DEAE	cloreto de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietiletilamina
DRX	Difração de Raios-X
DTG	Análise Térmica Diferencial
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FTIR-ATR	<i>Fourier Transform Infrared – Attenuated Total Reflectance</i> (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada)
$\overline{GD}$	Grau Médio de Desacetilação
$\overline{GS}_{DEAE}$	Grau Médio de Substituição por grupos DEAE
$\overline{GS}_{dodecila}$	Grau Médio de Substituição por grupos dodecila
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MMT	Argila montmorilonita SWy-2
$\overline{M}_v$	Massa molar viscosimétrica média
NPs-Ag	Nanopartículas de prata
QC	Quitosana comercial
QP	Quitosana purificada
Q30des	Quitosana desacetilata ($\overline{GD} = 97\%$ e $\overline{M}_v = 34000 \text{ g mol}^{-1}$)
QD30	Quitosana parcialmente despolimerizada de $\overline{M}_v = 29000 \text{ g mol}^{-1}$
QD21	Quitosana parcialmente despolimerizada de $\overline{M}_v = 21000 \text{ g mol}^{-1}$
QD21-40DEAE	Quitosana parcialmente despolimerizada de $\overline{M}_v = 21000 \text{ g mol}^{-1}$ contendo 40% de grupos DEAE
QD21-40DEAE-6DD	Quitosana parcialmente despolimerizada de $\overline{M}_v = 21000 \text{ g mol}^{-1}$ contendo 40% de grupos DEAE e 6% de grupos dodecila

QD21-40DEAE-18DD	Quitosana parcialmente despolimerizada de $\overline{M}_v = 21000 \text{ g mol}^{-1}$ contendo 40% de grupos DEAE e 18% de grupos dodecila
QD5	Quitosana parcialmente despolimerizada de $\overline{M}_v = 5000 \text{ g mol}^{-1}$
QD5-49DEAE	Quitosana parcialmente despolimerizada de $\overline{M}_v = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ contendo 49% de grupos DEAE
QD5-49DEAE-6DD	Quitosana parcialmente despolimerizada de $\overline{M}_v = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ contendo 49% de grupos DEAE e 6% de grupos dodecila
QD5-49DEAE-17DD	Quitosana parcialmente despolimerizada de $\overline{M}_v = 5000 \text{ g mol}^{-1}$ contendo 49% de grupos DEAE e 17% de grupos dodecila
QC/2,5%MMT/NPs-Ag	Filme composto por quitosana comercial, argila montmorilonita SWy-2 (2,5% (m/m)) e nanopartículas de prata
QC/5%MMT/NPs-Ag	Filme composto por quitosana comercial, argila montmorilonita SWy-2 (5% (m/m)) e nanopartículas de prata
QC/10%MMT/NPs-Ag	Filme composto por quitosana comercial, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata
QD30/10%MMT/NPs-Ag	Filme composto por quitosana parcialmente despolimerizada QD30, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata
Q30des/10%MMT/NPs-Ag	Filme composto por quitosana desacetilada Q30des, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata
QD21/10%MMT/NPs-Ag	Filme composto por quitosana parcialmente despolimerizada QD21, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata

QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag Filme composto por derivado hidrofílico de quitosana QD21-40DEAE, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata

QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag Filme composto por derivado anfifílico de quitosana QD21-40DEAE-6DD, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata

QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag Filme composto por derivado anfifílico de quitosana QD21-40DEAE-18DD, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata

QD5/10%MMT/NPs-Ag Filme composto por quitosana parcialmente despolimerizada QD5, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata

QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag Filme composto por derivado hidrofílico de quitosana QD5-49DEAE, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata

QD5-49DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag Filme composto por derivado anfifílico de quitosana QD5-49DEAE-6DD, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata

QD5-49DEAE-17DD/10%MMT/NPs-Ag Filme composto por derivado anfifílico de quitosana QD5-49DEAE-17DD, argila montmorilonita SWy-2 (10% (m/m)) e nanopartículas de prata

RMN de ¹H Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TG Análise Termogravimétrica

UV Ultravioleta

β Razão de aquecimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Quitina e quitosana	23
1.2	Argilas.....	28
1.2.1	Argilominerais	29
1.3	Nanocompósitos poliméricos.....	31
1.4	Nanopartículas de prata	33
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Objetivos Gerais	39
2.2	Objetivos Específicos	39
3	METODOLOGIA	40
3.1	Reagentes	40
3.2	Sínteses	41
3.2.1	Purificação da argila montmorilonita SWy-2	41
3.2.2	Reação de desacetilação da quitosana comercial.....	42
3.2.3	Purificação da quitosana comercial	43
3.2.4	Reação de despolimerização parcial da quitosana	43
3.2.5	Síntese dos derivados hidrofílicos de quitosana	44
3.2.6	Síntese dos derivados anfifílicos de quitosana	45
3.2.7	Bionanocompósitos de quitosana.....	47
3.2.7.1	Preparo dos compósitos quitosana comercial/montmorilonita/nitrato de prata	47
3.2.7.2	Preparo dos filmes de bionanocompósitos contendo quitosana modificada...	49
3.2.8	Preparo das nanopartículas de prata <i>via</i> Fotoquímica.....	49
3.3	Caracterização dos materiais	50
3.3.1	Viscosimetria	50

3.3.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	51
3.3.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	51
3.3.4	Análise Termogravimétrica	52
3.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	53
3.3.6	Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do UV-vis.....	53
3.3.7	Difração de Raios-X	54
3.3.8	Microscopia Eletrônica de Transmissão	54
3.3.9	Estudos microbiológicos.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Caracterização dos derivados de quitosana.....	56
4.1.1	Caracterização dos derivados de diferentes graus de desacetilação e diferentes massas molares	56
4.1.1.1	Determinação do grau médio de desacetilação	57
4.1.1.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	58
4.1.1.3	Determinação da massa molar viscosimétrica média	60
4.1.2	Caracterização dos derivados substituídos de quitosana	61
4.1.2.1	Caracterização dos derivados hidrofílicos de quitosana	63
4.1.2.1.1	Determinação do grau médio de substituição por grupos DEAE	63
4.1.2.1.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	65
4.1.2.2	Caracterização dos derivados anfifílicos	66
4.1.2.2.1	Determinação do grau médio de substituição por grupos dodecila	66
4.1.2.2.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	68
4.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura	70
4.1.4	Caracterização Térmica dos derivados de quitosana	73
4.2	Caracterizações dos Biocompósitos	76
4.2.1	Espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-vis	76
4.2.2	Difração de Raios-X	81

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	85
4.3 Atividade Antibacteriana	89
4.3.1 Método do Disco de Difusão	89
4.4. Avaliação dos filmes após um ano de armazenamento	92
5 CONCLUSÃO	95
DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS	97
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE A	111
APÊNDICE B.....	112
APÊNDICE C.....	118
APÊNDICE D	119
APÊNDICE E.....	120

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, nanopartículas de prata (NPs-Ag) se tornaram alvo de grandes interesses científicos devido as suas diversas propriedades físico-químicas que possibilitam a utilização desse material em inúmeras áreas (ZHANG *et al.*, 2012, ZOYA, 2012; CHERNOUSOVA e EPPLÉ, 2013), como: produtos médicos, produtos de higiene pessoal, detergentes e sensores, tendo como destaque seu elevado potencial como agente antimicrobiano (ZOYA, 2012; CHERNOUSOVA e EPPLÉ, 2013; GOLOVINA e KUSTOV, 2013; THUC *et al.*, 2016).

Há diversos métodos de preparo de NPs-Ag descritos na literatura. Na metodologia comumente utilizada, *via* redução química, a síntese das nanopartículas ocorre por meio da redução de sais solúveis de prata por um agente de redução, como borohidreto de sódio, formaldeído, amônia, dentre outros, em meio aquoso ou utilizando solventes orgânicos (CHERNOUSOVA e EPPLÉ, 2013). Entretanto, a utilização desses agentes redutores pode limitar o uso das NPs-Ag em aplicações biológicas e médicas por exemplo, além de apresentar riscos ao ambiente (EL-NOUR *et al.*, 2010; WOJTYSIAK e KUDELSKI, 2012; EMAM *et al.*, 2016; LOMBARDO *et al.*, 2016).

Em contrapartida, o número de publicações sobre a síntese verde de nanopartículas de prata, por meio de reações em que agentes redutores menos nocivos ao ambiente são utilizados, tem aumentado significativamente. Entre esses processos, são descritos métodos que envolvem o uso de radiação gama, ondas ultrassônicas e radiação UV como rotas alternativas (SHAMELI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2012; SON *et al.*, 2016). Além disso, o preparo de NPs-Ag tem sido realizado em suspensões de argila, nas quais as lamelas do silicato atuam como nanorreatores para a redução dos íons Ag^+ (PATKALVI *et al.*, 2004). Tem sido relatado ainda, o uso de polissacarídeos como amido, dextrose e quitosana como agentes redutores e estabilizantes na formação das nanopartículas de prata (Thomas *et al.*, 2009; JI *et al.*, 2016; OLUWAFEMI *et al.*, 2016).

Dentre os polímeros naturais, a quitosana se destaca devido as suas propriedades filmogênicas, de biodegradabilidade, de baixa toxicidade, de biocompatibilidade, além de apresentar atividade contra algumas espécies de micro-organismos (ARAIZA *et al.*, 2010; EPURE *et al.*, 2011; YOUSSEF *et al.*, 2015; ZIVANOVIC *et al.*, 2015), que permitem o uso desse biopolímero em diversas aplicações, como embalagens de alimentos, substitutos de ossos e pele artificial (SHAMELI *et al.*, 2010).

Com o objetivo de melhorar a estabilidade química e mecânica de materiais preparados à base de quitosana, a adição de argilas naturais tem sido extensivamente empregada (WANG *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2013), formando materiais com características únicas que, se combinadas às propriedades das NPs-Ag, podem resultar em um produto versátil para diferentes finalidades.

Embora tenham sido descritas diversas metodologias para a síntese de nanopartículas de prata nas últimas décadas (SHAMELI *et al.*, 2010; PATRA *et al.*, 2014; AHAMED *et al.*, 2015; KRISHNAN *et al.*, 2015), pouco se sabe sobre a formação de NPs-Ag em filmes de nanocompósitos de quitosana *via* irradiação UV. Dentro desse contexto, o presente trabalho apresenta a síntese e a caracterização de derivados de quitosana de diferentes massas molares, diferentes graus de desacetilação e substituídos por grupos hidrofílico e hidrofóbico, bem como de filmes de bionanocompósitos à base de derivados de quitosana/montmorilonita/NPs-Ag, formadas *via* Fotoquímica, além do estudo da atividade antimicrobiana do material obtido. Vislumbra-se a obtenção de filmes de elevada atividade antimicrobiana, devido principalmente à presença de nanopartículas de prata estáveis, formadas a partir da interação entre os materiais naturais quitosana e argila com o sal de prata, sob radiação UV, que possam ser utilizados pelas diferentes áreas da ciência como uma alternativa viável, eficiente e de menor impacto negativo ao ambiente.

1.1 Quitina e quitosana

A quitina, biomaterial de coloração branca, duro e de cadeia rígida, foi o primeiro polissacarídeo isolado pelo homem. De acordo com Badawy e Rabea (2011), estudos afirmam que o composto “fungina”, chamado mais tarde de quitina, foi isolado pela primeira vez por Braconnot, em 1811, durante uma pesquisa com cogumelos. O nome “quitina”, derivado do grego “chiton”, que significa “túnica” ou “envelope”, surgiu na década de 1830, quando esse composto foi identificado em estruturas de insetos.

Esse biopolímero é sintetizado por diferentes organismos vivos, sendo encontrado em exoesqueletos de artrópodes ou em paredes celulares de fungos e leveduras. Considerando-se a quantidade de quitina produzida anualmente no mundo, esse polissacarídeo é o segundo mais abundantemente encontrado na natureza. No estado nativo, a quitina ocorre como microfibrilas de fase cristalina ordenada com cadeias organizadas em folhas paralelas sendo encontrada nas formas α , β e γ (YOUNES e RINAUDO, 2015). Essas formas, que estão

relacionadas às diferentes funções nos organismos, resultam da disposição das extremidades redutora e não-redutora das cadeias poliméricas e são responsáveis pelas inúmeras propriedades dos domínios cristalinos (CAMPANA-FILHO, 2007).

No ano de 1859, o professor C. Rouget sujeitou a quitina a um tratamento em meio alcalino, resultando em uma substância solúvel em ácidos (SHUKLA *et al.*, 2013), que mais tarde foi denominada “quitosana” por Hoppe-Seiler, referindo-se a forma desacetilada da quitina (BADAWY e RABEA, 2011). A quitosana é considerada o derivado mais importante da quitina em relação a sua aplicabilidade (RINAUDO, 2006).

A ocorrência natural da quitina com um grau de desacetilação reduzido faz com que esse polissacarídeo seja insolúvel na presença da maioria dos solventes, o que limita sua utilização pelas diferentes áreas da ciência. O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) é o parâmetro empregado para definir quantitativamente a presença de monômeros desacetilados na cadeia polimérica (DAMIAN *et al.*, 2005). Ao atingir 50% ou mais de grau médio de desacetilação, o polissacarídeo torna-se solúvel em solução aquosa ácida, sendo denominado quitosana (SILVA *et al.*, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2007; YOUNES e RINAUDO, 2015). Entretanto, a quitosana não é uma substância de cadeia polimérica única, mas sim um nome usual que representa um grupo de polissacarídeos que possuem grau médio de desacetilação igual ou superior a 50%.

Assim, quitosana e quitina são copolímeros constituídos por diferentes proporções de monômeros de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose unidos por ligações O-glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4). Esse tipo de arranjo confere aos polímeros uma estrutura cristalina rígida provinda de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (SHUKLA *et al.*, 2013). As cadeias poliméricas desses dois polissacarídeos são quimicamente similares à da celulose (Figura 1). É a presença de grupos amina ou acetamida no segundo átomo de carbono da cadeia que as diferenciam da celulose, a qual apresenta um grupo hidroxila ligado a esse átomo de carbono (SHUKLA *et al.*, 2013).

Figura 1 – Fórmula estrutural idealizada de (a) quitosana ($x \geq y$) e quitina ($x < y$) e (b) celulose.

Fonte: Autoria própria.

Outra propriedade que diferencia os polímeros quitosana e quitina é a solubilidade, a qual pode ser diretamente relacionada à quantidade de grupos amina presentes em suas estruturas. Quando protonados, esses grupos aumentam a solubilidade do polímero em meio aquoso, devido principalmente, à repulsão eletrostática e ao aumento da solvatação de suas cadeias (MATHUR e NARANG, 1990; SHUKLA *et al.*, 2013).

A quitosana, solúvel em ácidos orgânicos diluídos como ácido acético, láctico, fórmico, cítrico e em ácidos inorgânicos, tem se destacado como um biopolímero catiônico de alta bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, além de apresentar relativa atividade antimicrobiana, o que permite o uso desse polissacarídeo em diversas áreas, tais como: confecção de embalagens, próteses ósseas e pele artificial (SILVA *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2013). Além disso, os grupos funcionais (amina e hidroxila) presentes na estrutura do polissacarídeo possibilitam a modificação química do polímero por meio de ligações a grupos específicos, alterando suas propriedades físico-químicas e aplicabilidade.

Segundo Badawy e colaboradores (2014), em seu estudo sobre o preparo e ação antimicrobiana de derivados quaternários de *N*-(benzil) quitosana, muitos pesquisadores têm

sintetizado uma grande variedade de derivados de quitosana com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana desse polissacarídeo. Dragostin e colaboradores (2016), por exemplo, sintetizaram e caracterizaram novas membranas de derivados de sulfonamida-quitosana para serem utilizadas no tratamento de ferimentos causados por queimaduras, as quais apresentaram maior ação antimicrobiana quando comparado com o polímero antes da modificação. Adicionalmente, Pedro e colaboradores (2013) mostraram que as substituições com grupos pentiltrimetilamônio e propiltrimetilamônio resultaram em maiores índices de inibição contra o fungo *Aspergillus flavus* do que aqueles obtidos pela quitosana.

A quitosana é conhecida também por suas propriedades filmogênicas. Segundo Aider (2010), embora o uso de embalagens plásticas convencionais seja efetivo na preservação de alimentos, os problemas ambientais causados por elas têm atraído a atenção das indústrias para o desenvolvimento de materiais que desempenhem a mesma função, mas que sejam menos agressivos ao ambiente. Filmes antimicrobianos de quitosana são materiais biofuncionais, que podem ser utilizados tanto como curativo para ferimentos e suporte para tecidos, quanto como filmes de revestimento para a preservação da qualidade de produtos alimentícios (GOY *et al.*, 2009). De acordo com Hafsa e colaboradores (2016), além da atividade antimicrobiana, esses filmes podem apresentar uma variedade de vantagens em relação aos materiais sintéticos, como biodegradabilidade, serem comestíveis e biocompatíveis.

Embora o mecanismo exato da ação antimicrobiana da quitosana não tenha sido determinado, três modelos de interação entre polímero e o micro-organismo são aceitos. O modelo de maior aceitação entre os pesquisadores envolve a interação eletrostática entre as cargas positivas da cadeia polimérica ($-NH_3^+$) e as cargas negativas presentes no envoltório celular do micro-organismo alvo que pode resultar em: (i) mudanças de permeabilidade, provocando desequilíbrios osmóticos internos e inibindo o crescimento do micro-organismo; (ii) lise, com consequente perda dos constituintes intracelulares. No segundo modelo proposto, a quitosana seria capaz de ultrapassar o envoltório celular do micro-organismo e interagir com o DNA microbiano, inibindo o RNA mensageiro e a síntese de proteínas pelas células. O terceiro mecanismo envolve a quelação de metais, por meio das quais nutrientes essenciais ao crescimento do micro-organismo ficariam retidos na quitosana (GOY *et al.*, 2009).

A excelente capacidade da quitosana de complexar íons de metais de transição ocorre, principalmente, devido à presença de grupamentos amina na cadeia do polímero, que são

responsáveis por capturar cátions metálicos por quelação (GOY *et al.*, 2009; PETROVA *et al.*, 2014). A flexibilidade da cadeia polimérica permite a formação da configuração necessária para a complexação com o íon metálico (PETROVA *et al.*, 2014).

Assim como outros polímeros, a quitosana também é bastante sensível a diferentes tipos de degradação, como a degradação oxidativa, a hidrolítica, a ultrassônica, a térmica e a fotodegradação (MUCHA e PAWLAK, 2002). De acordo com Sionkowska e colaboradores (2013), quando materiais poliméricos são expostos à radiação ultravioleta (UV), modificações estruturais e nas superfícies de seus filmes podem ser observados como resultados de processos foto-oxidativos. Esse fenômeno é acompanhado pela formação de grupos hidroxila e carbonila em polímeros e biopolímeros irradiados por luz UV (SIONKOWSKA *et al.*, 2013).

De acordo com Mucha e Pawlak (2002), a degradação fotoquímica da quitosana, que pode ser acompanhada por Viscosimetria, Espectroscopia na região do Infravermelho, por Espectrofotometria de Absorção Molecular no UV-vis, dentre outras técnicas, ocorre por meio da quebra da cadeia principal da macromolécula e da destruição dos grupos acetamida, formando radicais, que seriam os responsáveis pelo início da oxidação do polímero.

A Figura 2 apresenta um possível mecanismo de degradação de macromoléculas de quitosana quando submetidas à radiação UV, bem como os possíveis radicais formados durante esse processo.

Figura 2 – Mecanismo de degradação de macromoléculas de quitosana quando submetidas à radiação UV.

Fonte: Adaptado Gabriel e colaboradores (2017) a partir de Mucha e Pawlak (2002).

1.2 Argilas

O termo argila pode ser definido de diferentes formas dependendo da área científica em que é estudada. A definição clássica descreve a argila como um material inorgânico natural, terroso, de fina granulação, que quando umedecido com água em quantidade adequada adquire certa plasticidade (GOMES, 1988).

Quanto à composição química, as argilas são formadas por alumino-silicatos e podem apresentar átomos de ferro e magnésio em suas estruturas. Esses minerais apresentam estruturas cristalinas perfeitas ou quase perfeitas e suas partículas possuem tamanhos iguais ou inferiores a 2 μm , o que resulta em uma grande área superficial disponível para interações com outras moléculas (BATISTA, 2006).

As argilas são constituídas principalmente por minerais, os argilominerais, podendo conter em suas estruturas proporções variadas de outros minerais tais como quartzo, feldspato, mica, hematita, calcita, além de matéria orgânica (GOMES, 1988; VIEIRA *et al.*, 2005).

1.2.1 Argilominerais

Existem diversos tipos de argilominerais (ou filossilicatos). Eles exibem estruturas organizadas em folhas (ou lamelas), as quais são constituídas por tetraedros de silício ou alumínio e oxigênio e por octaedros de alumínio (magnésio ou ferro), oxigênio e hidroxilas (Figura 3) (NEUMANN *et al.*, 2000). Essas folhas combinadas de diferentes maneiras formam as camadas que compõem o argilomineral.

Figura 3 – Representação de um (a) tetraedro constituído por um átomo de silício central e quatro átomos de oxigênio nos vértices e (b) octaedro constituído por um átomo de alumínio, passível de substituição por átomo de ferro ou magnésio, e seis hidroxilas nos vértices.

Fonte: Adaptado de Batista (2006).

A razão entre as folhas tetraédricas e as folhas octaédricas na formação estrutural das camadas da argila permite a classificação desses em famílias, denominadas: a) camadas 1:1 (ou difórmicos) e b) camadas 2:1 (ou trifórmicos) (GOMES, 1988).

Os argilominerais montmorilonitas são classificados como trifórmicos 2:1 e pertencem ao grupo da esmectita. Possuem camadas constituídas por duas folhas tetraédricas envolvendo uma folha octaédrica central (Figura 4). Essas folhas são unidas por oxigênios comuns entre

elas. A fórmula química geral para esse grupo de argilominerais é $(\text{Ca}, \text{Na}, \text{H})(\text{Al}, \text{Mg}, \text{Fe}, \text{Zn})_2(\text{Si}, \text{Al})_4 \text{O}_{10} (\text{OH})_2 n\text{H}_2\text{O}$ (UDDIN, 2008).

Figura 4 - Esquema ilustrativo da estrutura lamelar da montmorilonita.

Fonte: Adaptado de Ray (2003).

A ocorrência de substituições isomórficas (troca de átomos de tamanhos semelhantes) nas folhas tetraédricas de cátions de Si^{4+} por cátions de Al^{3+} ou de cátions de Al^{3+} por Mg^{2+} nas folhas octaédricas, geram cargas negativas que são compensadas pela adsorção de cátions nas superfícies externas das camadas. Esses cátions adsorvidos são chamados de cátions trocáveis, ou seja, podem ser substituídos por outros íons ou moléculas. A medida quantitativa de cátions adsorvidos necessários para neutralizar as cargas negativas das camadas do filossilicato é denominada capacidade de troca catiônica (CTC). A CTC de argilominerais do grupo das esmectitas é 40-150 meq/100 g de filossilicato (GOMES, 1988).

A adsorção de cargas positivas e moléculas de água podem ocorrer nos espaços interlamelares das camadas de argila resultando na expansão do espaçamento basal (d_{001}) para além de seu limite original, processo esse denominado intumescimento (*swelling*) (SANTOS, 1989). Após a adsorção dessas moléculas nos espaços interlamelares, os cátions trocáveis

deixam de balancear as cargas negativas geradas pelas substituições isomórficas, resultando na repulsão mútua das lamelas, carregadas negativamente, e na dispersão da argila em meio aquoso (BATISTA, 2006). Segundo Batista (2006), a dispersão da argila não é completa na maioria das vezes, sendo encontradas em suspensão partículas formadas pela associação de um número de lamelas, denominadas tactóides.

De acordo com Van Olphen (1977), o processo de intumescimento é governado por um equilíbrio de ionização entre os cátions adsorvidos (cátions trocáveis) e as superfícies das partículas de argila em meio aquoso (equação 1).

Uma forte ionização da argila resulta na maior quantidade de partículas com carga negativa em suspensão e, conseqüentemente, maior será a repulsão entre elas. A presença dessas forças repulsivas evita a aglomeração das partículas da argila (floculação ou coagulação). Entretanto, essas partículas também estão sujeitas a forças de natureza atrativa (forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas). Quanto maior a concentração da suspensão, menor será a distância entre as partículas, aumentando assim a intensidade dessas forças, o que favorece o processo de floculação (VAN OLPHEN, 1977).

A extensão do intumescimento é dependente, dentre outros fatores, da força iônica do meio, da natureza do contra-íon, das energias de hidratação envolvidas e da carga da partícula de argila (SANTOS, 1989).

De acordo com Maisanaba e colaboradores (2015), a utilização de filossilicatos por indústrias de processamento tem sido de extrema importância para o desenvolvimento de novos materiais com aplicações agrícolas, na engenharia de construção, na remediação ambiental, na geologia, na confecção de embalagens pela indústria alimentícia, dentre outros.

1.3 Nanocompósitos poliméricos

A nanotecnologia é uma das mais promissoras estratégias para a melhoria das propriedades físicas e químicas de materiais poliméricos. A inserção de nanopartículas na matriz polimérica, formando nanocompósitos, tem atraído grande interesse científico e

industrial devido à atribuição de características de nanopartículas (grande área superficial e superfície reativa) ao material (LIU *et al.*, 2014).

Nanocompósitos, materiais constituídos de pelo menos uma fase contínua (matriz polimérica) e uma fase descontínua (carga ou *filler*) em escala nanométrica, são utilizados facilmente e resultam em produtos com propriedades físico-químicas melhoradas devido à presença das cargas (BORDES *et al.*, 2009; PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2011). Assim, partículas de argila, quando adequadamente dispersas no polímero, resultam em propriedades físicas e químicas únicas, como o aumento de estabilidade térmica, diminuição de permeabilidade a gases e líquidos, melhora das propriedades mecânicas, dentre outros, e fazem desses nanocompósitos uma interessante alternativa para uma variedade de aplicações (RHIM *et al.*, 2006).

De acordo com Maisanaba e colaboradores (2015), a formação bem sucedida de um nanocompósito polímero-argila é dependente da capacidade de modificação da superfície química dos silicatos, bem como da capacidade de dispersão das partículas de argila na matriz polimérica.

Três diferentes disposições polímero-silicato podem ser obtidas na formação de um compósito (Figura 5): (1) compósitos convencionais, nos quais não há a expansão da região interlamelar, indicando a não penetração do polímero entre as lamelas do argilomineral; (2) compósitos intercalados, nos quais há expansão moderada da intercamada da argila; (3) compósitos esfoliados (ou delaminados), nos quais os aglomerados de argila perdem sua identidade em camadas, ou seja, as lamelas da argila se encontram dispersas individualmente na fase contínua do polímero devido à grande afinidade polímero-argila (MAISANABA *et al.*, 2015).

Figura 5 - Esquema ilustrativo das diferentes disposições polímero-silicato na formação de compósitos.

Fonte: Adaptado de Maisanaba e colaboradores (2015) a partir de Arora e colaboradores (2010).

Estudos sobre a formação e caracterização de nanocompósitos de quitosana/argila já vêm sendo desenvolvidos. Xie e colaboradores (2013), por exemplo, prepararam e caracterizaram filmes de nanocompósitos à base de quitosana/montmorilonita/glicerol, concluindo que além de obter um material com propriedades mecânicas melhoradas, a presença da argila no nanocompósito aumentou a biodegradabilidade dos filmes, o que propicia o uso desse material como embalagens biodegradáveis. Zhu e colaboradores (2015) prepararam membranas de nanofiltração de alta eficiência à base de nanocompósitos de quitosana/montmorilonita. Dos Santos *et al.* (2015), estudaram microesferas de quitosana/montmorilonita como sistema sustentável de liberação de fertilizantes.

1.4 Nanopartículas de prata

Nanopartículas (NPs) de metais nobres possuem propriedades eletrônicas, ópticas, mecânicas, magnéticas e químicas únicas (DICK *et al.*, 2002; SEVERIN *et al.*, 2009; KANMANI *et al.*, 2014; THUC *et al.*, 2016) que viabilizam sua utilização em diferentes áreas, como por exemplo: na conversão de energia solar, em catálise, na medicina, na

produção de tintas e *sprays* desinfetantes e no tratamento de água (ZOYA *et al.*, 2012; CHERNOUSOVA e EPPLE, 2013; EMAM *et al.*, 2016; THUC *et al.*, 2016). Porém, as nanopartículas metálicas não são descobertas recentes da história da humanidade. Estudos revelam que objetos antigos, como o cálice de Lycurgus produzidos pelos romanos no século IV d.C. ou como lustres decorativos produzidos na Mesopotâmia no século IX d.C., apresentam interessantes propriedades ópticas devido à presença de nanopartículas de ouro, prata e/ou cobre (HEILIGTAG e NIEDERBERGER, 2013).

Existem diversos métodos físicos e químicos para a obtenção de nanopartículas metálicas descritos na literatura. Desde a primeira síntese documentada de NPs metálicas, realizada por Michael Faraday no século XIX (EDWARDS e THOMAS, 2007), inúmeros métodos vêm sendo desenvolvidos motivados pela busca de uma menor dispersão morfológica, pela obtenção de novas estruturas e/ou utilização de reagentes menos nocivos ao ambiente.

Segundo Toshima e Yonezawa (1998), os métodos físicos consistem no princípio da subdivisão de precursores até a obtenção de nanopartículas, enquanto que os métodos químicos envolvem a redução de íons metálicos para átomos de metal, seguida pela agregação controlada desses átomos (Figura 6).

Figura 6 - Esquema ilustrativo dos métodos de obtenção de nanopartículas metálicas.

Fonte: Adaptado de Toshima e colaboradores (1998).

Atualmente o método mais utilizado para obtenção de nanopartículas metálicas é a redução química, seguida pelo processo de estabilização das mesmas (TRAN *et al.*, 2013). A formação da solução coloidal a partir da redução de sais de metais envolve duas etapas chamadas de nucleação e crescimento (TRAN *et al.*, 2013). A etapa de nucleação ocorre por meio da redução de vários complexos de íons metálicos Me^+ à Me^0 , a qual é seguida pela etapa de crescimento, ocorrendo aglomeração para a formação de *clusters*, que são os responsáveis pela formação de nanopartículas metálicas (EL-NOUR *et al.*, 2010). Entretanto, os agentes redutores e estabilizantes químicos utilizados nesses processos podem ser tóxicos e representam uma classe de risco elevado tanto aos organismos quanto ao ambiente (THOMAS *et al.*, 2009). Assim, o uso de agentes redutores naturais como polissacarídeos (amido, dextrose, glicose, quitosana, dentre outros), micro-organismos (bactérias ou fungos) e extratos de plantas na formação da nanopartícula metálica é cada vez mais usual, embora existam dificuldades em se obter grandes quantidades de nanopartículas com tamanho controlado (THOMAS *et al.*, 2009; THUC, *et al.*, 2016).

Outra metodologia utilizada para a síntese das NPs é a *via* Fotoquímica. Nesse caso, a formação de nanopartículas metálicas pode ocorrer de duas maneiras distintas: (i) por meio da foto-redução direta do metal (sal do metal ou complexo metálico); (ii) pela redução dos íons metálicos por intermediários, como moléculas excitadas ou radicais, formados fotoquimicamente (SAKAMOTO *et al.*, 2009). Segundo Tran e colaboradores (2013), as vantagens da síntese das NPs *via* Fotoquímica são: controle da formação *in situ* dos agentes redutores; a síntese das NPs é iniciada pela foto-irradiação, processo ambientalmente limpo; versatilidade, permitindo a formação de NPs em diferentes meios, tais como: emulsões, micelas e filmes poliméricos.

Muitos estudos sobre a formação fotoquímica de nanopartículas de prata (NPs-Ag) têm sido publicados nos últimos anos. Shameli e colaboradores (2010), por exemplo, estudaram a síntese de bionanocompósitos de prata/montmorilonita/quitosana usando o método de irradiação UV para a formação de NPs-Ag em solução. Segundo esse estudo, o biopolímero quitosana pode ser utilizado como estabilizador polimérico natural e a argila montmorilonita pode ser empregada como suporte sólido para as NPs-Ag. Long *et al.* (2013) desenvolveram um método de síntese de NPs-Ag utilizando carboximetil quitosana e luz solar, o qual produziu nanopartículas estáveis que puderam ser estocadas por mais de seis meses. Rao *et al.* (2010) prepararam NPs-Ag estáveis por meio da irradiação de solução de sal de prata por raios gama, utilizando goma-arábica como agente estabilizador.

As diferentes cores observadas para nanopartículas metálicas são resultados da forte absorção na região do visível do espectro eletromagnético, combinada as características morfológicas (forma e tamanho) das partículas e do meio em que se encontram (HUSSAIN *et al.*, 2011). Essa absorção, denominada banda de ressonância plasmônica de superfície ou banda de absorção plasmônica, ocorre devido à separação de cargas elétricas na partícula como consequência da oscilação coletiva de seus elétrons condutores quando essas nanopartículas são submetidas à radiação eletromagnética (ALI *et al.*, 2014; CARNATTO, 2016). Nanopartículas esféricas de prata menores que 100 nm geralmente exibem a banda de absorção plasmônica na região entre 400 e 450 nm (STAMPLECOSKIE e SCAIANO, 2010).

A Figura 7 apresenta o esquema ilustrativo da oscilação dos elétrons de uma partícula esférica frente a um campo elétrico.

Figura 7 - Esquema ilustrativo da ressonância plasmônica de superfície para uma nanopartícula metálica (NP-Me) esférica.

Fonte: Adaptado de Carniatto (2016) a partir de Zang e Noguez (2008).

Dentre as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de prata (NPs-Ag) têm se destacado devido ao seu potencial como agente antimicrobiano e estão sendo utilizadas em grande escala em materiais biológicos e médicos, como: biossensores, curativos de queimaduras, cateteres, dentre outros (KUMAR-KRISHNAN *et al.*, 2015).

De acordo com Thomas *et al.* (2009), as NPs-Ag interagem com a membrana bacteriana e, por meio da formação de sulcos irregulares que alteram o transporte de substâncias através da membrana, levam à morte celular. Outra possibilidade de ação das NPs-Ag contra micro-organismos seria por meio da oxidação das nanopartículas a íons de prata, na presença de umidade. Esses íons seriam absorvidos para o meio intracelular onde se ligariam ao DNA bacteriano e a grupos específicos de enzimas metabólicas presentes na cadeia transportadora de elétrons, impedindo a replicação do DNA da bactéria e inativando tais enzimas metabólicas (THOMAS *et al.*, 2009).

As nanopartículas de prata apresentam ação antimicrobiana contra uma ampla faixa de micro-organismos, como as bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*; as bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa*; e contra os fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium notatum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (KHAN *et al.*, 2016; RAO *et al.*, 2016).

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*), que pertence à ordem Enterobacteriales e à família Enterobacteriaceae, apresenta forma de bastonete, não produz esporos e é normalmente encontrada no trato intestinal de animais e humanos. Segundo Albertini (2009), essa bactéria coloniza o tubo digestivo do ser humano após algumas horas de seu nascimento. Embora faça parte da microbiota normal do organismo do homem, a *E. coli* pode ser responsável por graves infecções do trato urinário, meningite neonatal, diarreia, entre outras, dependendo da espécie e da quantidade de bactérias presente no organismo hospedeiro (ALBERTINI, 2009).

A bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), pertencente à ordem Bacillales e à família Bacillaceae, também apresenta forma de bastonetes e é comumente encontrada no ambiente, principalmente no solo. Essa espécie é formadora de endosporos, os quais permitem sua sobrevivência em temperaturas extremas bem como ambientes secos. Entretanto, *B. subtilis* não é considerada patogênica ou tóxica (VOSS, 2013). Essas duas espécies de bactérias, *E. coli* e *B. subtilis*, são comumente utilizadas como modelos de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva, respectivamente, em estudos de avaliação da atividade antimicrobiana de materiais (THOMAS *et al.*, 2009; HUSSAIN *et al.*, 2014; LYUTAKOV *et al.*, 2015; THUC, *et al.*, 2016).

Em estudos recentes a atividade antifúngica de derivados anfifílicos de quitosana foi avaliada contra fungos do gênero *Aspergillus* (PEDRO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013;

TAKAKI *et al.*, 2014; GABRIEL *et al.*, 2015). Nesses estudos foi verificado o aumento da atividade contra esses micro-organismos com o aumento do conteúdo hidrofóbico no polímero. Gabriel e colaboradores (2015), por exemplo, observaram a ação fungicida de derivados de quitosana substituídos com grupos dietilaminoetila (DEAE) e dodecila contra os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*. Além disso, a utilização de polímeros que possuam um significativo número de átomos de nitrogênio e oxigênio, como é o caso do derivado de quitosana-DEAE, como matriz polimérica, possibilita o aumento da interação do polímero com íons metálicos e nos faz vislumbrar a possibilidade da síntese de nanopartículas de prata pequenas e estáveis *via* irradiação UV. Assim, o presente trabalho propõe o estudo da formação de nanopartículas de prata em filmes de nanocompósitos de quitosana (e derivados de quitosana)/montmorilonita e sua caracterização, como estudos iniciais para o desenvolvimento de materiais que, dentre outras propriedades, apresentem expressiva atividade antimicrobiana e que possam ser utilizados por diferentes áreas da ciência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivos a síntese e caracterização de diferentes derivados de quitosana, bem como o preparo, a caracterização e o estudo da atividade antimicrobiana de filmes de nanocompósitos de quitosana (ou seus derivados)/montmorilonita/nanopartículas de prata formadas *via* Fotoquímica.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar derivados de quitosana com diferentes graus de desacetilação, diferentes massas molares viscosimétricas médias, bem como derivados hidrofílicos e anfifílicos de quitosana com proporções variadas de grupos hidrofóbicos;
- Preparar e caracterizar filmes de nanocompósitos de quitosana comercial/montmorilonita/nitrato de prata para a determinação da melhor condição de obtenção de nanopartículas de prata *via* Fotoquímica;
- Preparar e caracterizar filmes de nanocompósitos de derivados de quitosana/montmorilonita/nanopartículas de prata formadas *via* Fotoquímica, a partir da melhor condição estabelecida para os filmes a base de quitosana comercial;
- Estudar a atividade antimicrobiana dos filmes obtidos contra as bactérias *E. coli* e *B. subtilis*.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na elaboração deste trabalho estão listados na Tabela 1. A água utilizada nos experimentos foi purificada em um Sistema Purificador de água por Osmose Reversa OS10 LZ.

Tabela 1 - Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Reagente	Fabricante
ácido acético glacial	Synth
ácido clorídrico	Quemis
cianoboroidreto de sódio	Aldrich Chemical Co
cloreto de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietetilamina	Aldrich Chemical Co
dodecil aldeído	Aldrich Chemical Co
etanol	Quemis
hidróxido de sódio	Quemis
meios de cultura LB e LB ágar	Aldrich Chemical Co
montmorilonita SWy-2	Source Clays
nitrato de prata	LAB-TEC
nitrito de sódio	Aldrich Chemical Co
óxido de deutério	Aldrich Chemical Co
quitosana comercial de baixa massa molar	Aldrich Chemical Co

3.2 Sínteses

3.2.1 Purificação da argila montmorilonita SWy-2

Para o processo de purificação da montmorilonita SWy-2, dispersaram-se 30,0 g da argila em 1,5 L de água purificada, mantendo a mistura sob agitação mecânica por 2 horas. Em seguida, ainda sob constante agitação, adicionou-se ácido clorídrico $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ajustando o pH da solução para 3,5, para a remoção de carbonatos. Após 20 minutos de agitação, a solução foi centrifugada com velocidade de 10000 rpm, a 25°C , por 30 minutos. Repetiu-se esse procedimento duas vezes, para a remoção de sais solúveis. Após a segunda repetição, o precipitado obtido foi ressuspensionado em 1,5 L de água purificada, sob agitação constante, e ajustou-se o pH da solução para 8,0, adicionando-se hidróxido de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi deixada em repouso por 12 horas. Em seguida, separou-se o sobrenadante por sifonação, armazenando-o em um béquer de 4,0 L. O precipitado foi ressuspensionado e novamente o pH da solução foi ajustado para 8,0 com adição de solução de hidróxido de sódio. Esse passo foi repetido até que o sobrenadante obtivesse coloração clara, sendo, então, o corpo de fundo descartado. Ao sobrenadante sifonado, foi adicionado solução de ácido clorídrico ajustando o pH da solução para 3,5. Após, adicionou-se solução saturada de cloreto de sódio, para a obtenção da forma iônica Na-MMT e a solução foi deixada em repouso para a floculação da argila. Após a completa floculação da argila, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dialisado, utilizando-se membrana para diálise de celulose Aldrich Chemical Co de tamanho de poro de 12 kDa, em água purificada até teste negativo para íons cloreto com nitrato de prata $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Ao final, o produto foi liofilizado (CAVALHEIRO, 1995).

O esquema das etapas seguidas para a purificação da argila é apresentado na Figura 8.

Figura 8 – Esquema das etapas seguidas para a purificação da argila.

Fonte: Autoria própria.

3.2.2 Reação de desacetilação da quitosana comercial

O processo de desacetilação da quitosana comercial (QC) foi realizado de acordo com o descrito por Tiera e colaboradores (2006). A massa de 8,0 g do polímero foi dispersa em 300,0 mL de água destilada, sob agitação magnética. Em seguida, adicionaram-se 8,0 mL de ácido acético glacial para a solubilização da quitosana. Após a completa solubilização do polissacarídeo, 100,0 mL de hidróxido de sódio (50% em massa) foram vertidos na solução, sob constante agitação, em atmosfera de nitrogênio e sob aquecimento à aproximadamente

100 °C. A reação foi interrompida após 1 hora e 30 minutos e a suspensão foi transferida para um bquer contendo 4,0 L de água purificada a 70 °C e sob agitação constante. Após sua precipitação, o produto obtido foi lavado com água destilada até pH aproximadamente 7 da água de lavagem e isolado por filtração à vácuo e seco em estufa com circulação de ar a 40 °C por 72 horas. Triturou-se o polímero, utilizando um pistilo e almofariz, até a obtenção de pó. A amostra de quitosana desacetilada foi denominada Q30des.

3.2.3 Purificação da quitosana comercial

Para o processo de purificação da quitosana comercial, fez-se uma adaptação do procedimento descrito por Signini e Campana-Filho (1998). A massa de 10,0 g da quitosana foi solubilizada em 3,0 L de ácido acético 3% (v/v) sob agitação mecânica. Após a completa solubilização, a solução foi filtrada em funil de placa sinterizada e precipitada com solução de hidróxido de sódio concentrada. O precipitado foi decantado, lavado com água purificada até pH aproximadamente 8,0 e foi isolado por centrifugação a 15000 rpm por 15 minutos. Em seguida a quitosana foi seca em estufa a 40 °C por 72 horas. Esse procedimento de purificação foi executado duas vezes para a obtenção de aproximadamente 20,0 g de quitosana purificada. O polímero obtido, denominado QP, foi triturado, utilizando-se pistilo e almofariz, até a obtenção de pó.

3.2.4. Reação de despolimerização parcial da quitosana

As reações de despolimerização das quitosanas comercial (QC) e purificada (QP) foram realizadas de acordo com o procedimento descrito por Tommeraas *et al.* (2001), por oxidação com nitrito de sódio em meio ácido. O procedimento a seguir descreve a síntese do polímero com massa molar viscosimétrica média de 5000 g mol⁻¹.

A massa de 8,0 g da quitosana QP foi dispersa em 450,0 mL de solução de ácido acético 2% (v/v) sob agitação magnética. Após a completa solubilização do polímero, a solução foi purgada com gás nitrogênio por 1 hora e resfriada a 4 °C. Em seguida, 15,0 mL de uma solução contendo 0,18 g de nitrito de sódio foram adicionados à solução do polímero sob agitação. A agitação foi interrompida e a reação foi mantida a 4 °C, na ausência de luz, por 15 horas. Os derivados parcialmente despolimerizados foram precipitados com hidróxido de

sódio concentrado, lavados com água destilada até pH aproximadamente 8,0, isolados por centrifugação a 15000 rpm por 15 minutos, secos em estufa a 40 °C e triturados utilizando-se pistilo e almofariz até obtenção de pó.

A Tabela 2 apresenta a massa de polímero, a massa de nitrito de sódio e o tempo de reação a 4 °C para a obtenção dos derivados parcialmente despolimerizados QD30, QD21 e QD5.

Tabela 2 - Valores de massa de quitosana e nitrito de sódio, e tempo de reação a 4 °C para obtenção dos derivados parcialmente despolimerizados.

Derivados	Massa de polímero (g)	Massa de nitrito de sódio (g)	Tempo de reação a 4 °C (h)
QD30	4,00	0,03	5
QD21	8,00	0,04	5
QD5	8,00	0,18	15

3.2.5 Síntese dos derivados hidrofílicos de quitosana

As quitosanas purificadas de diferentes massas molares QD21 e QD5 foram colocadas para reagir com cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietilaminoetila (DEAE) para a obtenção de derivados hidrofílicos de quitosana de acordo com o método descrito por Gabriel e colaboradores (2015). As sínteses dos derivados contendo 40 e 49% de grupos DEAE são descritas a seguir. As massas de 7,0 g das quitosanas QD21 e QD5 foram dispersas em 292,0 mL de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, foram adicionados 4,4 g de DEAE a cada solução de quitosana e o pH foi ajustado para aproximadamente 8,0 com adição de solução de hidróxido de sódio 2,0 mol L⁻¹. As reações ocorreram sob agitação magnética constante, a 65 °C, por 2 horas, sendo o pH das soluções ajustado para aproximadamente 8,0 a cada 30 minutos. Os produtos obtidos foram purificados por diálise contra hidróxido de sódio 0,05 mol L⁻¹, por 24 horas, e contra água purificada por 3 dias utilizando-se membrana para diálise de celulose Aldrich Chemical Co com poros de 12 kDa. Os produtos, denominados QD21-40DEAE e QD5-49DEAE, foram então liofilizados.

3.2.6 Síntese dos derivados anfifílicos de quitosana

As reações de alquilação foram realizadas de acordo com o procedimento descrito por Gabriel e colaboradores (2015). Para a obtenção do polímero anfifílico contendo 17% de grupos dodecila, a massa de 2,7 g de quitosana hidrofílica QD5-49DEAE foi solubilizada em 310,0 mL de ácido acético 2% (v/v). Após a completa solubilização do polímero, 213,0 mL de etanol foram adicionados à solução e o pH da solução foi ajustado para aproximadamente 5,0. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de dodecil aldeído, sob agitação vigorosa. Após 1 hora, sob agitação constante, adicionou-se cianoborohidreto de sódio na razão 3:1 ($\text{NaCNBH}_3:\text{NH}_2$ em mols). A mistura foi mantida sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. A purificação dos derivados alquilados foi feita por meio de diálise contra água purificada até que o teste com nitrato de prata feito com a água de diálise fosse negativo para cloreto, ou seja, não houvesse mudança da coloração da água. Então, o produto foi liofilizado.

A Figura 9 apresenta um esquema ilustrativo que indica as reações e os polímeros iniciais e finais de cada processo realizado.

Figura 9 - Esquema da rota de síntese utilizada para obtenção dos derivados anfífilos de quitosana com diferentes massas molares. As setas indicam as etapas da rota sintética com os derivados colocados entre parênteses.

Fonte: Autoria própria.

3.2.7 Bionanocompósitos de quitosana

3.2.7.1 Preparo dos compósitos quitosana comercial/ montmorilonita/ nitrato de prata

Os filmes de nanocompósitos a base de quitosana comercial, montmorilonita SWy-2 e nitrato de prata (QC/MMT/AgNO₃) foram preparados com formulações diferentes, variando-se apenas a massa de quitosana (mantendo-se fixa a massa de argila) ou variando-se apenas a massa de argila (mantendo-se a massa de quitosana fixa) de forma que os filmes tivessem as proporções de 10, 5 e 2,5% de argila (m/m) aproximadamente, como o ilustrado na Figura 10. Essa metodologia foi utilizada com o objetivo de estudar os efeitos das concentrações de quitosana e da argila separadamente sobre a formação das nanopartículas de prata.

Figura 10 - Esquema ilustrativo dos compósitos preparados, no qual a cor vermelha indica variação de massa de QC e a cor azul indica variação de massa da MMT.

Fonte: Autoria própria.

O procedimento a seguir descreve o preparo do filme contendo 5% de MMT (m/m). A massa de 0,01 g de MMT foi dispersada em 15,0 mL de solução de ácido acético 0,25 mol L⁻¹ e o sistema foi mantido sob agitação magnética constante por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, 0,2 g de quitosana comercial foram dispersos na suspensão de argila e 1,0 mL de solução de nitrato de prata 0,05 mol L⁻¹ foram adicionados à mistura. O sistema permaneceu sob constante agitação magnética por mais 24 horas. Em seguida, a solução QC/MMT/AgNO₃ foi vertida sobre placa de Petri de poliestireno de dimensões 60 mm x 15 mm e levada à estufa com circulação de ar, a 30 °C, onde permaneceu até que o filme estivesse seco.

Para cada filme de compósito QC/MMT/AgNO₃ também foram preparados dois filmes denominados filmes de referência. O primeiro refere-se ao compósito QC/MMT e o segundo ao filme de QC/AgNO₃, os quais são compostos pelas mesmas proporções de quitosana e argila ou quitosana e nitrato de prata que o filme de QC/MMT/AgNO₃.

A Tabela 3 apresenta todos os compósitos QC/MMT/AgNO₃ preparados e suas respectivas composições.

Tabela 3 - Descrição da composição dos nanocompósitos a base de QC preparados.

	Filmes de nanocompósitos	QC (g)	MMT (g)	AgNO ₃ (g)
Variação de QC	QC*/2,5%MMT/AgNO ₃	0,4	0,01	0,009
	QC/5%MMT/AgNO ₃ **	0,2	0,01	0,009
	QC*/10%MMT/AgNO ₃	0,1	0,01	0,009
Variação de MMT	QC/10%MMT*/AgNO ₃	0,2	0,02	0,009
	QC/5%MMT/AgNO ₃ **	0,2	0,01	0,009
	QC/2,5%MMT*/AgNO ₃	0,2	0,005	0,009

*Indica o componente de concentração variante.

**Trata-se de um único filme QC/5%MMT/AgNO₃.

3.2.7.2 Preparo dos filmes de bionanocompósitos contendo quitosana modificada

Os filmes de compósitos a base de derivados de quitosana, montmorilonita SWy-2 e nitrato de prata foram preparados segundo descrito no item 3.2.7.1, com 0,2 g de polímero, de forma que os filmes tivessem 10% de MMT (m/m) em relação a massa do polímero. Para cada filme de compósito polímero/MMT/AgNO₃ também foram preparados seus dois filmes referências (polímero/MMT e polímero/AgNO₃).

3.2.8 Preparo das nanopartículas de prata *via* Fotoquímica

Os filmes preparados nos itens 3.2.7.1 e 3.2.7.2 foram expostos à radiação UV em uma câmara de irradiação contínua TECNAL TE-383, com 16 lâmpadas germicidas de UV com emissão em 254 nm de 6 W cada, totalizando 96 W e potência de 18 603 mW/m². A irradiação foi realizada a temperatura constante de 25 °C por um período máximo de 24 horas, com pausas de aproximadamente 12 horas (*overnight*) após 6, 12 e 18 horas de irradiação.

Os espectros de emissão das lâmpadas, de absorção da argila e de alguns filmes de nanocompósitos são apresentados na Figura 11. Karickhoff e Bailey (1973) atribuíram a banda de absorção da MMT (em 241 nm) à transferência de carga do Fe³⁺ presente nas lamelas da montmorilonita.

Figura 11 - Espectros de emissão das lâmpadas germicidas de UV, e de absorção da argila MMT e dos filmes de nanocompósitos QC/10%MMT/AgNO₃, QD30/10%MMT/AgNO₃ e QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/AgNO₃.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

3.3 Caracterização dos materiais

3.3.1 Viscosimetria

Uma das propriedades mais importantes de soluções poliméricas diluídas é a viscosidade intrínseca $[\eta]$, que é relacionada ao tamanho da macromolécula e, portanto, à sua massa molar. Essa propriedade é frequentemente usada no controle da qualidade e caracterização molecular (KASAAI, 2007).

As massas molares viscosimétricas médias das quitosanas QC, QP, Q30des, QD30, QD21 e QD5 foram determinadas por viscosimetria. Os valores de massa molar viscosimétrica média dos biopolímeros foram obtidos pela equação de Mark-Houwink-Sakurada (equação 2), utilizando os parâmetros $K = 0,074 \text{ mL g}^{-1}$ e $\alpha = 0,76$ para todos os

polímeros com exceção do Q30des, para o qual foram utilizados $K = 0,079 \text{ mL g}^{-1}$ e $\alpha = 0,796$ (KASAAI, 2007).

$$[\eta] = K_m \overline{M}_v^\alpha \quad (2)$$

Na qual, K_m e α são constantes tabeladas dependentes da temperatura, do tipo de polímero e do solvente utilizado e $\overline{M}_v$ é a massa molar viscosimétrica média.

Para as análises utilizou-se um Viscosímetro Automático Anton Paar modelo Lovis 2000 MCom (capilar de vidro de 1,59 mm de diâmetro e esfera de ouro) e solução tamponante ácido acético/acetato de sódio ($0,3 \text{ mol L}^{-1}/0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 4,5) como solvente.

3.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

De maneira geral, a técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) é um tipo de espectrometria de absorção, em que sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em uma frequência determinada pelas características estruturais da amostra. Assim, um espectro de RMN de ^1H é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção de núcleos de átomos de hidrogênio contra suas intensidades (SOLOMONS e FRYHLE, 2001).

As amostras para as análises de RMN de ^1H foram preparadas pela solubilização de aproximadamente 10,0 mg dos polímeros em 1,0 mL de óxido de deutério com adição de 10,0 μL de ácido clorídrico. A solução foi mantida sob agitação magnética constante até a completa solubilização da amostra. Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos no Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, da marca Agilent Technologies modelo 500/54 Premium Shielded à temperatura de 70°C , da Central de Análises Químicas (CAQI), Instituto de Química de São Carlos – USP.

3.3.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A técnica de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é utilizada para determinar os grupos funcionais presentes em um determinado composto. Por

meio dessa técnica, detectam-se as vibrações das ligações covalentes que são decorrentes da absorção de energia quando o composto é exposto a uma radiação na região do infravermelho. A Transformada de Fourier, de modo geral, corresponde ao cálculo matemático utilizado pelo equipamento para conversão do sinal detectado para um sinal de fácil interpretação, enquanto que ATR (Refletância Total Atenuada) corresponde a um acessório que permite a análise qualitativa de sólidos (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Amostras sólidas dos polímeros estudados foram caracterizadas por FTIR-ATR, com diamante como elemento interno de reflexão. Para tanto, aproximadamente 1,5 mg das amostras foram secas em estufa, a 60 °C, até obtenção de massa constante. Os espectros no infravermelho foram obtidos no Espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer modelo Frontier, do Laboratório de Fotoquímica, Instituto de Química de São Carlos – USP.

3.3.4 Análise Termogravimétrica

A Análise Termogravimétrica (TG) é uma técnica termoanalítica que acompanha a variação de massa da amostra em função do tempo ou da temperatura (DENARI e CAVALHEIRO, 2012). As curvas TG têm informações específicas que acabam se tornando a impressão digital do objeto de estudo. A Termogravimetria Derivada (DTG) se utiliza de um arranjo matemático para registrar a derivada da variação de massa em relação ao tempo. Essas duas técnicas são amplamente empregadas no estudo do comportamento de amostras (decomposição, desidratação e/ou oxidação) sob condições específicas, por meio do monitoramento de sua massa (DENARI e CAVALHEIRO, 2012). A área dos picos apresentados nas curvas DTG demonstra a perda de massa evidenciada na TG (WENDLANT, 1986).

As curvas termogravimétricas e de análise térmica diferencial foram obtidas utilizando-se o equipamento SDT Q600 da TA Instruments, em atmosfera oxidante, do Laboratório de Análise Térmica, Eletroanalítica e Química de Soluções, Instituto de Química de São Carlos – USP. As análises foram realizadas usando cadinho para a amostra e cadinho de referência, ambos de α -alumina. Empregou-se massa inicial de aproximadamente 3,0 mg em todas as análises. As condições de trabalho adotadas foram ar sintético, com vazão igual a 90,0 mL min⁻¹ e intervalo de temperatura de 20 a 1000 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é utilizada para revelar as características topográficas de uma superfície com grande riqueza de detalhes. O microscópio eletrônico de varredura é constituído por um sistema gerador de elétrons (canhão eletrônico) que varre a superfície da amostra; um local para o depósito da amostra devidamente preparada, que permitirá o sinal que dará origem à imagem; um sistema de detecção, responsável pela coleta e amplificação do sinal, que geralmente é originário de elétrons secundários e/ou de elétrons retroespalhados, após a interação entre o feixe eletrônico e a amostra, e por um sistema com monitor de vídeo para compor a imagem final (DEDAVID, 2007).

No presente trabalho, a técnica de MEV foi utilizada para a investigação da morfologia das superfícies dos polímeros sintetizados. As análises foram feitas no microscópio eletrônico de varredura LEO (modelo 440), operando com faixa de elétrons de 20 kV de tensão, corrente de 2,85 pA, e detector de elétrons secundários, da Central de Análises Químicas (CAQI), Instituto de Química de São Carlos – USP. As amostras foram previamente recobertas em ouro (10 nm) em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020.

3.3.6 Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do UV-vis

A Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do UV-vis é amplamente utilizada em análises quantitativas que envolvem a absorção da radiação ultravioleta e visível por moléculas. Entretanto, a identificação de muitas espécies orgânicas, inorgânicas e bioquímicas pode ser feita por meio dessa técnica. A absorção de energia pela molécula é dependente de sua estrutura eletrônica, sendo que a energia absorvida é quantizada, resultando em um espectro de uma banda larga (SKOOG *et al.*, 2010). Além disso, a Espectrofotometria de Absorção Molecular no UV-vis é comumente empregada para monitorar a formação de nanopartículas metálicas, por meio da exibição da banda de absorção plasmônica.

Os filmes de nanocompósitos foram caracterizados antes do início da irradiação, após cada intervalo de tempo pré-determinado e depois de um ano de armazenamento em temperatura ambiente e na ausência de luz. A formação das NPs-Ag foi acompanhada pela

transmitância dos filmes no espectrofotômetro UV-vis, Shimadzu-UV-2550, utilizando um acessório de esfera integradora (ISR-240A), do Laboratório de Fotoquímica, Instituto de Química de São Carlos – USP. A varredura dos espectros foi feita de 200 a 700 nm com intervalo de 1 nm.

3.3.7 Difração de Raios-X

A Difractometria de Raios-X (DRX) corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos e semicristalinos, na qual os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada amostra (RODRIGUES, 2012).

A técnica de Difração de Raios-X foi utilizada para a determinação do espaçamento interlamelar da argila montmorilonita SWy-2 (MMT) pura e nos compósitos.

Os estudos foram feitos utilizando o difratômetro Rigaku Rotaflex modelo - RU 200B (radiação de cobre, $\lambda = 0,154 \text{ nm}$) em 50 kV e 100 mA, do Laboratório Multiusuário de Cristalografia Estrutural, Instituto de Física de São Carlos – USP.

A distância entre as lamelas da argila foi calculada utilizando o plano de reflexão 001, por meio da equação de Bragg (equação 3).

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (3)$$

Na qual, n é a ordem de difração, λ é o comprimento de onda da radiação incidente ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), θ é o ângulo de difração e d corresponde ao espaço interlamelar.

3.3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

O microscópio eletrônico de transmissão foi desenvolvido pelos cientistas Max Knoll e Ernest Ruska em 1931. Nesse equipamento, um feixe de elétrons acelerado por alta tensão atravessa e interage com uma amostra transparente. Em linhas gerais, um microscópio eletrônico de transmissão é composto por uma fonte de radiação (canhão de elétrons ou fonte

de elétrons de alta energia); por um sistema de lentes; por dispositivos para visualização e registro das imagens; por um sistema de vácuo e por fontes de tensão (MANNHEIMER, 2002).

A técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizada para a caracterização morfológica, bem como para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas de prata formadas com o processo de irradiação UV. As amostras dos filmes contendo as NPs-Ag foram previamente cortadas utilizando Reichet Ultracut S. (LEICA) a temperatura de -60 °C, velocidade de 0,6 mm/s e espessura de 65 nm, e colocadas em grade de cobre revestida com carbono (CF-200 Cu, Electron Microscopy Sciences).

As imagens foram obtidas no equipamento FEI TECNAI G² F20 HRTEM equipado com um espectrômetro de energia dispersa de raio-X (EDS) operando a 200 kV no modo STEM (do inglês, *Scanning Transmission Electron Microscopy*), pertencente ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/DEMa/UFSCar).

3.3.9 Estudos microbiológicos

A atividade antimicrobiana dos filmes estudados foi testada contra as bactérias não patogênicas *E. coli* (DSM 5451-0599-001) e *B. subtilis* (DSM 1970-0110-001) pelo método de Disco de Difusão, que permite a análise qualitativa da atividade antimicrobiana das amostras testadas. Esses estudos foram realizados na *École Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux (ECPM), Université de Strasbourg, França*.

Para esse teste, 1,0 mL de suspensão bacteriana estoque foi incubado em 10,0 mL de meio de cultura líquido LB a 37 °C, com agitação de 200 rpm, por 18 horas (pré-cultura). Em seguida, os filmes de nanocompósitos foram cortados em discos de 6,0 mm de diâmetro e colocados sobre LB ágar previamente inoculado com 100,0 µL de pré-cultura (10^7 UFC mL⁻¹) em placa de Petri. Essas placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Após as 24 horas de incubação, as zonas de inibição formadas ao redor dos discos dos filmes foram medidas utilizando régua (TAN *et al.*, 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos derivados de quitosana

4.1.1 Caracterização dos derivados de diferentes graus de desacetilação e diferentes massas molares

A Figura 12 apresenta o mecanismo de reação de desacetilação da quitosana em meio alcalino. Nessa reação, a eliminação do ácido carboxílico ocorre por meio da adição nucleofílica de OH^- para o grupo carbonila na amida, seguida pela desprotonação do grupo $-\text{OH}$, resultando na obtenção de quitosana com um maior número de unidades desacetiladas.

Figura 12 - Mecanismo de reação de desacetilação da quitosana em meio básico.

Fonte: Adaptado de Gabriel (2013).

O espectro de RMN de ^1H da quitosana desacetilada Q30des é apresentado no item 4.1.1.1.

4.1.1.1 Determinação do grau médio de desacetilação

A Figura 13 apresenta os espectros de RMN de ^1H das quitosanas comercial (QC), purificada (QP) e desacetilada (Q30des). Os sinais dos hidrogênios anoméricos dos monômeros desacetilados e acetilados aparecem na região de 5,4 ppm. A região entre 4,2 e 4,5 ppm apresenta sinais correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6 da unidade monomérica e o sinal localizado em 3,5 ppm corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel. Os hidrogênios pertencentes aos grupos acetamido exibem sinal na região de 2,3 ppm. Com a integração dos picos presentes em 5,4 ppm e 2,3 ppm e a utilização da equação 4 foi possível determinar o grau médio de desacetilação das quitosanas QC, QP e Q30des.

$$\overline{GD} = \left(1 - \frac{A_{H3}}{3A_{H1}}\right) \times 100 \quad (4)$$

Figura 13 - Espectro de RMN de ^1H das quitosanas QC, QP e Q30des em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$, onde $\text{R} = -\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ou H .

O sinal intenso observado na região de 4,7 ppm no espectro da quitosana QP e de baixa intensidade no espectro das quitosanas QC e Q30des é resultado dos sinais

produzidos pelos hidrogênios existentes nas moléculas de água, pico esse que foi suprimido nos espectros dos polímeros QC e Q30des.

O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) calculado para as quitosanas foi de 85% para os polímeros QC e QP e 97% para Q30des. A técnica de RMN de ^1H se mostrou adequada para a determinação do $\overline{GD}$. A reação de desacetilação da quitosana QC se mostrou satisfatória, visto que foi obtida quitosana com $\overline{GD}$ superior a 95%.

4.1.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

As Figuras 14 e 15 apresentam os espectros de FTIR-ATR da quitosana comercial (QC), da quitosana purificada (QP), da quitosana desacetilada (Q30des) e das quitosanas parcialmente despolimerizadas QD30, QD21 e QD5. As bandas presentes na região de 3359 cm^{-1} são bandas características resultantes das vibrações de estiramento axial dos grupamentos hidroxilas existentes nos polímeros que se encontram sobrepostas ao estiramento das ligações N-H. As bandas observadas na região de 2870 cm^{-1} são resultantes das vibrações de estiramento das ligações -C-H (DOS SANTOS *et al.*, 2003).

O espectro de infravermelho da QC exibe uma banda característica na região de 1660 cm^{-1} correspondente à vibração de estiramento das ligações do grupo carbonila dos substituintes acetamida (amida I), banda essa que pode ser utilizada na diferenciação entre as quitosanas QC e Q30des, uma vez que a menor quantidade de grupos acetamida no polímero de maior grau de desacetilação (Q30des) resulta na menor amplitude dessa banda (DOS SANTOS *et al.*, 2003).

Nos espectros pode-se observar ainda, bandas na região de 1580 cm^{-1} , correspondentes às deformações angulares das ligações -NH dos grupos amina presentes nas unidades de glicosamina (MITRA *et al.*, 2013); banda em 1425 cm^{-1} , referente a deformação axial da ligação -C-N do grupo amida; bandas na região de 1383 cm^{-1} , que indicam as vibrações de deformações angulares das ligações do -C-N de amina; banda na região de 1326 cm^{-1} , referente deformação axial da ligação -C-N do grupo amida III; e banda na região de 1157 cm^{-1} , correspondente ao estiramentos anti-simétrico de C-O-C de unidades glicosamina, além de bandas referentes às ligações de estruturas polissacarídicas na região de $890\text{--}1154\text{ cm}^{-1}$ (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001; GABRIEL *et al.*, 2015 e KUMAR-KRISHNAN *et al.*, 2015).

Figura 14 - Espectros de FTIR-ATR da quitosana comercial (QC), da quitosana purificada QP e da quitosana desacetilada (Q30des).

A similaridade entre os espectros de FTIR-ATR dos biopolímeros QC, QP, QD30, QD21 e QD5 (Figura 15) indica que os procedimentos de purificação e de despolimerização parcial do polissacarídeo não alteraram significativamente a estrutura química do mesmo.

Figura 15 - Espectros de FTIR-ATR da quitosana purificada (QP) e das quitosanas parcialmente despolimerizadas QD30, QD21 e QD5.

4.1.1.3 Determinação da massa molar viscosimétrica média

A massa molar média das quitosanas comercial QC, purificada QP, desacetilada (Q30des) e parcialmente despolimerizadas (QD30, QD21 e QD5) foram determinadas por viscosimetria. Os valores de massa molar viscosimétrica média ($\bar{M}_v$) dos biopolímeros foram obtidos pela equação de Mark-Houwink-Sakurada (equação 2).

Com a determinação automática do tempo médio de deslocamento de uma esfera de ouro dentro do capilar de vidro no solvente puro (solução tamponante) e em soluções de quitosana de diferentes concentrações e da viscosidade intrínseca, a massa molar viscosimétrica média pôde ser calculada. A Tabela 4 apresenta a viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica média das quitosanas estudadas.

Tabela 4 - Valores de massa molar viscosimétrica média ($\bar{M}_v$) e viscosidade intrínseca $[\eta]$ para os polímeros QC, QP, Q30des, QD30, QD21 e QD5.

Quitosanas	$\bar{M}_v$ (g mol ⁻¹)	$[\eta]$ (mL g ⁻¹)
QC	88 x10 ³	425
QP	66 x10 ³	340
Q30des	34 x10 ³	321
QD30	29 x10 ³	182
QD21	21 x10 ³	146
QD5	5 x10 ³	48

Diante dos valores determinados, pode-se afirmar que tanto o processo de purificação quanto o procedimento de desacetilação da quitosana resultaram na diminuição da massa molar viscosimétrica média dos polímeros. De acordo com Fiamingo *et al.* (2016), a ocorrência de tal despolimerização pode ser resultado das condições reacionais, como tempo e temperatura de reação, ou concentração de hidróxido de sódio utilizado. É possível concluir ainda que as reações de despolimerização da quitosana utilizando-se nitrito de sódio em meio ácido ocorreu de forma eficiente e três derivados de diferentes massas molares viscosimétricas médias foram obtidos.

4.1.2 Caracterização dos derivados substituídos de quitosana

O mecanismo de substituição por grupos DEAE (Figura 16) ocorre em duas etapas: (I) o nitrogênio do DEAE promove um ataque nucleofílico no carbono 2 ligado ao cloro, realizando uma substituição nucleofílica e formando o íon aziridínio; (II) ocorre o ataque nucleofílico do nitrogênio da quitosana no íon aziridínio (CLAYDEN *et al.*, 2012).

Figura 16 – Mecanismo de reação de substituição por grupos DEAE.

Fonte: Autoria própria.

A segunda etapa, alquilação (Figura 17), consiste em uma reação de adição nucleofílica em que primeiro ocorre a formação da imina (base de Schiff) entre o nitrogênio presente na cadeia da quitosana e o carbono da carboxila do aldeído (DESBRIERES *et al.*, 1996), etapa lenta, seguida da rápida redução da dupla ligação da imina com a formação de uma ligação covalente simples, obtendo-se o derivado alquilado (MCMURRY, 2008).

Figura 17 - Mecanismo de reação de alquilação para a síntese dos derivados anfifílicos de quitosana.

Fonte: Adaptado de Gabriel (2013).

A Figura 18 apresenta a fórmula estrutural plana idealizada dos derivados anfifílicos sintetizados.

Figura 18 – Fórmula estrutural idealizada dos derivados anfifílicos de quitosana sintetizados.

Fonte: Autoria própria.

4.1.2.1 Caracterização dos derivados hidrofílicos de quitosana

4.1.2.1.1 Determinação do grau médio de substituição por grupos DEAE

Os graus médios de substituição por grupamentos DEAE ($\overline{GS}_{DEAE}$) foram determinados por meio da técnica de RMN de ^1H . A Figura 19 apresenta os espectros de RMN de ^1H dos derivados hidrofílicos de quitosana (QD21-40DEAE e QD5-49DEAE). Os $\overline{GS}_{DEAE}$ foram calculados utilizando-se a equação 5 (KIM e CHUN, 1999).

$$\overline{GS}_{DEAE} = \left(\frac{\left(\frac{A_{CH_3}}{6} \right)}{A_{H_1}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Na qual, A_{CH_3} refere-se à área dos hidrogênios dos grupamentos metila presentes na cadeia do DEAE e A_{H_1} refere-se à área correspondente aos hidrogênios anoméricos, de monômeros substituídos e não substituídos, da cadeia polimérica da quitosana.

Na Figura 19 são indicados também os hidrogênios H_1 e os hidrogênios do grupo $-\text{CH}_3$ utilizados para o cálculo de $\overline{GS}_{DEAE}$, além dos hidrogênios $-\text{CH}_2-$ que produzem os sinais observados em 2,9 ppm e 3,1 ppm (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Figura 19 - Espectros de RMN de ^1H dos derivados de quitosana QD5-49DEAE e QD21-40DEAE em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ e fórmula estrutural idealizada dos monômeros contendo DEAE e os hidrogênios H_1 que produzem os sinais utilizados.

O sinal intenso observado na região de 4,7 ppm no espectro do derivado QD21-40DEAE e de baixa intensidade no espectro do derivado QD5-49DEAE é resultado dos sinais produzidos pelos hidrogênios existentes nas moléculas de água, pico esse que foi suprimido no espectro do QD5-49DEAE.

4.1.2.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de FTIR-ATR do DEAE comercial (grau de pureza de 99%), da quitosana purificada (QP) e dos polímeros modificados apenas com grupos DEAE (QD21-40DEAE e QD5-49DEAE) são apresentados na Figura 20. A partir da comparação entre os espectros, é possível observar que os espectros dos derivados hidrofílicos exibem bandas que estão ausentes e/ou menos evidentes nos espectros das QC e QP. Para os derivados QD21-40DEAE e QD5-49DEAE, nota-se a presença de bandas características resultantes das deformações axiais da ligação C-H em aproximadamente 2970 cm^{-1} , além de bandas no intervalo de $1500\text{-}1346\text{ cm}^{-1}$, que correspondem às deformações axiais das ligações C-N contidas na estrutura molecular do DEAE (YOO *et al.*, 2005). Observa-se ainda nos espectros desses derivados uma diminuição de intensidade da banda em 1572 cm^{-1} . Essa banda está relacionada aos grupos amina livres e confirma, portanto, que a reação de substituição ocorreu no nitrogênio do grupo -NH_2 (ZHANG *et al.*, 2014). As demais bandas são características do espectro da quitosana e já foram apresentadas no item 4.1.1.2.

Figura 20 - Espectros de FTIR-ATR do DEAE, da quitosana purificada (QP), dos polímeros modificados apenas com grupos DEAE (QD21-40DEAE e QD5-49DEAE).

Assim, conclui-se que o procedimento da reação de substituição por grupos DEAE foi adequado e a substituição por grupos hidrofílicos se mostrou dependente da massa molar do polímero.

4.1.2.2 Caracterização dos derivados anfífilos

4.1.2.2.1 Determinação do grau médio de substituição por grupos dodecila

Os graus médios de substituição por grupos dodecila ($\overline{GS}_{dodecila}$) também foram determinados por meio da técnica de RMN de 1H . A partir das áreas dos picos referentes aos hidrogênios do grupo $-CH_3$ do substituinte dodecila, que apresentam sinal em 1,3 ppm (CH_{3DD}), e dos hidrogênios anoméricos dos monômeros acetilados, desacetilados e substituídos que apresentam sinal na região entre 4,8 e 5,5 ppm do espectro de RMN de 1H , foi possível o cálculo do $\overline{GS}_{dodecila}$ utilizando a equação 6 (DESBRIERES *et al.*, 1996).

$$\overline{GS}_{dodecila} = \left(\frac{A_{CH_{3DD}}}{3 \times (A_H + A_{HS})} \right) \times 100 \quad (6)$$

Na qual, $A_{CH_{3DD}}$ é a área dos picos referentes aos hidrogênios do grupo CH_3 do substituinte dodecila e A_H e A_{HS} referem-se respectivamente aos núcleos dos hidrogênios anoméricos dos monômeros não substituídos e substituídos do espectro de RMN de 1H .

Os derivados anfífilos de quitosana foram denominados QD21-40DEAE-6DD, QD21-40DEAE-18DD, QD5-49DEAE-6DD e QD5-49DEAE-17DD e os seus espectros de RMN de 1H são apresentados nas Figuras 21 e 22. Os sinais produzidos pelos hidrogênios $-CH_2-$ presentes na cadeia do grupo dodecila, observados em aproximadamente 2 e 1,6 ppm (PEDRO *et al.*, 2016), também foram destacados na Figura 21.

Figura 21 - Espectros de RMN de ^1H das quitosanas modificadas QD21-40DEAE-6DD e QD21-40DEAE-18DD em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ e fórmula estrutural idealizada dos monômeros contendo o grupo dodecila e os hidrogênios H_1 que produzem os sinais utilizados.

Figura 22 - Espectros de RMN de ^1H das quitosanas modificadas QD5-49DEAE-6DD e QD5-49DEAE-17DD em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$.

Nas Figuras 21 e 22 é possível observar que as reações de alquilação ocorreram de forma eficiente, pois os espectros dos derivados anfifílicos exibem picos que não estão presentes no espectro da quitosana purificada apresentado na Figura 13.

Os picos observados em aproximadamente 4,7 ppm nos espectros dos derivados da série QD5-49DEAE (e de baixa intensidade nos espectros dos derivados da série QD21-40DEAE) são resultados dos sinais produzidos pelos hidrogênios presentes nas moléculas de água, esses picos foram suprimidos nos espectros dos derivados de QD21-40DEAE.

4.1.2.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de FTIR-ATR da quitosana purificada (QP), do polímero hidrofílico e dos derivados anfifílicos das duas séries distintas de massa molar são apresentados na Figura 23. Verifica-se, a partir da comparação entre os espectros, a presença de bandas na região entre $2991\text{-}2820\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos derivados que não são observadas no espectro da QP. Essas bandas correspondem às deformações axiais da ligação C-H dos grupos $-\text{CH}_3$ e dos grupos $-\text{CH}_2-$ existentes nos substituintes DEAE e dodecila (GABRIEL *et al.*, 2015). As

demais bandas são características do espectro da quitosana e do derivado hidrofílico, e já foram apresentadas nos itens 4.1.1.2 e 4.1.2.1.2

Figura 23 - Espectros de FTIR-ATR dos polímeros QP, derivado hidrofílico e dos derivados anfífilos das duas séries distintas de massa molar média (a) QD21 e (b) QD5.

Com a análise dos espectros de FTIR-ATR confirmou-se a síntese dos derivados anfifílicos.

A Tabela 5 lista os derivados hidrofílicos e anfifílicos sintetizados e seus respectivos graus de substituição por grupos DEAE e por grupos dodecila. Os valores de rendimento de reação para cada polímero sintetizado são apresentados no Apêndice A.

Tabela 5 - Valores do grau de substituição por grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos dos derivados de quitosana.

Derivado de quitosana	$\overline{GS}_{DEAE}$	$\overline{GS}_{dodecila}$
QD21-40DEAE	40%	-
QD21-40DEAE-6DD		6%
QD21-40DEAE-18DD		18%
QD5-49DEAE	49%	-
QD5-49DEAE-6DD		6%
QD5-49DEAE-17DD		17%

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada como análise complementar à caracterização dos polímeros.

A Figura 24 apresenta imagens da superfície da quitosana purificada nos aumentos de 500 e 5000 vezes.

Figura 24 - Imagens da superfície da quitosana purificada (QP) nos aumentos de 500 (A) e 5000 (B) vezes, respectivamente.

A Figura 25 apresenta imagens da superfície da quitosana QD5-49DEAE nos aumentos de 500 e 5000 vezes.

Figura 25 - Imagens da superfície da quitosana QD5-49DEAE nos aumentos de 500 (A) e 5000 (B) vezes, respectivamente.

A Figura 26 apresenta imagens da superfície da quitosana QD5-49DEAE-6DD nos aumentos de 500 e 5000 vezes.

Figura 26 - Imagens da superfície da quitosana QD5-49DEAE-6DD nos aumentos de 500 (A) e 5000 (B) vezes, respectivamente.

A Figura 27 apresenta imagens da superfície da quitosana QD5-49DEAE-17DD nos aumentos de 500 e 5000 vezes.

Figura 27 - Imagens da superfície da quitosana QD5-49DEAE-17DD nos aumentos de 500 (A) e 5000 (B) vezes, respectivamente.

Por meio da comparação das imagens verificou-se que, tanto as reações de substituição por grupamentos DEAE quanto a alquilação do derivado hidrofílico, resultaram na formação de derivados de quitosana com superfície porosa. Esse mesmo comportamento foi observado para a série de derivados QD21 (polímeros hidrofílicos e anfifílicos). De acordo

com Aparecida *et al.* (2008), polímeros porosos podem ser utilizados como suporte para regeneração e substituição de tecidos. Entretanto, tais estudos estão fora do escopo do trabalho. Ademais, observou-se na Figura 25b a presença de “pequenas esferas”, que foram atribuídas a possível presença de acetato de sódio na amostra QD5-49DEAE, oriundo das etapas de síntese do derivado.

4.1.4 Caracterização Térmica dos derivados de quitosana

As curvas TG dos polímeros QP, QD21 e QD5 (Figura 28a, b), em atmosfera oxidante, apresentaram três etapas de perdas de massa para o intervalo de temperatura de 20 a 800 °C. A primeira etapa ocorreu no intervalo de 20 a 100 °C, não é considerada decomposição térmica; refere-se à perda de água adsorvida e/ou fracamente ligada por ligações de hidrogênio às cadeias de quitosana (ZAWADZKI *et al.*, 2010). A segunda etapa ocorreu no intervalo de 200 a 400 °C, e corresponde à decomposição (térmica e oxidativa) da quitosana, sendo resultado da despolimerização das cadeias do polímero, da decomposição dos anéis piranosídicos devido à desidratação, da desaminação e reação de abertura dos anéis (ZAWADZKI *et al.*, 2010). A terceira etapa ocorreu no intervalo de 400 a 600 °C, e está associada à queima do material carbonizado formado na etapa anterior de perda de massa (LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2012). O mesmo comportamento foi observado para os demais derivados, exceto para o derivado hidrofílico QD5-49DEAE e anfifílicos QD21-40DEAE-18DD, QD5-49DEAE-6DD e QD5-49DEAE-17DD, para os quais além das 3 etapas anteriormente descritas, observou-se uma etapa de perda de massa entre 100 – 200 °C. A presença dessa nova etapa de perda de massa pode ser decorrente de dois eventos diferentes: (a) ou perda de água fortemente ligada às cadeias do polímero devido à substituição com grupos hidrofílicos DEAE; (b) ou ao início da degradação térmica dos grupos DEAE e dodecila dos derivados de quitosana.

Figura 28 – Curvas (a) TG e DTG do polímero QP e (b) TG dos polímeros QP, QD21 e QD5. β 10 °C min⁻¹, vazão de ar sintético 90 mL min⁻¹, 3,0 mg de amostra, cadinho de α -alumina.

As Figuras 29 e 30 apresentam as curvas TG e DTG do derivado hidrofílico QD5-49DEAE e anfifílico QD5-49DEAE-6DD, respectivamente, da série de derivados de massa molar viscosimétrica média de 5000 g mol⁻¹.

Figura 29 – Curvas TG e DTG do polímero QD5-49DEAE. β 10 °C min⁻¹, vazão de ar sintético 90 mL min⁻¹, 3,0 mg de amostra, cadinho de α -alumina.

Figura 30 – Curvas TG e DTG do polímero QD5-49DEAE-6DD. β 10 °C min⁻¹; vazão de ar sintético 90 mL min⁻¹, 3,0 mg de amostra, cadinho de α -alumina.

As temperaturas referentes a 30% de perda de massa, as porcentagens de massa perdida em cada etapa e as porcentagens de massa residual são apresentadas na Tabela 6, na qual é possível observar que as reações de despolimerização da quitosana purificada e desacetilação da quitosana comercial aumentaram a estabilidade térmica dos polímeros Q30des, QD30, QD21, QD5, em relação aos polímeros QP e QC, fenômeno atribuído a menor massa molar viscosimétrica média desses derivados. As inserções de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na estrutura química da quitosana diminuíram a temperatura para atingir 30% de perda de massa. De acordo com Zawadzki e Kaczmarek (2010), a massa residual (1,0 - 9,4%), sugere o possível cruzamento de estruturas que se ligam por meio de ligações de hidrogênio e que são quebradas em temperaturas mais elevadas.

Tabela 6 - Valores de temperatura referente a 30% de perda de massa, porcentagens de massa perdida e porcentagens de massa residual para os polímeros sob atmosfera oxidante.

Amostras	Etapa		Etapa		Etapa		Etapa	
	20-100 °C		100-200 °C		200-400 °C		400-600 °C	
Temp. em		Δm (%)	Δm (%)	Δm (%)	Δm (%)	Δm (%)	Resíduo (%)	
30% de perda de massa (°C)								
QC	284,1	9,7	-	48,8	39,9	0,0		
QP	253,4	10,3	-	54,5	23,4	5,3		
Q30des	292,5	12,4	-	43,2	43,2	0,0		
QD30	289,7	11,3	-	42,4	44,4	0,0		
QD21	275,3	7,6	-	39,5	48,7	4,1		
QD21-40DEAE	232,9	13,7	-	60,4	22,8	1,6		
QD21-40DEAE-6DD	224,7	12,9	-	53,5	30,8	0,1		
QD21-40DEAE-18DD	225,7	14,8	4,9	58,7	22,2	0,0		
QD5	264,1	14,6	-	39,3	39,5	6,5		
QD5-49DEAE	244,7	8,8	4,2	56,46	20,0	9,4		
QD5-49DEAE-6DD	234,9	9,3	4,2	59,9	22,1	4,1		
QD5-49DEAE-17DD	235,6	9,5	3,8	54,2	26,4	5,2		

4.2 Caracterizações dos Biocompósitos

4.2.1 Espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-vis

A formação de NPs-Ag nos filmes contendo diferentes concentrações de MMT e QC foi monitorada por meio da Espectrofotometria de Absorção Molecular no UV-vis em função do tempo de irradiação. Os espectros de UV-vis dos nanocompósitos QC/2,5%MMT*/NPs-Ag, QC/5%MMT/NPs-Ag, QC/10%MMT*/NPs-Ag e do filme referência QC/NPs-Ag, durante o processo de irradiação, são apresentados na Figura 31. Os espectros de UV-vis dos filmes de nanocompósitos baseados em QC exibem uma banda de absorção (banda plasmônica) em 430-440 nm, indicando a formação de NPs-Ag. Essa banda torna-se mais estreita e mais intensa com o tempo de irradiação, sendo a maior intensidade da banda

plasmônica observada considerada como a máxima formação das NPs-Ag. Além disso, a presença de outra banda de absorção na região de 250-300 nm indica a degradação simultânea da QC com a concomitante formação de radicais (ANDRADY *et al.*, 1996). Segundo Sionkowska *et al.* (2013), o aparecimento da banda em 290 nm durante a irradiação UV de filmes de quitosana, indica a formação de novos cromóforos.

Figura 31 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC/2,5%MMT*/NPs-Ag, (b) QC/5%MMT/NPs-Ag, (c) QC/10%MMT*/NPs-Ag e (d) QC/NPs-Ag, durante o processo de irradiação.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

Para os filmes de nanocompósitos preparados variando-se a concentração de MMT, verificou-se que para as menores concentrações de argila (2,5 e 5% (m/m)), a formação máxima de NPs-Ag foi obtida após 24 horas de irradiação (Figuras. 31a, b, d). Entretanto, para o filme de nanocompósito contendo 10% de MMT (m/m), a concentração máxima de NPs-Ag ocorreu após 11 horas de irradiação (Figura 31c), indicando a formação mais rápida de NPs-Ag. Além disso, a banda plasmônica é mais intensa do que a banda de degradação (300 nm) da QC, sugerindo a predominância do processo de formação das NPs-Ag. No entanto, para o filme referência QC/NPs-Ag (sem argila), a banda em 300 nm atribuída aos foto-produtos de degradação é superior em comparação com a banda plasmônica (Fig. 31d).

De acordo com estes resultados, a MMT pode ser considerada como um agente estabilizador contra a degradação UV. Isso ocorre devido à banda de transferência de carga na região de 241-243 nm (Figura 11) (KARICKHOFF e BAILEY, 1973). Lombardo *et al.* (2013) observaram o mesmo comportamento para a argila contra a degradação foto-oxidativa do compósito de poli(óxido de etileno)/montmorilonita. A MMT pode espalhar e absorver parte da luz UV, diminuindo a absorção da quitosana e sua consequente fotodegradação (LOMBARDO *et al.*, 2013).

Para os filmes de nanocompósitos preparados em diferentes concentrações de QC, observou-se que a maior formação de NPs-Ag foi obtida para o filme contendo apenas 2,5% de MMT (m/m) após 20 horas de irradiação. Entretanto, tanto o espectro de absorção do compósito QC*/2,5%MMT/NPs-Ag quanto os espectros dos seus dois filmes referência (QC*/2,5%MMT e QC*/NPs-Ag) apresentaram a banda de degradação do polímero com intensidade igual ou superior à banda plasmônica, indicando que, para esses compósitos, o processo de degradação da quitosana é predominante. O mesmo comportamento foi observado para os compósitos contendo 5 e 10% de MMT (m/m), com formação máxima de NPs-Ag após 24 horas de irradiação UV (Apêndice B).

A síntese de NPs-Ag também foi avaliada em filmes de nanocompósitos preparados com quitosanas com massa molar menor (QD30), grau de desacetilação maior (Q30des) e derivados hidrofílicos e anfifílicos de quitosana, contendo 10% de MMT (m/m).

Os espectros de UV-vis dos nanocompósitos QD30/10%MMT/NPs-Ag, Q30des/10%MMT/NPs-Ag e QC/10%MMT/NPs-Ag são apresentados na Figura 32. É importante notar que o aumento de aproximadamente 10% no grau de desacetilação da quitosana não influenciou significativamente na formação de NPs-Ag, uma vez que os

espectros de absorção dos filmes QD30/10%MMT/NPs-Ag e Q30des/10%MMT/NPs-Ag são semelhantes.

Figura 32 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos QD30/10%MMT/NPs-Ag, Q30des/10%MMT/NPs-Ag e QC/10%MMT/NPs-Ag após 24 horas de irradiação UV.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

Ademais, observou-se que a intensidade da banda plasmônica de absorção do nanocompósito QC/10%MMT/NPs-Ag é maior que as dos compósitos QD30/10%MMT/NPs-Ag e Q30des/10%MMT/NPs-Ag. Esta diferença pode estar relacionada com a massa molar viscosimétrica média das quitosanas. Assim, o aumento do comprimento da cadeia do polímero seria o responsável pela alta concentração de NPs-Ag formadas. Este resultado corrobora com os estudos de Luo *et al.* (2005), que relataram a maior formação de nanopartículas de prata com o aumento da massa molar do poli(etileno glicol).

De acordo com alguns estudos (ANDRADY *et al.*, 1996; SIONKOWSKA *et al.*, 2013), o mecanismo de degradação da quitosana sob luz UV ocorre por duas vias (Figura 2 – página 29), o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente em relação à influência da massa molar média do polissacarídeo. A menor massa molar do polímero resultaria em menor quantidade de ligações glicosídicas na cadeia polimérica e, consequentemente, na formação de menor quantidade de radicais responsáveis pela redução da Ag^+ .

Assim, um possível mecanismo de formação das NPs-Ag teria início com a formação de radicais e macro-radicais de quitosana, que reduzem o íon Ag^+ à Ag^0 . Então, as espécies Ag^0 interagem com outros íons Ag^+ para a formação de *clusters* relativamente estáveis, que por sua vez absorvem mais espécies neutras de Ag^0 para a formação da nanopartícula de prata (LATIF, 2014). Nesse sistema, os íons Ag^+ estariam interagindo com a cadeia polimérica por meio da formação de complexos (SHAMELI, 2010).

Segundo Druet e colaboradores (2015), o mecanismo de complexação de íons metálicos pela quitosana pode envolver não somente os grupamentos amina desprotonados e os átomos de oxigênio presentes na estrutura do polímero, mas também os grupos amina protonados quando esses se encontram solubilizados em soluções aquosas ácidas. Nesse caso, a quelação de metais pode ocorrer por meio do processo de troca de cátions (Figura 33). Assim, o aumento da quantidade de grupos amina protonáveis no polímero melhoraria sua capacidade de complexação.

Figura 33 - Esquema do mecanismo de quelação de metais por meio do processo de troca de cátions.

Fonte: Adaptado de Druet e colaboradores (2015).

Para os nanocompósitos preparados com quitosanas modificadas (derivados hidrofílicos ou anfifílicos), verificou-se que a inserção de grupamentos DEAE na cadeia do polímero parcialmente despolimerizado resultou na rápida síntese de NPs-Ag, em aproximadamente 1,5 horas de irradiação UV. Esse mesmo comportamento foi observado para os filmes de derivado anfifílicos, indicando que a influência dos grupos DEAE é superior à da massa molar do polímero e que a inserção de diferentes porcentagens de grupos dodecila não influencia no tempo de formação das nanopartículas de prata. Para esses nanocompósitos, não foi possível acompanhar a banda de degradação do polímero (Figura 34).

Figura 34 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e (b) QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

Uma possível explicação para a rápida formação das NPs-Ag nesses compósitos seria o expressivo aumento de grupos amina protonáveis no polissacarídeo. A inserção de aproximadamente 40 - 50% de grupamentos DEAE na cadeia da quitosana aumentaria significativamente o número de sítios de quelação do polissacarídeo, permitindo a interação da cadeia polimérica com uma maior quantidade de íons de prata, facilitando assim, a redução dos íons Ag^+ pelos radicais formados com o processo de irradiação UV.

Os demais espectros de absorção no UV-vis são apresentados no Apêndice B.

4.2.2 Difração de Raios-X

A técnica de Difração de Raios-X foi utilizada para avaliar a eficiência do processo de purificação da argila MMT, bem como para identificar o seu nível de intercalação/esfoliação na amostra, por meio da determinação do espaçamento interlamelar.

A Figura 35 apresenta os difratogramas da argila montmorilonita SWy-2 antes e depois do processo de purificação, MMT comercial e MMT purificada respectivamente, e do filme de quitosana comercial (QC). Pode-se observar que o difratograma da MMT comercial exibe picos que estão ausentes ou menos intensos no difratograma da MMT purificada. Esses picos estão relacionados principalmente com a presença do mineral quartzo na argila não

purificada (CHIPERA e BISH, 2001), que é parcialmente removido com o procedimento de purificação da argila. Nota-se ainda que ambos os difratogramas das montmorilonitas apresentam o pico de difração (001) em aproximadamente $2\theta = 7,0^\circ$, o que corresponde a um espaçamento interlamelar de $12,6 \text{ \AA}$ (valor calculado pela equação de Bragg – equação 3) e indica que o procedimento de purificação não alterou a estrutura cristalina da argila.

No difratograma do filme de QC (Figura 35), é possível a identificação de três picos principais região de $2\theta = 8^\circ$, 11° e 18° . Esses picos correspondem respectivamente a estrutura cristalina hidratada (dois primeiros picos) e a estrutura amorfa da quitosana (RHIM *et al.*, 2006). Comportamento semelhante foi observado por Rhim e colaboradores (2006) em seus estudos sobre a preparação e caracterização de filmes de nanocompósitos baseados em quitosana.

Figura 35 - Difratogramas das argilas MMT comercial, MMT purificada e do filme de quitosana comercial (QC).

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

Para os filmes de nanocompósitos preparados com quitosana comercial (Figura 36), o pico de difração (001) foi deslocado de $7,0^\circ$ para $5,4 - 6,3^\circ$ (espaçamento interlamelar de $16,3 \text{ \AA} - 14,0 \text{ \AA}$), sugerindo a formação de estruturas intercaladas para todas as amostras.

Entre esses filmes, as maiores distâncias interlamelares foram determinadas para os compósitos contendo 2,5% (m/m) de argila (filmes QC*/2,5%MMT/NPs-Ag e QC/2,5%MMT*/NPs-Ag), indicando que a concentração de MMT influencia em seu nível de intercalação. Além disso, os difratogramas desses nanocompósitos sugerem que a estrutura ordenada da argila foi perturbada, uma vez que os picos (001) são menos intensos e mais largos (LOMBARDO *et al.*, 2016). Assim, os resultados de DRX revelam a ocorrência de estruturas intercaladas juntamente com algumas estruturas esfoliadas.

Figura 36 - Difratogramas dos nanocompósitos preparados com QC (a) variando-se a concentração de QC e (b) variando-se a concentração de MMT.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

Esse mesmo comportamento foi verificado para os nanocompósitos baseados em QD30, e derivados hidrofílicos e anfifílicos de quitosana (preparados com 10% (m/m) de MMT) para os quais, de modo geral, os maiores valores de espaçamentos interbasais foram determinados para os filmes contendo QD30 e derivados anfifílicos como matriz polimérica (Figura 37), o que sugere a maior interação entre esses polímeros e a argila. A Figura 37 apresenta os difratogramas dos filmes QD30/10%MMT/NPs-Ag, Q30des/10%MMT/NPs-Ag, QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag.

Figura 37 - Difratomogramas dos nanocompósitos QD30/10%MMT/NPs-Ag, Q30des/10%MMT/NPs-Ag, QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

Em contrapartida, o desaparecimento do pico (001) para o nanocompósito Q30des/10%MMT/NPs-Ag indica a formação de estrutura esfoliada, com a completa expansão do espaço interlamelar da MMT (Figura 37). Esses resultados indicam que além da concentração do silicato, a massa molar, o grau de desacetilação e estrutura química do polímero também influenciam no nível de intercalação da argila.

A Tabela 7 apresenta os valores de espaçamento interlamelar determinados para todos os filmes estudados. Os difratogramas dos demais filmes são apresentados no Apêndice C.

Tabela 7 - Valores de espaçamento interlamelar (d) para os filmes de nanocompósitos estudados.

Filmes de Nanocompósitos	d (Å)	Filmes de Nanocompósitos	d (Å)
QC*/2,5%MMT/NPs-Ag	16,3	QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag	14,7
QC/5%MMT/NPs-Ag	14,7	QD5-49DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag	16,3
QC*/10%MMT/NPs-Ag	14,0	QD5-49DEAE-17DD/10%MMT/NPs-Ag	14,0
QC/2,5%MMT*/NPs-Ag	16,1	QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag	16,1
QC/10%MMT*/NPs-Ag	14,0	QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag	16,3
QD30/10%MMT/NPs-Ag	22,1	QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag	17,3
Q30des/10%MMT/NPs-Ag	-	-	-

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi utilizada para a determinação da forma e da distribuição de tamanho das NPs-Ag, bem como para a verificação do estado de dispersão da MMT nos nanocompósitos. As imagens de MET para os diferentes nanocompósitos são apresentadas nas figuras a seguir. Para todas as amostras, observaram-se pequenos pontos pretos que foram atribuídos às NPs-Ag. Além disso, as NPs-Ag apresentaram morfologia esférica independentemente da concentração do polímero ou da argila, ou do derivado de quitosana usado no preparo dos filmes. De acordo com Tunç e Duman (2010), a presença de tactóides minerais de argila (as áreas mais escuras) em imagens de MET indica a formação de estruturas intercaladas em nanocompósitos, enquanto que para estruturas esfoliadas as camadas de argila estão completamente dispersas e uniformizadas na matriz polimérica. Os tamanhos de partícula obtidos por meio da análise de MET para todos os nanocompósitos variaram entre 2,7 - 6,3 nm.

Para os filmes de nanocompósitos preparados com diferentes concentrações de QC, observou-se que os três diferentes nanocompósitos apresentaram NPs-Ag uniformes e de tamanhos semelhantes (Figura 38). Entretanto, para o filme contendo 10% de MMT (m/m), observou-se a agregação de algumas partículas. Além disso, no que se refere à dispersão da argila, foi observada a formação de estruturas intercaladas e uma pequena quantidade de estruturas esfoliadas para os três nanocompósitos.

Figura 38 - Imagens de MET e gráfico de distribuição de tamanho de partículas dos nanocompósitos (a-c) QC*/2,5%MMT/NPs-Ag, (d-f) QC/5%MMT/NPs-Ag e (g-i) QC*/10%MMT/NPs-Ag.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

A partir das imagens de MET para os filmes preparados variando-se a concentração de MMT, verificou-se que a quantidade de argila influenciou na uniformidade de NPs-Ag. Os filmes QC/2,5%MMT*/NPs-Ag (Figura 39a-c) e QC/5%MMT/NPs-Ag (Figura 38a-c) exibiram formação de NPs-Ag de tamanho mais uniforme, enquanto que para o filme QC/10%MMT*/NPs-Ag, o aumento da concentração de MMT para 10% (m/m), resultou na menor uniformidade das nanopartículas, na grande distribuição de tamanhos (2-20 nm) e na agregação de algumas partículas (Figuras 39d-f).

Em relação à dispersão da argila, foi observado que em baixas concentrações de argila (2,5 e 5% (m/m)), formaram-se estruturas intercaladas e uma pequena quantidade de estruturas esfoliadas. Para o nanocompósito QC/10%MMT*/NPs-Ag (Figura 39d), observou-

se a formação de estrutura intercalada com presença de agregados, indicando a menor dispersão de argila.

Figura 39 - Imagens de MET e gráfico de distribuição de tamanho de partículas dos nanocompósitos (a-c) QC/2,5%MMT*/NPs-Ag e (d-f) QC/10%MMT*/NPs-Ag.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

A partir das imagens de MET para os nanocompósitos QD30/10% MMT/NPs-Ag e Q30des/10% MMT/NPs-Ag (Figura 40), notou-se que a diminuição da massa molar do polímero resultou na maior uniformidade das NPs-Ag, quando comparado com as imagens do nanocompósito QC/10% MMT*/NPs-Ag (Figura 39e). Além disso, o aumento do grau de desacetilação levou à formação de partículas maiores e com uma maior distribuição de tamanhos (2,5- 10,5 nm). Nas imagens obtidas para os compósitos à base de QD30 e Q30des, não foram observadas a presença de estruturas intercaladas de argila, indicando a predominância da formação de estruturas esfoliadas (com total delaminação das camadas de argila). Estes resultados estão de acordo com as análises de DRX.

Figura 40 - Imagens de MET e gráfico de distribuição de tamanho de partículas dos nanocompósitos (a-c) QD30/10% MMT/NPs-Ag e (d-f) Q30des/10% MMT/NPs-Ag.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

A Figura 41 apresenta as imagens de MET e o gráfico de distribuição de tamanho de partículas para os nanocompósitos QD21-40DEAE/10% MMT/NPs-Ag, QD21-40DEAE-6DD/10% MMT/NPs-Ag e QD21-40DEAE-18DD/10% MMT/NPs-Ag. Para esses filmes, as imagens de MET revelaram que as menores NPs-Ag foram formadas nos filmes contendo derivados anfifílicos de quitosana (QD5-49DEAE-6DD, QD5-49DEAE-17DD, QD21-40DEAE-6DD e QD21-40DEAE-18DD). Observou-se ainda que entre os filmes preparados com quitosana anfifílica (com diferentes graus de substituição por grupos dodecila), a menor distribuição de tamanho das NPs-Ag foi obtida para os filmes contendo as maiores proporções de grupos hidrofóbicos. Os polímeros anfifílicos (compostos por grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos) podem se comportar como surfactantes, estabilizando e controlando o tamanho e a forma das NPs-Ag (SAKAMOTO *et al.*, 2009).

Além disso, a ausência de tactóides de MMT indica a melhor dispersão das lamelas do silicato dentro desses filmes de nanocompósitos.

Figura 41 - Imagens de MET e gráfico de distribuição de tamanho de partículas dos nanocompósitos (a-c) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag, (d-f) QD21-40DEAE-6DD /10%MMT/NPs-Ag e (g-i) QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

4.3 Atividade Antibacteriana

4.3.1 Método do Disco de Difusão

As zonas de inibição contra as bactérias *E. coli* e *B. subtilis* foram obtidas com diâmetros (d_{zi}) variando de 6,0 a 7,3 - 9,0 mm. Os testes foram feitos em triplicata para cada amostra (após irradiação UV) e os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Medida da atividade antibacteriana para os filmes de quitosana pelo método de disco de difusão.

<i>E. coli</i>		<i>B. subtilis</i>	
Filmes	d _{zi} (mm)	Filmes	d _{zi} (mm)
QC	N.I	QC	N.I
QC/2,5%MMT	N.I	QC/2,5%MMT	N.I
QC/5%MMT	N.I	QC/5%MMT	N.I
QC/10%MMT	N.I	QC/10%MMT	N.I
QD30/10% MMT	N.I	QD30/10% MMT	N.I
Q30des/10% MMT	N.I	Q30des/10% MMT	N.I
QD21-40DEAE/10% MMT	N.I	QD21-40DEAE/10% MMT	N.I
QD21-40DEAE-6DD/10%MMT	N.I	QD21-40DEAE-6DD/10%MMT	N.I
QD21-40DEAE-18DD/10% MMT	N.I	QD21-40DEAE-18DD/10% MMT	N.I
QD5-49DEAE/10% MMT	N.I	QD5-49DEAE/10% MMT	N.I
QD5-49DEAE-6DD/10%MMT	N.I	QD5-49DEAE-6DD/10%MMT	N.I
QD5-49DEAE-17DD/10% MMT	N.I	QD5-49DEAE-17DD/10% MMT	N.I
QC/NPs-Ag	8,7 ± 0,6	QC/NPs-Ag	8,5 ± 0,7
QC/2,5%MMT/NPs-Ag	7,6 ± 0,3	QC/2,5%MMT/NPs-Ag	8,3 ± 0,5
QC /5%MMT/NPs-Ag	8,7 ± 0,6	QC/5%MMT/NPs-Ag	8,7 ± 0,6
QC /10%MMT/NPs-Ag	8,3 ± 0,6	QC/10%MMT/NPs-Ag	7,3 ± 0,6
QD30/10%MMT/NPs-Ag	7,5 ± 0,5	QD30/10%MMT/NPs-Ag	8,0 ± 0,3
Q30des/10%MMT/NPs-Ag	7,8 ± 0,2	Q30des/10%MMT/NPs-Ag	8,3 ± 0,5
QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag	8,3 ± 0,3	QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag	8,0 ± 0,3
QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag	8,0 ± 0,3	QD21-40DEAE -6DD/10%MMT/NPs-Ag	9,0 ± 0,3
QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag	8,3 ± 0,6	QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag	8,7 ± 0,6
QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag	8,6 ± 0,6	QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag	8,0 ± 0,3
QD5-49DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag	8,8 ± 0,3	QD5-49DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag	9,0 ± 0,6
QD5-49DEAE-17DD/10%MMT/NPs-Ag	8,3 ± 0,6	QD5-49DEAE-17DD/10%MMT/NPs-Ag	7,3 ± 0,3

N.I.: Ausência de inibição.

Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados foram reportados como média ± desvio padrão.

As placas de Petri contendo discos do filme de QC e dos nanocompósitos de referência (polímero/MMT) apresentaram uma densa população de colônias de *E. coli* e *B. subtilis* ao redor dos discos dos filmes, ou seja, não houve formação de halos de inibição. Entretanto, não foi observado o desenvolvimento bacteriano sob estes discos, sugerindo que esses filmes inibiram o crescimento de ambas as bactérias por contato direto. A ausência de zona de

inibição também foi relatada por Leceta *et al.* (2013). Ela pode ser explicada pela limitação da difusão da quitosana em placa de ágar. As placas de Petri contendo discos de nanocompósitos/NPs-Ag apresentaram halos de inibição ao redor dos filmes circulares. Estes resultados indicam que os filmes são igualmente eficazes contra *E. coli* e *B. subtilis*. A atividade antibacteriana dos filmes contendo NPs-Ag, indicada pela presença do halo de inibição, ocorre, segundo Sohrabnezhad (2015), devido à liberação de íons Ag^+ a partir da superfície das NPs-Ag, por reação de oxidação. Os Ag^+ interagem com grupos funcionais de proteínas e enzimas resultando na inativação e inibição dos processos celulares do micro-organismo. De acordo com Krishnan *et al.* (2015), nanopartículas pequenas são mais efetivas contra bactérias devido a maior liberação de íons Ag^+ .

A formação de NPs-Ag diretamente nos filmes preparados com derivados de quitosana/argila por irradiação UV ocorreu rapidamente, promovendo a formação de pequenas NPs-Ag e evitando a formação de aglomerados. Essa metodologia permite a distribuição homogênea das NPs-Ag no material devido à imobilização dos íons de prata (Ag^+) na matriz polimérica antes da reação fotoquímica.

Krishnan e colaboradores (2015) relataram a síntese de NPs-Ag em solução de quitosana para a posterior formação de filmes. Esse procedimento gerou a formação de aglomerados de NPs-Ag decorrentes do processo de secagem da solução.

A Figura 42 apresenta a comparação entre a não formação e a formação da zona de inibição ao redor dos filmes.

Figura 42 - Comparação das zonas de inibição dos filmes (a) QC e (b) QC/10%MMT/NPs-Ag contra *B. subtilis*.

Fonte: Adaptado de Gabriel e colaboradores (2017).

4.4. Avaliação dos filmes após um ano de armazenamento

Os filmes de nanocompósitos preparados com 10% de argila (m/m) também foram avaliados, por meio da técnica de Espectroscopia de Absorção Molecular na região do UV-vis, após um ano de seu armazenamento.

A Figura 43 apresenta os espectros de UV-vis dos filmes de QC, QC/10%MMT/NPs-Ag, QD30/10%MMT/NPs-Ag, Q30des/10%MMT/NPs-Ag e QD21/10%MMT/NPs-Ag obtidos logo após o processo de irradiação e depois de um ano desse processo. Para esses nanocompósitos, observa-se o expressivo aumento da banda de degradação da quitosana na região de 300 - 400 nm.

Figura 43- Espectros de UV-vis dos filmes de (a) QC, (b) QC/10%MMT/NPs-Ag, (c) QD30/10%MMT/NPs-Ag, (d) Q30des/10%MMT/NPs-Ag e (e) QD21/10%MMT/NPs-Ag, obtidos logo após o processo de irradiação e depois de um ano de armazenamento.

Segundo Szymanska e Winnicka (2015), a quitosana é bastante susceptível a fatores ambientais, como temperatura e umidade, que podem contribuir para a degradação do polissacarídeo. Assim, dependendo das condições e do período em que o polímero é armazenado, além da coloração mais amarelada, pode ser observada a diminuição de sua massa molar, com formação de diferentes radicais, e conseqüentemente, mudanças em suas propriedades físico-químicas (KAM *et al.*, 1999). A Figura 44 apresenta os espectros de UV-vis do filme de QC após seu preparo e após um ano de seu armazenamento.

Figura 44 – Espectros de UV-vis do filme de quitosana comercial QC logo após seu preparo e após um ano de armazenamento (esse filme não foi exposto à radiação UV).

Com relação às nanopartículas de prata, para os filmes preparados com quitosanas de menor massa molar (QD30, Q30des e QD21), a largura da banda na região de 200 - 400 nm não permitiu a identificação da banda de absorção plasmônica, indicando o processo intenso de degradação polímero (Figura 43). Entretanto, para o nanocompósito QC/10%MMT/NPs-Ag, foi observada a diminuição da intensidade da banda de absorção na região de 450 nm (banda plasmônica), o que demonstra relativa estabilidade das NPs-Ag formadas nesse filme.

Na Figura 45 são apresentados os espectros de UV-vis dos nanocompósitos QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e QD21-40DEAE/NPs-Ag (sem argila). A partir da comparação entre esses espectros, notou-se que após um ano de armazenamento, a menor largura da banda de degradação foi observada para o compósito contendo argila

(QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag), sugerindo que a interação quitosana-DEAE/MMT permitiu a maior estabilização contra a degradação polimérica durante o armazenamento desse compósito, além da formação de nanopartículas de prata estáveis, já que a banda de absorção plasmônica permaneceu praticamente inalterada após o período um ano de sua formação.

Figura 45 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e (b) QD21-40DEAE/NPs-Ag, obtidos logo após o processo de irradiação e depois de um ano de armazenamento.

Todavia, esse estudo não pôde ser realizado com os filmes preparados com derivados anfifílicos de quitosana. Para esses nanocompósitos, após 2 horas de irradiação UV a banda de absorção plasmônica passou do valor máximo de 5 u.a. (absorbância superior a 5 unidades arbitrárias) e após um ano de armazenamento esse valor continuou superior a 5 u.a., o que sugere a formação de NPs-Ag estáveis, porém impossibilita a estimativa de tal estabilidade. Os espectros de UV-vis dos compósitos QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e QD21-40DEAE-6DD/NPs-Ag após um ano de irradiação são apresentados no Apêndice E.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho, nanopartículas de prata foram sintetizadas em filmes de nanocompósitos de quitosana (e derivados) e argila, *via* Fotoquímica. A rota de síntese utilizada para obtenção dos derivados de quitosana foi viável, e polímeros de diferentes massas molares, graus de desacetilação e graus de substituição por grupos DEAE e dodecila foram obtidos, como o confirmado pelas técnicas de Viscosimetria, FTIR-ATR e RMN de ^1H .

O estudo da estabilidade térmica dos polímeros revelou que a diminuição da massa molar do polissacarídeo resultou no aumento de sua estabilidade térmica enquanto que as inserções de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos diminuíram a temperatura para atingir 30% de perda de massa.

Ademais, o procedimento de preparo dos filmes de nanocompósitos foi adequado, sendo obtidos compósitos de estrutura intercalada com uma pequena quantidade de estruturas esfoliadas para a maioria dos filmes estudados. O nível de intercalação da argila, determinado por sua distância interlamelar, se mostrou dependente da concentração da argila, bem como da massa molar do polímero, do grau de desacetilação e da utilização de derivados hidrofílicos e anfifílicos como matriz polimérica. Além disso, as melhores dispersões da argila, observadas nas imagens de MET, foram obtidas para os filmes contendo as menores concentrações de MMT e derivados de quitosana, indicando a maior interação entre esses polímeros e a argila.

A formação das nanopartículas de prata, acompanhada por Espectrofotometria de Absorção Molecular no UV-vis e relacionada à fotodegradação do polissacarídeo, apresentou dependência com a concentração da argila, bem como com a massa molar e a estrutura química do biopolímero, sendo observada a maior formação de NPs-Ag em menor tempo de irradiação para os nanocompósitos preparados com 10% de argila (m/m) e derivados hidrofílicos e anfifílicos de quitosana. Para essa concentração de silicato, a argila atuou como agente de proteção contra a fotodegradação do polímero. Notou-se ainda que a inserção de grupos DEAE foi fator determinante para a formação mais rápida das NPs-Ag sob radiação UV.

As imagens de MET revelaram ainda que as NPs-Ag sintetizadas são esféricas (2,7-6,3 nm de diâmetro) e que sua distribuição de tamanho também é dependente da concentração da argila, da massa molar do polímero e da estrutura química da cadeia polimérica, sendo a inserção de grupamentos dodecila fator importante para estabilização e controle de tamanho das nanopartículas produzidas.

Portanto, a utilização da MMT foi importante para a formação mais rápida das nanopartículas de prata, além da proteção do polímero contra a degradação por radiação UV. E a utilização dos polímeros anfifílicos contribuiu para o aumento da velocidade de formação das NPs-Ag e para a estabilização das mesmas, resultando em nanopartículas pequenas (2,7 - 3,9 nm) obtidas após 1,5 horas de irradiação.

Os testes microbiológicos evidenciaram a existência de atividade antimicrobiana dos filmes contendo NPs-Ag contra as bactérias *E. coli* e *B. subtilis*, a qual foi identificada pela formação de zonas de inibição.

Por fim, os espectros de UV-vis obtidos após um ano da irradiação UV dos nanocompósitos sugeriram a contribuição da montmorilonita contra a degradação polimérica dos filmes preparados com derivados hidrofílicos, durante o período de armazenamento, e que nanopartículas de prata estáveis foram formadas nos filmes a base de derivados hidrofílicos e anfifílicos de quitosana.

DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

Todos os resíduos gerados nas etapas de desenvolvimento do projeto foram devidamente tratados antes de seus descartes e os resíduos que não puderam ser tratados foram adequadamente armazenados para o encaminhamento dos mesmos ao entreposto de resíduos dessa instituição. A seguir estão descritos os procedimentos dos tratamentos para os resíduos mais problemáticos obtidos:

- As águas de lavagem das quitosanas desacetilada, purificada e parcialmente despolimerizadas, de elevado pH, tiveram seu pH ajustado para aproximadamente 7,0 com a utilização de HCl de reuso antes de serem descartadas na rede pública de esgoto;
- A primeira água de diálise das quitosanas modificadas com grupamentos dodecila, contendo cianeto devido a utilização do agente redutor cianoboroidreto de sódio, foi tratada com excesso de hipoclorito de sódio (50% em mols) em pH básico permanecendo sob agitação constante por 12 horas, seguida do abaixamento do pH com HCl não muito concentrado até o pH próximo de 7,0 para o posterior descarte na rede pública de esgoto. A seguir é apresentada a reação de degradação do cianeto com hipoclorito a gás nitrogênio, gás carbônico, cloreto de sódio e água.

- Os resíduos gerados contendo nitrato de prata foram armazenados e identificados para serem encaminhadas ao entreposto de resíduos;

REFERÊNCIAS

- AIDER, M. Chitosan applications for active bo-based films productions and potential in food industry: Review. **LWT- Food Science and Technology**, v. 43, p. 837-842, 2010.
- AHAMED, M. I. N.; SANKAR, S.; KASHIF, P. M.; BASHA, S. K. H.; SASTRY, T. P. Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 680-686, 2015.
- ALBERTINI, L. S. **Ecologia, Fatores Associados à virulência e diversidade de Escherichia coli isolados de amostras de água de lastro, água de regiões portuárias e moluscos bivalves no Brasil**. 2009. 59 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ALI, Z. I.; HELAL, M.H.; SALEH, H. H.; ZIKRY, A. F.; DARWISH, Y.A. Silver-polymer blend nanocomposite. **New York Science Journal**, v. 7, n. 1, p. 84 - 94, 2014.
- ADRADY, A. L.; RORIKAI, Y.; KOBATAKE, T. Spectral sensivity of chitosan photodegradation. **Journal of applied Polymer Science**, v. 62, p.1465-1471, 1996.
- APARECIDA, A. H.; GUASTALDI, A. C.; FOOK, M. V. L. Desenvolvimento e caracterização de suportes porosos de polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) para utilização como biomaterial para reposição e regeneração óssea. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 4, p. 227-280, 2008.
- ARAIZA, R. R.; ALCOUFFE, P.; ROCHAS, C.; MONTEMBault, A.; DAVID, L. Micron range morphology of physical chitosan hydrogels. **Langmuir**, v. 26, p. 17495-17504, 2010.
- ARORA, A.; PADUA, G. W. Review: nanocomposites in food packaging. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 43-49, 2010.
- AZEVEDO, V. V.C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 27-34, 2007.
- BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, p 1-29, 2011.

BADAWY, M. E.I.; RABEA, E. I.; TAKTAK, N. E. M. Antimicrobial and inhibitory enzyme activity of *N*-(benzyl) and quaternary *N*-(benzyl) chitosan derivatives on plant pathogens. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 670-682, 2014.

BATISTA, T. **Estudo das interações entre o corante catiônico azul de metileno e partículas de argila em suspensão aquosa. Processos de migração entre partículas**. 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: biodegradables polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 125-155, 2009.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUELLES-MONAL, W.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001.

CAMPANA-FILHO, S. P.; DE BRITO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CARNATTO, P. C. L. **Deposição fotoquímica de nanopartículas de prata em argilas e avaliação da sua atividade antimicrobiana**. 2016. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

CAVALHEIRO, C. C. S. **Estudo das interações entre corantes catiônicos e partículas de argila em suspensão**. 1995. 208 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

CELIS, R.; ADELINO, M. A.; HERMOSÍN, M. C.; CORNEJO, J. Montmorillonite-chitosan bionanocomposites as adsorbents of the herbicide clopyralid in aqueous solution and soil/water suspensions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 209-210, p. 67-76, 2012.

CHERNOUSOVA, S.; EPPLE, M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. **Angewandte Chemie**, v. 52, p. 1636-1653, 2013.

CHIPERA, S. J.; BISH, D. L. Baseline studies of clay minerals society source clays: powder X-Ray Diffraction analyses. **Clays and Clays Minerals**, v. 49, n. 5, p. 398-409, 2001.

CLAYDEN, J.; GEEVES, N.; WARREN, S. **Organic chemistry**. Oxford: Oxford University, 2012. 1234 p.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Princípios e aplicações de análise térmica**. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012. Apostila.

DESBRIERES, J.; MARTINEZ, C.; RINAUDO, M. Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behavior. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 21-28, 1996.

DICK, L. A.; MCFARLAND, A. D.; HAYNES, C. L.; VAN DUYNE, R. P. Metal Film over Nanosphere (MFON) Electrodes for Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS): improvements in surface nanostructure stability and suppression of irreversible loss. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, p. 853-860, 2002.

DOS SANTOS, B. R.; BACALHAU, F. B.; PEREIRA, T. S.; SOUZA, C. F.; FAEZ, R. Chitosan-montmorillonite microspheres: a sustainable fertilizer delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 340-346, 2015.

DOS SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

DRAGOSTIN, O. M.; SAMAL, S. K.; DASH, M.; LUPASCU, F.; PÂNZARIU, A.; TUCHILUS, C.; GHETU, N.; DANCIU, M.; DUBRUEL, P.; PIEPTU, D.; VASILE, C.; TATIA, R.; PROFIRE, L. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 28-40, 2016.

DRUET, J.; ACHARI, A. E.; ISAAD, J. Efficient removal of heavy metals from aqueous solution by chitosan-coated geotextiles based on polyethylene terephthalate. **Research on Chemical Intermediates**, v. 41, p. 8855-8876, 2015.

EDWARDS, P. P.; THOMAS, J. M. Gold in a metallic divided state-from faraday to present-day nanoscience. **Angewandte Chemie -International Edition**, v. 46, n. 29, p. 5480-5486, 2007.

EL-NOUR, K. M. M. A.; EFTAIHA, A.; AL-WARTHAN, A.; AMMAR, R. A. A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 3, p. 135-140, 2010.

EMAM, H. E.; AHMED, H. B. Polysaccharides templates for assembly of nanosilver. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 300-307, 2016.

EPURE, V.; GRIFFON, M.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 947-952, 2011.

FIAMINGO, A.; DELEZUK, J. A. M.; TROMBOTTO, S.; DAVID, L.; CAMPANA-FILHO, S. P. Extensively deacetylated high molecular weight chitosan from the multistep ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 79-85, 2016.

GABRIEL, J. S.; GONZAGA, V. A. M.; POLI, A. L.; SCHMITT, C. C. Photochemical synthesis of silver nanoparticles on chitosans/montmorillonite nanocomposite films and antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, 2017.
Doi: 10.1016/j.carbpol.2017.05.021.

GABRIEL, J. S.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. O. Synthesis, characterization, and antifungal activities of amphiphilic derivatives of diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5725-5731, 2015.

GABRIEL, J. S. **Síntese, caracterização e atividade antifúngica de derivados anfifílicos de dietilaminoetil-quitosana contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2013.

GOLOVINA, N. B.; KUSTOV, L. Toxicity of metal nanoparticles with a focus on silver. **Mendeleev Communications**, v. 23, p. 59-65, 2013.

GOMES, C. S. F. **Argilas: o que são e para que servem**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1988, p. 7-27.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

HAFSA, J.; SMACH, M. A.; KHEDHER, M. R. B.; CHARFEDDINE, B.; LIMEM, K.; MAJDOUB, H.; ROUATBI, S. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globules essential oil. **LWT- Food Science and Technology**, v. 68, p. 356-364, 2016.

HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**, v. 16, n. 7/8, p. 262-271, 2013.

HUSSAIN, J. I.; TALIB, A.; KUMAR, S.; AL-THABAITI, S. A.; HASHMI, A. A.; KHAN, Z. Time dependence of nucleation and growth of silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 381, p. 23-30, 2011.

HUSSAIN, M. A.; SHAH, A.; JANTAN, I.; TAHIR, M. N.; SHAH, M. R.; AHMED, R.; BUKHARI, S. N. A. One pot light assisted green synthesis, storage and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 53, 2014.

JI, N.; LIU, C.; ZHANG, S.; XIONG, L.; SUN, Q. Elaboration and characterization of corn starch films incorporating silver nanoparticles obtained using short glucan chains. **LWT – Food Science and Technology**, v. 74, p. 311-318, 2016.

KAM, H. M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Storage of partially deacetylated chitosan films. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 48, p. 881-888, 1999.

KARICKHOFF, S. W.; BAILEY, G. W. Optical absorption spectra of clay minerals. **Clays Clay Mineral**, v. 21, p. 51-57, 1973.

KASAAI, M. R. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 477-488, 2007.

KHAN, Z. U. H.; KHAN, A.; SHAH, A.; CHEN, Y.; WAN, P.; KHAN, A. U.; TAHIR, K.; MUHAMMA, N.; KHAN, F. U.; KHAN, F. U.; SHAH, H. U. Photocatalytic, antimicrobial activities of biogenic silver nanoparticles and electrochemical degradation of water soluble dyes at glassy carbon/silver modified pas electrode using buffer solution. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 156, p. 100-107, 2016.

KANMANI, P.; RHIM, J. –W. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 644-652, 2014.

KIM, C. H.; CHUN, H. J. A Synthesis of O-diethylaminoethyl chitosan and its binding ability of cholate and deoxycholate anion in vitro. **Polymer Bulletin**, v. 42, p. 25-32, 1999.

KRISHNAN, S. K.; PROKHOROV, E.; ITURRIAGA, M. H.; MORALES, J. D. M.; LEPE, M. V.; KOVALENKO, Y.; SANCHEZ, I. C.; BÁRCENAS, G. L. Chitosan/silver nanocomposites: synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 242-251, 2015.

KUMAR-KRISHNAN, S.; PROKHOROV, E.; HERNÁNDEZ-ITURRIAGA, M.; MOTA-MORALES, J. D.; VÁZQUEZ-LEPE, M.; KOVALENKO, Y.; SANCHEZ, I. C.; LUNA-BÁRCENAS, G. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 242-251, 2015.

LATIF, U.; AL-RUBEAN, K.; SAEB, A. T. A review on antimicrobial chitosan-silver nanocomposites: A roadmap toward pathogen targeted synthesis. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, 64, p. 448-458, 2014.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; IBARBURU, I.; DUEÑAS, M. T.; DE LA CABA, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 889-899, 2013.

LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUN, K.; KHUNTHON S.; LIMPANART, S. Influence of chitosan characteristics on the properties of biopolymeric chitosan-montmorillonite. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 22, n. 5, p. 502–508, 2012.

LIU, M.; JIA, Z.; ZHOU, C. Recent advance in research on halloysite nanotubes-polymer nanocomposite. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 1498-1525, 2014.

LOMBARDO, P. C.; POLI, A. L.; CASTRO, L. F.; PERUSSI, J. R.; SCHMITT, C. C. Photochemical deposition of silver nanoparticles on clays and exploring their antibacterial activity. **Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 33, p. 21640-12647, 2016.

LOMBARDO, P. C.; POLI, A. L.; NEUMANN, M. G.; MACHADO, D. S.; SCHMITT, C. C. Photodegradation of poly(ethyleneoxide)/montmorillonite composite films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, p. 3687-3692, 2013.

LONG, Y.; RAN, X.; ZHANG, L.; GUO, Q.; YANG, T.; GAO, J.; CHENG, H.; CHENG, T.; SHI, C.; SU, Y. A method for the preparation of silver nanoparticles using commercially available carboxymethyl chitosan and sunlight. **Materials Letters**, v. 112, p. 101-104, 2013.

LUO, C.; ZHANG, Y.; ZENG, X.; WANG, Y. The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 444-448, 2005.

MAISANABA, S.; PICHARDO, S.; PUERTO, M.; GUTIÉRREZ-PRAENA, D.; CAMÉAN, A. M.; JOS, A. Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: A review. **Environmental Research**, v. 138, p. 233-254, 2015.

MANNHEIMER, W. A. **Microscopia dos Materiais**: Uma introdução. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2002. 221 p.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, v. 67, p. 938-942, 1990.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**. Tradução de Ana Flávia Nogueira e Izilda Aparecida Bagatin. 6.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 925 p.

MITRA, T.; SAILAKSHMI, G.; GNANAMANI, A.; MANDALL, A. B. Studies on cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen. **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v. 16, n. 4, p. 755-765, 2013.

MUCHA, M.; PAWLAK, A. Complex study on chitosan degradability. **Polimery**, v. 47, p. 509-516, 2002.

OLIVEIRA, F. P. P.; PICOLA, I. P.; SHI, Q.; BARBOSA, H. F. G.; TIERA, V. A. O.; FERNANDES, J. C.; TIERA, M. J. Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: composition effects on the in vitro transfection efficiency. **Nanotechnology**, v. 24, p. 1-11, 2013.

OLUWAFEMI, O. S.; MACHOCHOKO, T.; LEO, A. J.; MOHAN, S.; JUMBAM, D. N.; SONGCA, S. P. Microwave irradiation synthesis of silver nanoparticles using cellulose from *Eichhornia crassipes* plant shoot. **Materials Letters**, v. 185, p. 576-579, 2016.

PALUSZKIEWICZ, C.; STODOLAK, E.; HASIK, M.; BLAZEWICZ, M. FT-IR study of montmorillonite-chitosan nanocomposite materials. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, p. 784-788, 2011.

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

PATRA, S.; PANDEY, A. K.; SEN, D.; RAMAGIRI, S. V.; BELLARE, J. R.; MAZUMDER, S.; GOSWAMI A. Redox Decomposition of silver citrate complex in nanoscale confinement: an unusual mechanism of formation of growth of silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 30, p. 2460-2469, 2014.

PEDRO, R. O.; SCHIMITT, C. C.; NEUMANN, M. G. Synthesis and characterization of amphiphilic quaternary ammonium chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 97-103, 2016.

PEDRO, R. O.; TAKAKI, M.; GORAYEB, T. C. C.; DEL BIANCHI, V. L.; THOMEIO, J. C.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. O. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiological Research**, v. 168, p. 50-55, 2013.

PETROVA, Y. A.; NEUDACHINA, L. K.; MEKHAJEV, A. V.; PESTOV, A. V. Simple synthesis and chelation capacity of N-(2-sulfoethyl)chitosan, a taurine derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 462-468, 2014.

RAO, N. H.; LAKSHMIDEVI, N.; PAMMI, S. V. N.; KOLLU, P.; GANAPATY, S.; LAKSHMI, P. Green synthesis of silver nanoparticles using methanolic root extracts of *Diospyros paniculata* and their antimicrobial activities. **Materials Science & Engineering C**, 2016.
Doi: 10.1016/j.msec.2016.01.072.

RAO, Y. N.; BANERJEE, D.; DATTA, A.; DAS, S. K.; GUIN, R.; SAHA, A. Gamma irradiation route to synthesis of highly re-dispersible natural polymer copper silver nanoparticles. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, p. 1240-1246, 2010.

RAY, S. S.; OKAMOTO, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 1539-1641, 2003.

RHIM, J. W.; HONG, S. I.; PARK, H. M.; PERRY, K. W. Chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, 2006.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

RODRIGUES, J. A. **Raio X: difração e espectroscopia**, São Carlos: EdUFSCAR, 2012. 51 p. (Série Apontamentos).

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, p. 33-56, 2009.

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

SEVERIN, N.; KIRSTEIN, S.; SOKOLOV, I. M.; RABE, J. P. Rapid trench channeling of graphenes with catalytic silver nanoparticles. **Nano Letters**, v. 9, p. 457-461, 2009.

SHAMELI, K.; AHMAD, M. B.; YUNUS, W. M. Z. W.; RUSTAIYAN, A.; IBRAHIM, N. A.; ZARGAR, M.; ABDOLLAHI, Y. Green synthesis of silver/montmorillonite/chitosan bionanocomposites using the UV irradiation method and evaluation of antibacterial activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 875-887, 2010.

SHUKLA, S.K.; MISHRA, A. K.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46-58, 2013.

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Purificação e Caracterização de Quitosana Comercial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Out/Dez, p. 63 - 68, 1998.

SILVA, H. S. R. C; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, R. T.; PASBAKHSH, P.; GOH, K. L.; CHAI, S. P.; ISMAIL, H. Physico-chemical characterization of chitosan/halloysite composite membranes. **Polymer Testing**, v. 32, p. 265-271, 2013.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. cap. 3, p. 67-73.

SIONKOWSKA, A.; PLANECKA, A.; LEWANDOWSKA, K.; KACZMAREK, B.; SZARSZEWSKA, P. Influence of UV-irradiation on molecular weight of chitosan. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives**, v. 18, p. 21-28, 2013.

SKOOG, D. A.; WEST; HOLLER; CROUCH. **Fundamentos de química analítica**. Tradução de M. T. Grassi. 8. ed. São Paulo: Pioneira-Thomson Learning, 2006. 1124 p.

SOHRANNEZHAD, Sh.; POURAHMAD, A.; MEHDIPOUR MOGHADDAM, M. J.; SADEGHI, A. Study of antibacterial activity of Ag and Ag₂CO₃ nanoparticles stabilized over montmorillonite. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 136, p. 1728-1733, 2015.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C.B. **Organic chemistry**. 7 ed. New York: Wiley, 2000. 1258 p.

SOUZA, R. H. F. V.; TAKAKI, M.; PEDRO, R. O.; GABRIEL, J. S.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. O. Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of chitosan on the antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Molecules**, v. 18, p. 4437- 4450, 2013.

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

SON, W. K.; YOUK, J. H.; PARK, W. H. Antimicrobial cellulose acetate nanofibers containing silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 430-434, 2006.

SZYMANSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan – a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 1819-1846, 2015.

TAKAKI, M.; PEDRO, R. O.; SOUZA, R. H. F. V.; DIAS, A. M.; GABRIEL, J. S.; TIERA, M. J.; TIERA, V. Ap. O. Synthesis, characterization and study of amphiphilic quaternary derivative of chitosan: in vitro study against *Aspergillus flavus*. **Advances in Chitin Science**, v. 14, 2014.

TAN, W.; LI, Q.; WANG, H.; LIU, Y.; ZHANG, J.; DONG, F.; GUO, Z. Synthesis, characterization, and antibacterial property of novel starch derivatives with 1,2,3-triazole. **Carbohydrate Polymers**, v. 142, p. 1-7, 2016.

THOMAS, V.; YALLAPU, M. M.; SREEDHAR, B.; BAJPAI, S. K. Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application. **Journal of Biomaterials Science**, v. 20, p. 2129-2144, 2009.

THUC, D. T.; HUUY, T. Q.; HOANG, L. H.; TIEN, B. C.; CHUNG, P. V.; THUY, N. T.; LE, A. T. Green synthesis of colloidal silver nanoparticles through electrochemical method and their antibacterial activity. **Materials Letters**, v. 181, p. 173-177, 2016.

TIERA, M. J.; QIU, X.P.; BECHAOUCH, S.; SHI, Q.; FERNANDES, J. C.; WINNIK, F. M. Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3151-3156, 2006.

TOMMERAAS, K.; VARUM, K. M.; CHRISTENSEN, B. E.; SMIDSRØD, O. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 137-144, 2001.

TOSHIMA, N.; YONEZAWA, T. Biometallic nanoparticles-novel materials for chemical and physical applications. **New Journal of Chemistry**, p. 1179-1201, 1998.

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, p. 1-20, 2013.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. **Applied Clay Science**, v. 48, p. 414-424, 2010.

UDDIN, F. Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals. **Metallurgical and Materials Transactions A**, v. 39 A, p. 2804- 2814, 2008.

VAN OLPHEN, H. **An introduction to clay colloid chemistry**. 2. ed. New York: Wiley Interscience, 1977. 301 p.

VIEIRA, C. M. F.; MONTEIRO, S. N.; DUAILIBI FH, J. Considerações sobre o uso da granulometria como parâmetro de controle de uma argila sedimentar. **Cerâmica Industrial**, v. 10, p. 23-26, 2005.

VOSS, Glenise Bierhalz. **Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores *airlift* e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro**. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

WANG, S. F.; SHEN, L.; TONG, Y. J.; CHEN, L., PHANG, I. Y.; LIM, P. Q.; LIU, T. X. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. **Polymer Degradation Stability**, v. 90, p. 123-131, 2005.

WENDLANDT, W. W. **Thermal analysis**. New York: John Wiley, 1986. 814 p.

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.

XIE, D. F.; MARTINO, V. P.; SANGWAN, P.; WAY, C.; CASH, G. A.; POLLET, E.; DEAN, K. M.; HALLEY, P. J.; AVÉROUS, L. Elaboration and properties of plasticized chitosan-based exfoliated nano-biocomposites. **Polymer**, v. 54, p. 3654-3662, 2013.

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

YOO, S. -H.; LEE, K. H.; LEE, J. -S.; CHA, J.; ARK, C. S.; LEE, H. G. Physicochemical properties and biological activities of DEAE-Derivatized *Sphingomonas Gellan*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6235 - 6239, 2005.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine source. structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 1133-1174, 2015.

YOUSSEF, A. M.; YOUSEF, H. A.; EL-SAYED, S. M.; KAMEL, S. Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 76, p. 25-32, 2015.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 394-400, 2010.

ZHANG, A. D.; DING, D. R.; REN, J. C.; ZHU, X. L.; YAO, Y. H. Synthesis, characterization, and drug-release behavior of amphiphilic quaternary ammonium chitosan derivatives. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 4, p. 39890-39899, 2014.

ZHANG, H.; SMITH, J. A.; OYANEDEL-CRAVER, V. The effect of natural water conditions on the anti- bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers. **Water Research**, v. 46, p. 691-699, 2012.

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

ZHU, J.; TIAN, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; LIU, J. Fabrication of a novel “loose” nanofiltration membrane by facile blending with Chitosan-Montmorillonite nanosheets for dyes purification. **Chemical Engineering Journal**, v. 265, p. 184-193, 2015.

ZIVANOVIC, S.; DAVIS, R. H.; GOLDEN, D. A. 8-Chitosan as an antimicrobial in food products. In: TAYLOR, M. (Ed). **Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality**. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 153-181.

ZHOU, Y.; ZHAO, Y.; WANG, L.; XU, L.; ZHAI, M.; WEI, S. Radiation synthesis and characterization of nanosilver/gelatin/carboxymethyl chitosan hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 553-560, 2012.

ZOYA, Z. R. Crystal growth of different morphologies (nanospheres, nanoribbons and nanoplates) of silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 393, p. 1-5, 2012.

APÊNDICE A

A Tabela 9 apresenta os valores dos rendimentos obtidos para cada reação realizada.

Tabela 9 - Valores de rendimento de reação para cada síntese realizada.

Reação/síntese	Polímero obtido	Rendimento (%)
Purificação	QP	89
Desacetilação	Q30des	90
Despolimerização parcial	QD30	91
	QD21	95
	QD5	94
Substituição por DEAE	QD21-40DEAE	63
	QD5-49DEAE	90
Alquilação	QD21-40DEAE-6DD	85
	QD21-40DEAE-18DD	87
	QD5-49DEAE-6DD	90
	QD5-49DEAE-17DD	90

APÊNDICE B

Espectros de UV-vis durante o processo de irradiação de todos os filmes de nanocompósitos preparados.

Figura 46 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC*/2,5% MMT, (b) QC*/2,5% MMT/NPs-Ag e (c) QC*/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 47 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC/5% MMT, (b) QC/5% MMT/NPs-Ag e (c) QC/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 48 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC*/10%MMT, (b) QC*/10%MMT/NPs-Ag e (c) QC*/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 49 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC/2,5%MMT*, (b) QC/2,5%MMT*/NPs-Ag e (c) QC/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 50 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QC/10%MMT*, (b) QC/10%MMT*/NPs-Ag e (c) QC/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 51 - Espectro de UV-vis do nanocompósito QD30/10%MMT/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 52 - Espectro de UV-vis do nanocompósito Q30des/10%MMT/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 53 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21/10%MMT, (b) QD21/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD21/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 54 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT, (b) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD21-40DEAE/NPs-Ag durante o processo irradiação.

Figura 55 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE-6DD/10%MMT, (b) QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD21-40DEAE-6DD/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 56 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE-18DD/10%MMT, (b) QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD21-40DEAE-18DD/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 57 - Espectro de UV-vis do nanocompósito QD5/10%MMT/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 58 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD5-49DEAE/10%MMT, (b) QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD5-49DEAE /NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 59 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD5-49DEAE-6DD/10%MMT, (b) QD5-49DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD5-49DEAE-6DD /NPs-Ag durante o processo de irradiação.

Figura 60 - Espectros de UV-vis dos nanocompósitos (a) QD5-49DEAE-17DD/10%MMT, (b) QD5-49DEAE-17DD/10%MMT/NPs-Ag e (c) QD5-49DEAE-17DD/NPs-Ag durante o processo de irradiação.

APÊNDICE C

Difratogramas dos filmes de nanocompósitos preparados com derivados hidrofílicos e anfifílicos de quitosana.

Figura 61 - Difratogramas dos filmes de nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag, QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag e (b) QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag, QD5-49DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e QD5-49DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag.

APÊNDICE D

Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão dos nanocompósitos QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag, QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag, QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag e QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag.

Figura 62 - Imagens de MET dos nanocompósitos (a) QD21-40DEAE/10%MMT/NPs-Ag, (b) QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag, (c) QD21-40DEAE-18DD/10%MMT/NPs-Ag e (d) QD5-49DEAE/10%MMT/NPs-Ag durante processo de irradiação.

APÊNDICE E

Espectros de UV-vis após o processo de irradiação e depois de um ano de armazenamento dos filmes QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag e QD21-40DEAE-6DD/NPs-Ag.

Figura 63- Espectros de UV-vis do filme QD21-40DEAE-6DD/10%MMT/NPs-Ag após 1,5 e 2 horas de irradiação UV e após um ano de armazenamento.

Figura 64- Espectros de UV-vis do filme QD21-40DEAE-6DD/NPs-Ag após 0,75 horas de irradiação UV e após um ano de armazenamento.