UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ELIAS ANTONIO BERNI NETO

“Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas”

São Carlos

2010

ELIAS ANTONIO BERNI NETO

“Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

São Carlos

2010

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Berni Neto, Elias Antonio.
Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas./ Elias Antonio Berni Neto; orientador Dr. Valtencir Zucolotto.-- São Carlos, 2010.
112p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de concentração: Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Nanopartículas de prata. 2. Quitosana. 3. Nanobiocompósitos. 4. Ação bactericida. I. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Elias Antonio Berni Neto

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada.

Aprovado(a) em: 02.06.2010

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Silvio Crestana

Instituição: Embrapa Assinatura_____

Prof(a). Dr(a). Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Instituição: IFSC/USP Assinatura_____

Prof(a). Dr(a). Valtencir Zucolotto

Instituição: IFSC/USP Assinatura_____

“Society speaks and all men listen, mountains speaks and wise men listen.”

John Muir - American naturalist

(1838 - 1914)

Em homenagem à minha família,
companheira e amigos que em constante
sintonia me auxiliaram na realização
deste trabalho.

Agradecimentos

À CAPES, pelo auxílio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho seria impossível.

Ao meu orientador Dr. Valtencir Zucolotto e o Dr. Cauê Ribeiro pelas frutíferas discussões científicas, ensinamentos e amizade construída durante este trabalho.

Aos alunos, técnicos e professores dos grupos de Polímeros Bernhard Gross - IFSC/USP, Biofísica - IFSC/USP e Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio - Embrapa Instrumentação Agropecuária em especial: Debora, Gi, Bel, Luana, Monise, Valerinha, Jú Cancino, Tania Giraldi, Fábio Plotegher, Wagner Moura, Henrique, Andréa, Juliano, Leo, Jesus, e tantos outros que foram importantes em etapas decisivas deste trabalho.

Ao pessoal do CUME que me proporcionaram um novo estilo de vida, em especial Julia e Animal.

Aos colegas de graduação, Fabão, Renato, Sus, Victor e todos os demais.

Aos amigos de longa data, Fael e Miga.

À minha namorada Tatiana e sua família pelo companheirismo, apoio e compreensão.

Finalmente, agradeço a meus pais Rita e Ataliba, e meu irmão Jefferson pela excelente convivência, apoio em todos os momentos e pelo aprendizado que obtive com eles durante toda a minha vida, proporcionando minha escolha na carreira científica.

Resumo

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

Neste trabalho de mestrado foram desenvolvidos nanobiocompósitos contendo quitosana (QS) e nanopartículas de prata (AgNPs) para aplicação em matrizes poliméricas com propriedades bactericidas. O trabalho foi conduzido em 4 etapas, sendo: i) a primeira referente ao estudo e escolha do melhor modo de estabilização dos colóides de prata em solução, sendo escolhido o modo de estabilização estérica com a quitosana (QS); ii) a segunda parte está relacionada com um estudo detalhado da interação entre a QS e as nanopartículas de prata (AgNPs) além da otimização da relação QS:AgNPs no nanocompósito para se obter maior ação bactericida; iii) foi também proposta uma rota de síntese na qual não se utiliza-se o Boro Hidreto de Sódio ($NaBH_4$) como redutor, composto altamente reativo, sendo utilizados o citrato de sódio e QS conjuntamente como redutores; iv) inserção do nanocompósito QS:AgNPs em uma matriz de polivinil álcool (PVA). Foram utilizadas as técnicas de espectroscopia UV-vis e FT IR, DLS, Potencial Zeta, MET, DR-X, ensaios microbiológicos de MIC, OD_{595} e teste de halo de inibição, TGA, DSC e ensaios mecânicos. Concluímos que o uso da QS como agente estabilizante em comparação ao PVA é a mais indicada, devido ao maior número de grupos funcionais interagindo com as nanopartículas de prata. O poder de ação bactericida do nanocompósito QS:AgNPs pode ser aumentado numa certa relação entre ambos, a saber 4:1 em massa. A síntese utilizando citrato de sódio e QS como redutores mostrou a possibilidade da obtenção de nanopartículas de prata pequenas, com tamanho de 2 - 5 nm com estrutura esférica ou maiores. com tamanho de 300 nm, apresentando estruturas dendríticas, dependendo apenas do tempo de reação e concentração de citrato de sódio. A última etapa revelou a possibilidade da inserção do nanocompósito no polímero PVA sem perda significativa das características térmicas e mecânicas do polímero.

Palvras-chaves: Nanopartículas de prata, quitosana, nanocompósitos e ação bactericida.

Abstract

BERNI, E. A. **Development of novel silver nanoparticles-based nanocomposites for bactericidal applications.** 2010 112 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

The work reported here was aimed at developing chitosan/AgNPs based nanobiocomposits for bactericidal applications. The studies were divided into four main steps, viz.,: i) optimization of the silver colloids stabilition process, in which the use of chitosan resulted in the best stability, ii) a detailed investigation on the interactions between chitosan and AgNPs, as well as the optimization of the chitosan :AgNPs ratio to promote the best bactericidal effect, iii) development of a new synthetic route without using $NaBH_4$, in a search for an environmentally-friendly route, and iv) incorporation of the chitosan:AgNps nanobiocomposites in a PVA matrix for application as smart food packaging. The nanobiocomposites were characterizaed via UV-vis and FT IR spectroscopies, DLS, Zeta potential, TEM and DR-X. Biological essays had also been carried out, as well as tensile-stress and thermo analyses (DSC and TGA). The best bactericidal effect was observed for a nanobiocompostie comprising chitosan:AgNPs at a ratio of 4:1 (wt/wt). The synthetic route employing sodium citrate as reducing agent resulted in AgNPs with average diameters of 2 – 5 nm, as well as bigger nanoparticles with diameters of ca. 300 nm, depending on the reaction time and citrate concentration. The incorporation of the chitosan:AgNPs composites in the PVA matrix resulted in the formation of a bactericidal composite with good mechanical and thermal properties, suitable for applications as smart food packing.

Keywords: Silver nanoparticle, chitosan, nanocomposite and bactericidal action.

Lista de Figuras

Figura 1 - Artefatos da antiguidade que continham NPs em suas estruturas, como o Cálice de Lycurgus (a) que apresentava diferentes colorações em função da luz refletida ou transmitida devido à presença de NPs metálicas. Outro exemplo são as esculturas Maias (b) que para a obtenção da coloração azul utilizavam como pigmento NPs oxidas e metálicas. Figuras retiradas do artigo *The Lycurgus Cup - A Roman Nanotechnology*[1] e da capa do livro *De Bonampak al Templo Mayor el azul Maya em mesoamérica*[2]. ..... - 23 -

Figura 2 - Representação das estruturas bases que as NPs podem formar, (a) estruturas esféricas e de tamanho reduzido 0-D, (b) estruturas com simetria cilíndrica com pelo menos o diâmetro na escala nano 1-D e (c) filmes ou discos de diferentes formas são pertencentes às estruturas 2-D. ..... - 27 -

Figura 3 - Diagrama dos diferentes estágios do processo de formação de NPs em função do tempo de reação. Também é mostrado o modo de crescimento dos *cluster* devido as inúmeras colisões oriundas do movimento Browniano. Figura retirada da Tese de Doutorado da Dr. Marcela Oliveira[67]..... - 33 -

Figura 4 - Variação da energia livre de Gibbs no processo de nucleação homogênea. A curva vermelha é referente à energia superficial dos núcleos, a curva azul corresponde à diferença de energia das fases enquanto a curva verde é a soma de ambas sendo a energia livre total relativa ao sistema..... - 37 -

Figura 5 - Representação da influência da variação da temperatura próxima do ponto de fusão. Quanto menor a temperatura menor é o tamanho do raio crítico do núcleo bem como a barreira energética a ser superada para a formação do cristal. ..... - 38 -

Figura 6 - Esquema ilustrativo mostrando as faces e conseguentemente o número de átomos em cada face de uma estrutura cristalina cfc com os índices {100} (a), {110} (b) e {111} (c). ..... - 40 -

Figura 7 - Diferentes formas de nanoparticulas (a) dependentes da relação dos planos cristalográficos {100} e {111}, os números acima das figuras são referentes a razão **100/111** e (b) de estruturas não-cristalinas. Figura retirada da Tese de Doutorado do Dr. Túlio Rocha[78]..... - 41 -

Figura 8 - Representação dos mecanismos existentes para a estabilização das NPs, (a) estabilização por forças eletrostáticas, partículas carregadas ou (b) por ação do efeito estérico. Figura retirada do manual do equipamento ZetaSizer Nano..... - 42 -

Figura 9 - Representação do monômero do polímero PVA. ..... - 43 -

Figura 10 - Estrutura química da (a) celulose, (b) quitina e (c) QS, respectivamente. Os termos x e y na QS representam a relação entre os grupos com aminas primárias e com acetoamidas respectivamente, x+y =100%. ..... - 44 -

Figura 11 - Representação das possíveis interações que molécula de QS faz consigo mesma por meio de pontes de Hidrogênio. Figura retirada do trabalho de *Molecular and Crystal Structure of Hydrated Chitosan*[101]. ..... - 45 -

Figura 12 - Esquema da possível forma de degradação da QS presente em um sistema com íons de ouro e alta temperatura. Figura retirada do artigo *Degradation Behavior of Chitosan chains in the "Green" Synthesis of Gold Nanoparticles*[85]. ..... - 48 -
Figura 13 - Esquema ilustrativo do aparato utilizado para a síntese dos nanobiocompósitos..... - 51 -
Figura 14 - Esquema representativo da oscilação da nuvem eletrônica da NP em resposta à um campo eletromagnético, geralmente luz UV - vis. ..... - 53 -
Figura 15 - Espectros de absorção no UV - vis das AgNPs, tanto estabilizada pelos polímeros QS e PVA bem como na ausência de qualquer polímero. O espectro dos íons de prata revela que realmente ocorreu a formação de NPs na síntese adotada. O *inset* mostra a absorção de uma solução de QS cerca de 10 vezes mais diluída do que a apresentada pelos nanocompósitos..... - 62 -
Figura 16 - Espectro de FTIR dos nanocompósitos de (a) QS:AgNPs e (b) PVA:AgNPs e seus respectivos polímeros puros. No nanocompósito QS:AgNPs ocorre principalmente o deslocamento e alargamento das bandas referentes as aminas. O alargamento das bandas na região de 1500 cm^{-1} e 750 cm^{-1} demonstram a interação das AgNPs com o grupo OH do PVA..... - 64 -
Figura 17 - Tamanho das partículas obtido pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (a), para os sistemas estabilizados e não estabilizado. Imagens de MET para os nanocompósitos PVA:AgNPs (b) e QS:AgNPs (c). Ambos apresentam a escala de 50 nm. ..... - 65 -
Figura 18 - Dependência do potencial Zeta em função do pH, das amostras contendo estabilizantes (QS ou PVA) e sem a presença de qualquer estabilizante. O gráfico em *inset* é com respeito à variação do tamanho das NPs em função da mudança de pH. ..... - 66 -
Figura 19 - Espectro de absorção da banda plasmônica da prata nos 4 nanobiocompósitos sintetizados e o espectro do sal de prata e QS apenas, sem redução dos íons metálicos. O gráfico em *inset* diz respeito à cinética de reação da síntese que mostra completa reação depois de 4 segundos..... - 67 -
Figura 20 - Difratograma dos nanocompósitos evidenciando a presença de prata metálica com estrutura cfc. ..... - 68 -
Figura 21 - Análise da dispersão de tamanho das partículas de duas formas distintas, por DLS (a) e imagens de MET dos 4 diferentes nanocompósitos QS:AgNPs_4:1 (b), QS:AgNPs_6:1 (c), QS:AgNPs_9:1 (d) e QS:AgNPs_11:1 (e). A escala de todas as imagens de MET são de 50 nm. .... - 69 -
Figura 22 - Variação do potencial Zeta (a) e do diâmetro normalizado (b) de todos os nanobiocompósitos ambos em função do pH..... - 70 -
Figura 23 - Espectro de FTIR para os diferentes nanobiocompósitos em função do tempo de degradação. A banda de 1562 cm^{-1} se refere ao grupo NH_2 da QS... - 71 -
Figura 24 - Absorção plasmônica em função do tempo, as amostras foram deixadas em solução e temperatura ambiente para sofrer o processo de degradação durante 25 dias. A menor absorção da banda plasmônica indica o processo de oxidação e/ou liberação de íons das AgNPs..... - 72 -

Figura 25 - Análise da forma de degradação de duas maneiras diferentes pela absorção do pico em 400 nm da banda plasmônica (a) e pelo fenômeno de aglomeração monitorado pela técnica de DLS (b). ..... - 73 -
Figura 26 - Ensaio microbiológico da ação bactericida dos nanobiocompósitos sobre a *E. Coli* em função do tempo. A ação tanto da QS pura como do nanocompósito contendo PVA foram também analisadas. ..... - 75 -
Figura 27 - Medidas da absorção da banda plasmônica para os nanobiocompósitos com diferentes massas de citrato de sódio e tempo de reação..... - 76 -
Figura 28 - Medidas de MET da amostra AM1 nas escalas de 100 nm (a) e 50 nm (b). O *inset* em (b) diz respeito à difração de elétrons confirmando a presença das Nps..... - 77 -
Figura 29 - Medidas de MET da amostra AM2 nas escalas de 500 nm (a) e 50 nm (b). A difração de elétrons presente no *inset* em (a) foi realizado sobre a área mais clara das dendritas confirmando a presença das AgNps nesta região. ..... - 77 -
Figura 30 - Medidas de MET da amostra AM3, ambas as imagens possuem a escala de 50 nm, são observados tanto aglomerados que possivelmente viriam a evoluir em dendritas (a) como AgNps bem dispersas e com tamanho médio de 10 nm (b). O *inset* em (b) mostra um dos estágios da formação de um nanotriângulo de 100 nm. ..... - 78 -
Figura 31 - Medidas de MET da amostra AM4, ambas as imagens possuem a escala de 50 nm, são observadas AgNps esféricas e majoritariamente pequenas com o tamanho de 2 a 5 nm (a) ocorrendo a presença de partículas de 10 nm (b). Estruturas dendríticas são muito pouco usuais nesta amostra, sendo mostrada a formação de uma delas no *inset* em (a). ..... - 78 -
Figura 32 - Tamanho das Nps medido por DLS em função da intensidade espalhada e o *inset* diz respeito ao tamanho em função do número de Nps. ..... - 79 -
Figura 33 - Variação do Potencial Zeta (a) e o diâmetro normalizado (b) de todos os nanobiocompósitos ambos em função do pH. ..... - 81 -
Figura 34 - Difratogramas das amostras AM1, AM2, AM3 e AM4. Os asteriscos verdes correspondem aos picos característicos da QS, 10º e 20º, de medidas feitas com o pó do polímero. Os asteriscos vermelhos correspondem aos picos da prata metálica de estrutura cfc, picos em 38,2º, 44,4º, 64,5º e 77,5º referente aos seguintes planos respectivamente {111}, {200}, {220} e {311}. ..... - 82 -
Figura 35 - Medidas de FTIR das amostras AM1, AM2, AM3 e AM4 em função do tempo de degradação. O espectro de FTIR mostra a degradação da QS na amostra AM1 pelo aparecimento das bandas em 1740 cm^{-1} e 1710 cm^{-1} referentes ao grupo COOH. A perda de interação QS/AgNPs é evidenciada pelo deslocamento da banda em 1100 cm^{-1} para comprimento menores, referente ao grupo NH_2..... - 83 -
Figura 36 - Fotos das amostras solubilizadas na concentração de 6,5 $g.L^{-1}$, logo após a solubilização (a) e com 15 dias de degradação em luz e temperatura ambiente (b)..... - 84 -
Figura 37 - Curvas de TG e DTG da QS pura, obtidas sobre uma atmosfera de ar sintético até a completa degradação do material em 600ºC. ..... - 84 -

Figura 38 -Medidas de termogravimetria das amostras AM1 (a), AM2 (b), AM3 (c) e AM4 (d). São mostradas tanto as curvas de TG com as de suas derivadas DTG. ..... - 86 -
Figura 39 -Espectros UV-vis dos filmes de PVA contendo o nanocompósito AM4, juntamente com os espectros do filme de PVA puro e do nanocompósito AM4 em solução. ..... - 87 -
Figura 40 -Curvas de TG e DTG do PVA puro, obtidas sobre uma atmosfera de ar sintético até a completa degradação do material em 600ºC. No *inset* mostra-se um ensaio de degradação do PVA em atmosfera de N_2. ..... - 88 -
Figura 41 -Curvas de TG e DTG dos filmes de PVA com o nanocompósito AM4, obtidas sobre uma atmosfera de ar sintético até a completa degradação do material. ..... - 89 -
Figura 42 -Análises de DSC do processo endotérmico de fusão (a) e do processo exotérmico de cristalização (b). ..... - 91 -
Figura 43 -Curvas dos ensaios mecânicos realizados nos filmes de PVA e AM4. ..... - 91 -
Figura 44 -Fotos do filme PVA:AM4_100:0 evidenciando o crescimento do microorganismo *E. coli*. ..... - 92 -
Figura 45 -Fotos do filme PVA:AM4_97,5:2,5 (a), PVA:AM4_95:5 (b), PVA:AM4_92,5:7,5 (c) e PVA:AM4_90:10 (d) evidenciando a ação bactericida de todos os filmes sobre o microorganismo *E. coli*. ..... - 93 -

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relação dos reagentes presentes em cada nanobiocompósito. ..... - 50 -

Tabela 2 - Relação das massas de cada reagente bem como o tempo de síntese em cada nanobiocompósito. ..... - 51 -

Tabela 3 - Relação das massas de cada reagente para a produção dos filmes. ..... - 52 -

Tabela 4 - Dados da mínima concentração necessária para inibir completamente a proliferação da E. Coli. ..... - 74 -

Tabela 5 - Dados de TGA dos filmes de PVA contendo o nanocompósito AM4. ..... - 89 -

Tabela 6- Média dos dados obtidos no ensaio mecânico. ..... - 91 -

Tabela 7 - Porcentagem da área e diâmetro de inibição dos halos contra o microorganismo E. coli. ..... - 93 -

Abreviaturas

$AgNO_3$	nitrato de prata
AgNPs	nanopartículas de prata
AuNPs	nanopartículas de ouro
Cfc	cúbica de face centrada
CSP	*Colloidal Sliver Protein*
DLS	*Dynamic Light Scattering*
DR-X	difração de raio-X
EM	Eletromagnética
EPA	*Environmental Protection Agency*
FTIR	*Fourier Transform Infrared*
LB	Luria Bertani
MCI	Mínima Concentração Inibitória
MET	Microscópia Eletrônica de Transmissão
MTP	*Multi Twinned Particle*
$NaBH_4$	boro hidreto de sódio
NH_2	amina primária
NPs	Nanopartículas
OD_{595}	densidade óptica
OH	Hidroxila
PdNPs	nanopartículas de paládio
PET	Polietileno
PtNPs	nanopartículas de platina
PVA	polivinil álcool
PVP	polivinil pirrolidona
QS	Quitosana

TGA	Termogravimetria
TiO_2	dioxide de titânio
UV	ultra violeta
UV-vis	Ultravioleta - visível

Sumário

1. Introdução ..... - 23 -
1.1 Introdução ..... - 23 -
2. Revisão Bibliográfica ..... - 27 -
2.1 Nanopartículas ..... - 27 -
2.1.1 Nanopartículas metálicas ..... - 28 -
2.2 Síntese Coloidal ..... - 32 -
2.3 Estabilizantes ..... - 41 -
2.3.1 Polivinil álcool ..... - 42 -
2.3.2 Quitosana ..... - 43 -
2.4 Nanocompósitos ..... - 46 -
2.4.1 Nanocompósitos bactericidas ..... - 46 -
3. Parte experimental ..... - 49 -
3.1 Materiais ..... - 49 -
3.2 Rotas de sínteses ..... - 49 -
3.3 Preparação dos filmes ..... - 52 -
3.4 Técnicas de Caracterização ..... - 52 -
3.4.1 Espectroscopia UV - vis ..... - 53 -
3.4.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*) FTIR ..... - 54 -
3.4.3 Espalhamento Dinâmico da Luz (*Dynamic Light Scattering*) DLS ..... - 55 -
3.4.4 Potencial Zeta ..... - 55 -
3.4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) ..... - 56 -
3.4.6 Difração de raio X (DR-X) ..... - 57 -
3.4.7 Ensaios microbiológicos ..... - 57 -
3.4.8 Análise Termogravimétrica (TGA) ..... - 59 -
3.4.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) ..... - 59 -
3.4.10 Ensaios Tensão-Deformação ..... - 60 -
4. Resultados ..... - 61 -
4.1 Síntese e Estudo da Estabilidade das Nanopartículas de Prata ..... - 61 -
4.2 Nanobiocompósito QS:AgNPs, estrutura e ação bactericida ..... - 67 -
4.3 Síntese de AgNPs utilizando um agente redutor mais brando ..... - 75 -
4.4 Caracterização de filmes de PVA contendo o nanocompósito AM4 ..... - 86 -
5. Conclusões ..... - 95 -
5.1 Conclusões ..... - 95 -
6. Trabalhos futuros ..... - 97 -
Referências ..... - 99 -
Apêndice ..... - 111 -

1. Introdução

1.1 Introdução

A intrínseca relação do homem com os materiais remonta a sua própria existência, evidenciada pelos registros históricos das primeiras tribos. Esta relação também aparece na divisão e nomenclatura de distintas épocas históricas pelo nome de um material específico, como Idade da Pedra, Idade do Bronze e Idade do Ferro, entre outras. Além do mais, o uso de novos materiais revolucionou a humanidade como um todo, não só no campo tecnológico e científico, mas impulsionando também as áreas econômicas e sociais. As ligas metálicas, juntamente com o carvão, são ótimos exemplos dessa evolução, elementos chaves da revolução industrial do século 18. Dessa forma, pode se entender que o estudo e busca por novos materiais seja algo essencial para a contínua evolução da humanidade.

Dentre os inúmeros materiais, o estudo e principalmente o uso de materiais na escala nanométrica (10^{-9} m) vem ganhando cada vez mais destaque, entretanto tais materiais não são tão novos assim. Pesquisas mostram que antigos artefatos já utilizavam nanomateriais, como o cálice de Lycurgus feito pelos romanos[1], esculturas e pinturas maias que continham pigmentos azuis, provenientes de nanopartículas (NPs) de óxidos e metais[2], ambos mostrados nas figuras 1a e 1b, e também inúmeras cerâmicas chinesas que continham NPs de ouro[3].

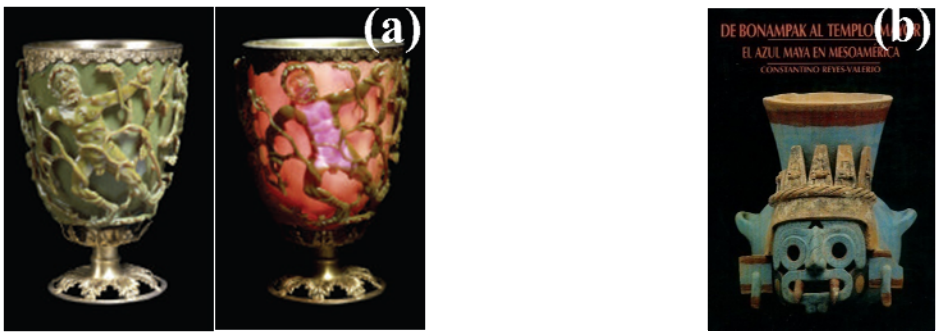


Figura 1 - Artefatos da antiguidade que continham NPs em suas estruturas, como o Cálice de Lycurgus (a) que apresentava diferentes colorações em função da luz refletida ou transmitida devido à presença de NPs metálicas. Outro exemplo são as esculturas Maias (b) que para a obtenção da coloração azul utilizavam como pigmento NPs oxidas e metálicas. Figuras retiradas do artigo *The Lycurgus Cup - A Roman Nanotechnology*[1] e da capa do livro *De Bonampak al Templo Mayor el azul Maya em mesoamérica*[2].

Um dos fatores que torna hoje a nanotecnologia e nanociência um campo promissor, é a atual capacidade de estudo e caracterização dos materiais, e também a sua manipulação mais fina, na escala nano, por meio de técnicas como a microscopia eletrônica, espectroscopias, difração de raio X, entre outras. Atualmente, efeitos como superfície plasmônica em NPs metálicas[4], possibilidade de liberação controlada de fármacos[5], aumento no poder de catálise[6] e ação bactericida e bacteriostática de nanomateriais[7], são compreendidos de uma maneira mais ampla tornando suas aplicações cada vez mais plausíveis. A descoberta de novas propriedades, ou mesmo a melhora das propriedades já existentes abriram também um imenso campo de aplicações, tanto industriais como tecnológicas e científicas. Tais possibilidades estão chamando a atenção de mercados e governos. Pesquisas realizadas pelo instituto americano *Lux Research* indicam que em 2014 a área de nanotecnologia movimentará cerca de US$ 2,4 trilhões, transformando a nanotecnologia e nanociência uma das grandes revoluções do século 21[8].

Nanomateriais, por definição, se encontram na escala de tamanho de 1 a 100 nm[9], podendo variar quanto ao seu tamanho e forma, área superficial e composição química. Em alguns nanomateriais, o número de átomos está compreendido no intervalo de 10^2 até 10^6, contribuindo consideravelmente para o aumento dos efeitos de superfície, que tem porcentagem mínima nos materiais em *bulk*. Algumas NPs, por exemplo, chegam a ter 50% dos átomos na superfície, transformando os fenômenos de superfície completamente relevantes nestes sistemas, e fundamentais para o estudo e compreensão dos mesmos. Devido ao tamanho reduzido, a razão superfície/volume aumenta muitas ordens de grandeza, em comparação àquela observada nos materiais em *bulk*, aumentando dessa forma os efeitos que ocorrem na superfície, em relação às estruturas em micro e macro escala. Utilizando a mesma quantidade de material, as nanoestruturas se mostram mais reativas, motivando assim a pesquisa destes materiais em escala nano. Outros efeitos que passam a ser relevantes são os efeitos quânticos, como o confinamento de elétrons e fônons, que podem ser entendidos pelo modelo de uma partícula presa em uma caixa, na qual ocorrem bandas discretas de energia.

Motivados pelo aumento da reatividade dos materiais em nanoescala e baseados no conhecimento da prata como agente bactericida[10, 11, 12] inúmeros pesquisadores desenvolvem nanopartículas de prata (AgNPs) para aplicações bactericidas[7, 13]. Colóides de prata apresentam ação contra uma gama enorme de microorganismos[14], como *E. coli*[10], *S. aureus*[12, 13, 14], *E. fuecium*[12], *Tuberculosis*[12], *S. pneumoniae*[12], *V. cholera*[11]. Adicionalmente, os microorganismos não apresentam aparentemente resistência às AgNPs, mesmo através de mutações, método pelo qual ocorre a resistência contra a maioria dos antibióticos. Desta

forma, o uso de AgNPs se faz uma ótima alternativa para a manufatura de materiais com ação bactericida.

As AgNPs podem ser obtidas através de rotas químicas simples, na presença ou não de um polímero estabilizante. O uso da quitosana (QS), por exemplo, se faz interessante, pois ela também apresenta ação bactericida[15] aumentando assim a ação do nanocompósito.

Nesse trabalho, apresentamos o desenvolvimento e estudo de nanocompósitos formados por AgNPs estabilizadas por dois polímeros: o polivinil álcool (PVA), e a QS. Foi realizado um estudo detalhado acerca da caracterização destes compósitos, especialmente com vistas à sua estabilidade, o que é ainda um forte limitante para suas aplicações. Além disso, os nanocompósitos foram avaliados contra o microorganismo *E.coli*, apresentando ótima ação bactericida. A possibilidade de aplicação destes nanocompósitos como aditivos em materiais de embalagem também foi avaliada, sugerindo possíveis aplicações destes nanocompósitos em dispositivos bactericidas em embalagens inteligentes.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Nanopartículas

Mesmo com uma grande gama de nanomateriais existentes, ainda é possível, por meio da manipulação de sua morfologia, alcançar novas aplicações e efeitos. De maneira geral pode-se classificar os nanomateriais em relação às suas formas em três estruturas básicas i) 0-D, ii) 1-D e iii) 2-D, como mostrado na figura 2.

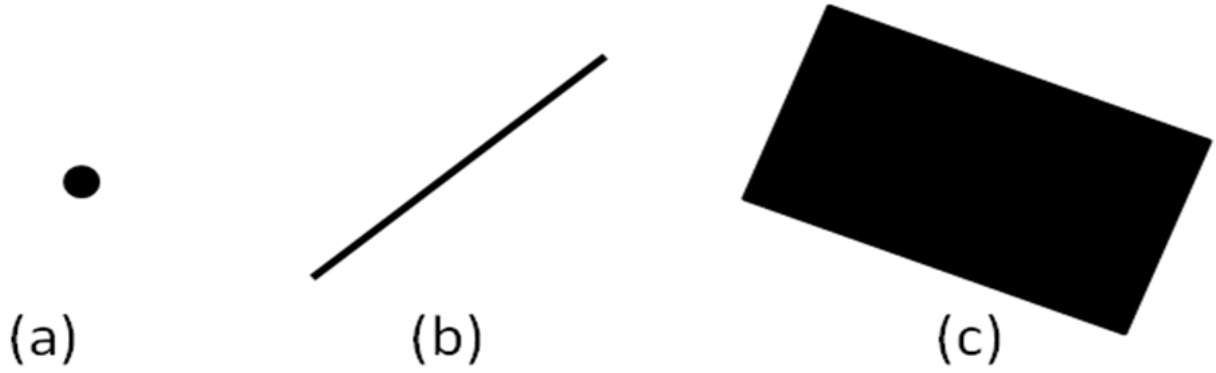


Figura 2 - Representação das estruturas bases que as NPs podem formar, (a) estruturas esféricas e de tamanho reduzido 0-D, (b) estruturas com simetria cilíndrica com pelo menos o diâmetro na escala nano 1-D e (c) filmes ou discos de diferentes formas são pertencentes às estruturas 2-D.

As partículas com estrutura 0-D são isotrópicas, apresentando forma esférica ou com múltiplas facetas, classificadas em NPs esféricas com o tamanho variando de 1 - 100 nm, ou pontos quânticos. Ambas podem ser compostas por óxidos, polímeros, ou metais e suas ligas. Dentre as NPs mais clássicas e estudadas estão as nanopartículas de ouro (AuNPs) usadas como marcadores biológicos[16], AgNPs, utilizadas como agente bactericida[12], nano-óxidos como o dióxido de titânio (TiO_2) usados como fotocatalisadores[17, 18] e/ou as NPs ferromagnéticas empregadas, por exemplo, no tratamento de células cancerígenas[19]. Os pontos quânticos são nanocristais esféricos de 1 - 10 nm, geralmente possuindo um núcleo semicondutor, como CdSe ou podem ser compostos também por metais e suas ligas[20]. Ambas as classes acima possuem o efeito de confinamento quântico. Entretanto, os pontos quânticos têm este fenômeno mais sobressalente, proporcionando assim características ópticas e eletrônicas únicas[21]. Um exemplo é a absorção e florescência fortemente dependentes do tamanho.

Os materiais 1-D são anisotrópicos, apresentando formas alongadas. Como exemplos estão os nanotubos, de carbono ou metálicos, e os nanofios e nanobastões[22]. O comprimento do eixo assimétrico pode atingir até micrometros, enquanto seu diâmetro deve se encontrar na escala nanométrica. Tais estruturas propiciam características especiais. Os nanotubos de carbono apresentam elevada condutividade elétrica e resistência elástica, diferentemente do grafite, apesar de que em ambos, o carbono apresenta uma estrutura hexagonal. Os nanofios e as NPs podem ser óxidos ou metálicos. Modificações na estrutura de AuNPs, que foram transformadas em nanofios, propiciaram o surgimento de um pico de absorção adicional em 700 nm[23], devido à estrutura anisotrópica que gera multipolos.

Os materiais 2-D são também anisotrópicos, entretanto com uma simetria planar, podendo apresentar formas de nanodiscos[24], nanoprismas triangulares ou hexagonais e filmes finos. Tais materiais apresentam características bem específicas.

Com uma variedade tão grande de nanomateriais e estruturas, era de se esperar também uma grande diversidade de métodos de obtenção dos mesmos, o que de fato ocorre. São inúmeros os métodos de produção de nanomateriais, divididos em métodos físicos (*top down*) como nanolitografia[25], co-evaporação[26], sonólise[27], ablação a laser[28] entre outros, e métodos químicos ou coloidais (*bottom up*), nos quais as NPs são formadas átomo a átomo, ou molécula a molécula. Exemplos são os métodos com *template*[29], sol-gel[30], poliol[31], microemulsão[32] e a síntese química em sistema bifásico[33]. Nos métodos *bottom up* múltiplos processos ocorrem simultaneamente, como nucleação, crescimento e aglomeração de partículas, os quais serão discutidos mais detalhadamente, uma vez que o método de síntese química foi adotado neste trabalho.

2.1.1 Nanopartículas metálicas

Dentre as NPs metálicas mais estudadas estão as AuNPs e AgNPs[34, 35, 36]. O interesse por estes metais se encontra em suas características intrínsecas, como estabilidade química, condutividade elétrica e alta atividade catalítica[6, 37, 38] e as características referentes às NPs, como interação com a luz por meio da banda plasmônica, tendo assim um grande interesse de seu uso em nanoeletrônica e área médica. Com relação às AuNPs, o interesse se concentra principalmente na construção de biossensores[39], por apresentar ótima interação com grupos

nitrila (-CN), tiol (-SH) e amina primária ($-NH_2$)[40], presentes em diversas biomoléculas, além de uma estabilidade superior às outras NPs metálicas, como as de prata. Entretanto, apesar das AgNPs sofrerem oxidação mais facilmente que as AuNPs[41], seu estudo se faz tão intenso quanto, motivado principalmente por seu efeito bactericida[11, 14, 42] e sua relativa facilidade em formar estruturas pouco convencionais, como nanoprismas[43], bem como a possibilidade de controle de novas morfologias por meio de irradiação de ondas eletromagnéticas (EM) na faixa do Ultravioleta - visível (UV - vis)[44].

A primeira síntese documentada de NPs metálicas foi realizada por Faraday[45]. Desde então, inúmeras rotas de síntese tem sido sugeridas e efetuadas[28, 46, 47], para ambos os metais prata e ouro, em busca de uma menor dispersão da morfologia, novas estruturas, ou o uso de reagentes e rotas mais amigáveis ao meio ambiente. Nesta busca, em particular para as AgNPs, foram utilizados inúmeros precursores como iodeto de prata (AgI)[47], perclorato de prata ($AgClO_4$), tetrafluorborato de prata ($AgBF_4$), hexafluorfosfato de prata ($AgPF_6$) e nitrato de prata ($AgNO_3$)[25]. Em estudo realizado por Patakfalvi, Virányi e Dákány, foi visto que os precursores $AgClO_4$, $AgBF_4$, $AgPF_6$ tinham uma rápida reação inicial para a formação das NPs. Entretanto, depois de 10 min, a velocidade sofria considerável diminuição. Por outro lado, o $AgNO_3$ possuía uma reação lenta e constante. Sendo assim, neste e em muitos outros trabalhos o $AgNO_3$ é o sal adotado, já que com uma reação mais lenta e constante, a morfologia pode ser melhor controlada por meio dos fenômenos de nucleação e crescimento das partículas.

Dentre as inúmeras rotas de síntese existentes, a mais convencional e interessante é a que usa água como meio reacional[49, 34, 50, 51, 52]. Nesta rota de síntese são obtidas NPs em forma coloidal, contendo partículas com dispersão de tamanho entre 10^{-9}m até 10^{-6}m[12, 53]. Basicamente, os colóides de prata são soluções contendo tanto AgNPs, quanto seus íons[53], com a presença ou não de algum estabilizante. Os colóides de prata foram muito utilizados no período de 1910 - 1920, revelado pelo sucesso do livro de Alfred B. Searle de 1920 sobre tal tema. Entretanto, há documentos que datam seu uso desde 1800[12]. O principal uso dos colóides de prata estava ligado à área médica, principalmente na manufatura de medicamentos como o *Lunar Caustic*, ministrado à pacientes com distúrbios nervosos, *Silver Arsphenine* para sífilis, e até o uso de colóides de prata no combate a resfriados comuns[54]. Mesmo hoje, inúmeros produtos que contém prata são comercializados, dentre eles podemos citar o tecido Leggeríssimo® da Santaconstancia Tecelagem, o desodorante Nivea *Silver Protect*, a pomada para queimaduras Silvadene, e até equipamentos da chamada linha branca, como máquinas e

geladeiras da Samsung, todas possuindo íons ou AgNPs em sua composição, e com o mesmo intuito de inibir a proliferação de microorganismos.

Vislumbrando-se a potencial ação bactericida dos colóides de prata, outros colóides foram estudados, resultando na seguinte escala de toxicidade contra microorganismos: Ag > Hg > Cu > Cd > Pb > Co > Au > Zn > Fe > Mn > Mo > Sn[55]. O primeiro estudo registrado da ação bactericida da prata foi conduzido pelo suíço Karl Wihelm Von Naegeli em 1893, sobre células eucariotas e procariotas, com a prata na forma iônica[55]. Von Naegeli quantificou que 9,2 nM de íons de prata eram suficientemente tóxicos para algas. Conjuntamente, outro fator interessante é a baixa toxicidade da prata em células animais[56].

A ação bactericida da prata cobre uma ampla gama de microorganismos, como bactétias Gram positivas/negativas[11], exemplificando: *E. coli*[10]; *S. aureus*[12, 13, 14]; *E. fuecium*[12]; *Tuberculosis*[12]; *S. pneumoniae*[12] e *V. cholera*[8]. Até mesmo a ação antiviral foi observada. Wai-Yin Sun *et al.* mostraram recentemente que concentrações de 50 μM de AgNPs são suficientes para inibir a replicação do vírus HIV-1. Testes realizados pelo mesmo grupo revelaram também a menor atividade das AuNPs para o mesmo fim, cerca de 6 a 20 % abaixo das apresentadas pelas AgNPs. Outro ponto foi o estudo e comprovação da interação da albumina humana com as AgNPs, contudo, mesmo com tal interação, a atividade antiviral foi mantida[57].

Contudo, existem alguns poucos organismos que são resistentes à ação da prata, encontrados principalmente em minas deste mineral, como *C. freundii, P. mirabilis, E. cloacae* e *K. pneumoniae*[58]. Possivelmente esta resistência seria proveniente da produção de proteínas que agiriam como quelatos, complexando a prata ou outros metais pesados no interior das células, diminuindo assim sua toxicidade[55]. Existem também organismos capazes até mesmo de sintetizar AgNPs por ação enzimática (*P. fungi*[59]) ou por redução extracelular (*F. oxysporum)*, ou por outro lado, realizar a degradação das mesmas, como a bactéria *C. violaceum*[14].

Com base nesta ação bactericida, diversos estudos utilizando AgNPs como antimicrobianos foram realizados[7, 10, 11, 12, 14, 42, 55, 57, 61, 62] e tantos outros estão em andamento. Morones *et al.*[11] observaram que concentrações de 75 $\mu g.mL^{-1}$ de AgNPs são suficientes para inibir o crescimento de *P. aeruginosa*, *V. cholera*, *E. coli* e *S. typhus.* Embora se conheça muito bem o efeito bactericida da prata, seu modo de ação ainda permanece parcialmente obscuro. Porém já se sabe que a ação da mesma está relacionada com a forma na qual ela se encontra; *bulk*, NPs ou íons[11].

Com relação às NPs, a ação está fortemente ligada ao seu tamanho, demonstrando maior reatividade as NPs menores de 5 - 10 nm[11], ou até mesmo clusters atômicos de 0,4 - 2 nm, os quais podem aumentar em muito a ação bactericida[42]. NPs de até 100 nm podem ser encontradas tanto no interior das células como em suas membranas, sendo que a interação com aglomerados maiores não foi observada[11]. A interação das AgNPs com as membranas se dá pela grande afinidade de grupos que contenham nitrogênio, enxofre e fósforo[11, 63, 64], e uma interação mais branda com o grupo hidroxila (OH)[65]. Basicamente, as AgNPs na membrana agem impedindo a respiração celular, e no interior da célula interagem com o DNA, impedindo a sua replicação[11]. Além do tamanho das NPs, sua estrutura cristalina se faz importante para a ação bactericida. Amostras com estrutura cristalina de {1,1,1} são mais reativas que as demais, devido ao número maior de átomos de prata expostos[11]. A ação das AgNPs se difere da ação de seus íons, que se caracteriza pelo desenvolvimento de uma região de baixo peso molecular no centro da bactéria, a qual se acredita que seja formada por proteínas produzidas pela bactéria, a fim de complexar os íons de prata[55].

Ressalta-se, porém, que as biomoléculas que compõem os microorganismos são as mesmas que compõem os organismos superiores, como os seres humanos. Consequentemente, é de se esperar que também ocorra interação das NPs metálicas com células humanas. A ingestão em altas concentrações de AgNPs pode gerar problemas neurológicos, nos rins, indigestão, dores de cabeça e a Argyria, patologia que pode ocasionar o azulamento da pele[66]. Contudo deve se verificar se a causa das patologias está relacionada principalmente aos íons ou às AgNPs. No século 19, o uso intenso de colóides de prata se dava por meio de um produto conhecido como *Colloidal Silver Protein* (CSP), existindo em duas formas: i) o CSP mais brando, com uma concentração de 19 - 23 % (massa/volume) de prata e baixa ionização, e ii) um tipo mais agressivo, com uma concentração de 7,5 - 8,5 % de prata e alta ionização. O colóide brando causava mínima irritação e boa ação bactericida, já o colóide agressivo causava uma maior irritação e ação antimicrobiana duvidosa[54]. Adicionalmente, não pode ser generalizado que a ingestão e/ou contato com qualquer quantidade de prata seja prejudicial, e deve ser evitado a todo custo. Segundo a *Enviromental Protection Agengy*-USA (EPA), doses de 5 $\mu g.Kg^{-1}$/dia de prata são aceitáveis com improváveis riscos para a saúde, sendo a dose limite de 14 $\mu g.Kg^{-1}$/dia. Uma pessoa com um peso de 70 Kg em uma dieta regular pode consumir até 90 µg/dia de prata[54], sendo que a prata pode ser encontrada em inúmeros alimentos como trigo (0,3 $\mu g.g^{-1}$), cogumelos (centenas $\mu g.g^{-1}$), e leite (27-54 $\mu g.g^{-1}$)[54].

Impulsionado com o descobrimento dos antibióticos e sua progressiva introdução no uso medicinal, os colóides metálicos foram progressivamente descartados. Todavia, cada vez mais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, forçando assim a procura e síntese constante de novas drogas, que muitas vezes também apresentam efeitos colaterais, e além do mais, na maioria dos casos não acompanham a velocidade de imunogenicidade dos vírus e bactérias[12]. Na busca por novos medicamentos ou materiais antimicrobianos, os colóides de prata voltam novamente a despertar o interesse da comunidade científica. Nesta linha, inúmeros trabalhos sobre nanocompósitos contendo prata têm sido publicados, sendo o foco principal a inibição de bactérias como a *E. coli* e *S. aureus*, entre outras[60], além de rotas de síntese mais brandas ao meio ambiente[46] e maneiras de se obter uma maior estabilidade das AgNPs.

2.2 Síntese Coloidal

A síntese coloidal ocorre em meio líquido, sendo uma boa maneira de se produzir NPs, ela também é conhecida como síntese de precipitação. Nesta rota de síntese ocorrem os processos de nucleação, crescimento e aglomeração, sendo que nenhum destes ainda é completamente elucidado, devido à dificuldade de se isolar cada um durante o processo. A teoria envolvida nessa rota não serve apenas para explicar a formação de NPs, mas também a transição de fase liquida para sólida de qualquer material, sejam eles metálicos, poliméricos ou cerâmicos. A obtenção de NPs, bem como as propriedades de muitos materiais em *bulk*, como dureza, ductilidade, resistência mecânica, entre outras, se dá por meio do controle destes processos.

Para o entendimento da formação de NPs são usadas duas abordagens distintas, uma relacionada à termodinâmica, e outra relacionada à cinética dos processos de nucleação e crescimento. Na fase líquida, os átomos ou partículas, devido ao movimento Browniano, sofrem inúmeras colisões uns com os outros, envolvendo simultaneamente milhares de partículas, veja *inset* da figura 3. Tais colisões produzem agrupamentos momentâneos com certo grau de ordenação. Dependendo do raio de tal agrupamento, conhecido como *cluster*, este pode se re-dissolver, ou vir a evoluir em partículas, ou um sólido. Esta dependência é determinada por fatores termodinâmicos, como temperatura de fusão e a energia livre de

Gibbs. A figura 3 ilustra os fenômenos de formação das NPs como nucleação, crescimento, *ripening* de Ostwald e aglomeração em função do tempo de reação. Os *clusters* em escala nanométrica aumentam de tamanho pelo incremento de novas partículas, enquanto a perda das mesmas ocasiona sua dissolução. Tais *clusters* constituem os núcleos, nos quais a estrutura da NP, ou nova fase, irá ser formada.

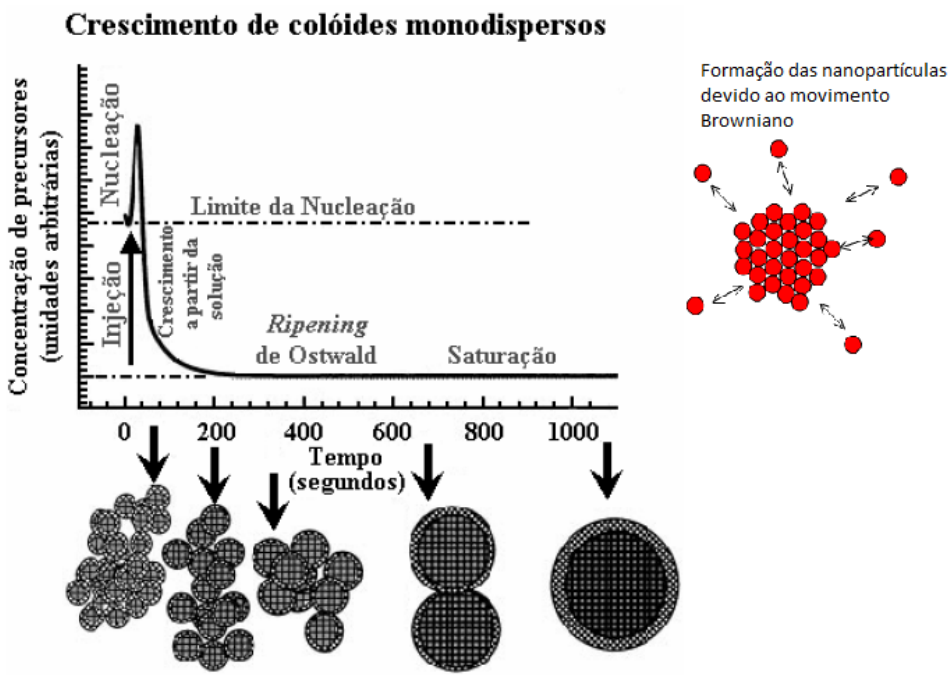


Figura 3 - Diagrama dos diferentes estágios do processo de formação de NPs em função do tempo de reação. Também é mostrado o modo de crescimento dos *cluster* devido as inúmeras colisões oriundas do movimento Browniano. Figura retirada da Tese de Doutorado da Dr. Marcela Oliveira[67].

Os produtos gerados na síntese coloidal são geralmente espécies pouco solúveis, formadas sobre condições de supersaturação. O maior controle sobre a solubilidade e supersaturação resulta em um maior número de núcleos, e consequentemente NPs menores, com uma menor dispersão de tamanho. Contudo, processos secundários podem se tornar importantes como o *ripening* de Ostwald, que é o consumo das partículas menores pelas maiores, e/ou a aglomeração, afetando drasticamente o tamanho final das NPs[68]. Na grande parte das sínteses coloidais, a condição de supersaturação é atingida por meio de uma reação química, como redução (NPs metálicas) ou hidrólise (NPs de óxidos), entre outras. Portanto, variáveis de reação como molaridade entre reagentes, ordem da adição, temperatura e velocidade das reações afetam diretamente a morfologia das NPs[69, 70]. Os processos de nucleação e crescimento de cristais são os mecanismos que controlam o tamanho e distribuição das NPs. A precipitação é iniciada pelos cristalitos formados na fase de nucleação, subseqüentemente ocorre a agregação de tais cristalitos, etapa de crescimento.

Vale ressaltar que ambas as etapas podem coexistir, entretanto o crescimento só ocorre depois da etapa de nucleação.

Na abordagem relacionada à cinética do processo de nucleação tomaremos a seguinte reação de adição como exemplo:

$$xA^{y+}_{(aq)} + yB^{x-}_{(aq)} \rightarrow A_xB_{y_{sólido}} \qquad (1)$$

No equilíbrio teremos:

$$K_{ps} = (a_A)^x(a_B)^y \qquad (2)$$

Que é o produto de solubilidade, K_{ps}, e as respectivas atividades dos íons A^{y+} *e* B^{x-} em solução. A supersaturação, *S,* nesta abordagem é dada por:

$$S = a_A a_B / K_{ps} \quad \text{ou} \quad S = C/C_{eq} \qquad (3)$$

No qual C e C_{eq} são as concentrações do soluto na saturação e no equilíbrio, respectivamente. A diferença $\Delta C = C - C_{eq}$ é muitas vezes referida como *driving force* para a precipitação, presente também na abordagem termodinâmica. O raio crítico dos núcleos formados, segundo tal abordagem, é dado por:

$$r^* = \alpha/\Delta C \qquad (4)$$

No qual o termo α é dado por $\alpha = (2\sigma_{SL}/kTlnS)\nu C_\infty$, sendo σ_{SL} a tensão superficial na interface sólido-líquido, ν o volume atômico do soluto, k a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta e C_∞ a concentração do soluto na diluição infinita. A formação ou não dos cristalitos é determinado pelo raio crítico, partículas com $r = r^*$ são as partículas de raio crítico, as com $r < r^*$ são ditas embriões, e serão dissolvidas, já as partículas com $r > r^*$ são ditas núcleos, e continuarão a crescer[71]. A energia de ativação para a formação do núcleo é dada por[72]:

$$\Delta G_{ativação} = 16\pi{\sigma_{SL}}^3\nu^2/3k^2T^2ln^2S \qquad (5)$$

Neste caso, o número de núcleos, N*, formados com o tamanho do raio crítico na condição estacionária é:

$$N^* = \frac{(dN/dt)}{V} = Aexp[-(\Delta G_{ativação})/kT] \qquad (6)$$

Com A sendo um fator pré-exponencial que geralmente assume valores entre 10^{25} a 10^{55} $s^{-1}.m^{-3}$. Outra forma de se escrever o número de núcleos é com respeito ao grau de supersaturação, que neste caso é dado por:

$$N^* = Aexp(-16\pi{\sigma_{SL}}^3\nu^2/3k^3T^3ln^2S) \qquad (7)$$

Revelando a dependência de N^* com S. A flutuação no número de núcleos é negligenciável até certo valor de S. Quando uma supersaturação crítica é atingida, a nucleação

passa a ser extremamente rápida. Dessa forma, para o aumento no número de núcleos deve-se aumentar o grau de supersaturação[71]. A equação 7 revela também que o número de núcleos é aumentado pelo aumento da temperatura, uma vez que com esse comportamento a energia de ativação da reação química é diminuída.

Outro fator importante durante o processo de crescimento das partículas é a difusão, podendo ser um fator limitante para todo o processo. Dessa forma, a presença de gradientes de concentração e/ou temperatura são extremamente importantes na síntese de NPs.

Com base na abordagem termodinâmica, assim como na abordagem dinâmica, ambas as etapas nucleação e crescimento de cristais coexistem, sendo que a nucleação é sempre a precursora. Dependendo das condições, uma das etapas pode ser predominante sobre a outra, sendo então obtidos cristais com tamanhos e formas distintas.

Numa abordagem termodinâmica para a nucleação, os núcleos de raios críticos possuem mais energia que o seu próprio *bulk* com a mesma massa e fase, devido ao aumento de sua relação superfície/volume. Uma vez que a única maneira de se obter NPs passa necessariamente pela formação dos núcleos, a síntese das mesmas só ocorrerá em sistemas supersaturados ou resfriados, devido à maior probabilidade de colisões e da diminuição da energia do sistema respectivamente. De maneira geral, o equilíbrio entre os núcleos e todo o sistema é instável, podendo, a partir de certo raio crítico, ocorrer o crescimento de uma nova fase ou formação de NPs, ou sua dissolução. Em outras palavras, a diminuição ou aumento do raio das partículas em torno do raio crítico dá início, ou não, ao processo de nucleação. Portanto, mudanças termodinâmicas que alterem a energia interna geram também mudanças no raio, e consequentemente levam à ocorrência de transformações. De modo geral, a energia da formação das partículas é governada pela energia dos núcleos. Felizmente, a nucleação é um dos raros exemplos de processos em que a energia de ativação pode ser calculada completamente em base da termodinâmica fenomenológica. Esse tratamento foi feito por Volmer e Weber em 1926, e será apresentado a seguir.

Para se melhor entender o núcleo crítico e o ambiente em que as fases estão em equilíbrio, tomaremos um núcleo qualquer em um sistema supersaturado/resfriado. Seja n o número total de moles em todo o sistema dado por:

$$n = n' + n'' + n''' \qquad (8)$$

No qual n' e n'' são os números de moles da fase inicial (íons) e nova fase (átomos no interior das partículas) respectivamente e n''' é o excesso remanescente referente à superfície do núcleo. Essa simples análise termodinâmica é possível, pois o sistema real da interface núcleo/ambiente é tomado como uma geometria imaginária de superfície, chamada *driving*

surface. Nesta análise, a superfície do núcleo referente à n''' pode estar em qualquer posição, dentro do *bulk* (interior das partículas formadas) da nova fase, ou dentro da fase atual, ou até mesmo na interface das duas. Assim, pode assumir valores positivos, negativos ou nulo. Este tratamento é somente válido para sistemas de uma componente. Para o valor nulo da *driving surface* temos uma superfície equimolecular, sendo possível tomar o tratamento do sistema como um sistema com 3 fases distintas. A partir da energia de Helmholtz, que é a soma de todas as fases (fase inicial - nova fase - fase de superfície). Impondo o ponto de mínimo da energia livre de Gibbs encontramos que as condições de equilíbrio são:

$$p' \equiv p \qquad (9)$$

$$\mu'(p') = \mu''(p'') = \mu''' \qquad (10)$$

$$p'' - p = \frac{d\phi}{dV''} \qquad (11)$$

Concluindo que a pressão externa é igual à pressão da fase inicial, o potencial químico é o mesmo para todas as fases, e a pressão da nova fase depende da energia superficial, ϕ.

Tomando os núcleos como esferas isotrópicas, temos que a energia superficial é dada por: $\phi = 4\pi r^2 \sigma_{SL}$, e o volume do núcleo dado por $V'' = 4/3\,\pi r^3$. Substituindo na equação 11 obtemos:

$$p'' - p = \frac{2\sigma}{3r} + \left(\frac{d\sigma_{SL}}{dr}\right)_S \qquad (12)$$

Esta é uma generalização da conhecida equação de Kelvin. Quando $(d\sigma_{SL}/dr)_s = 0$ temos um caso particular chamado tensão de superfície. Este termo só se faz necessário quando mudanças no raio de curvatura são introduzidas na teoria de nucleação, ou seja, os núcleos não são mais esferas isotrópicas.

Sobre condições isobáricas e isotérmicas, a diferença de energia livre de Gibbs para a formação do núcleo é dada por:

$$\Delta G(n'') = G_2 - G_1 = F_2 - F_1 + p(V_2 - V_1) \qquad (13)$$

Os índices 1 e 2 se referem aos estados inicial e final, respectivamente. Efetuando as devidas substituições concluímos que:

$$\Delta G^* = \phi^* - (p''' - p)^* V^{*''} \qquad (14)$$

Substituindo pela equação 12 obtemos que:

$$\Delta G^* = \phi^* - \left(\frac{d\phi}{dV''}\right)^* V^{*''} \qquad (15)$$

Utilizando uma aproximação plana para a interface, na qual σ_{SL} é constante temos que:

$$\phi = bV''^{2/3} \quad \text{e} \quad \left(\frac{d\phi}{dV''}\right)^* = \frac{2\phi}{3V''} \qquad (16)$$

Assim temos finalmente que a energia livre para núcleos esféricos devido a sua superfície é:

$$\Delta G^* = 4\pi r^{*2}\sigma_{SL} \qquad (17)$$

A energia referente à formação da partícula somente cresce. Entretanto, a variação total de energia livre associada à formação de uma partícula não corresponde somente à parte da tensão superficial, há também a componente devido à mudança de fase e potenciais químicos de ambas as fases em análise, os quais geralmente são representados como energia por volume, ΔG_V. Portanto, podemos escrever que a energia livre de Gibbs para um sistema em formação de núcleos em condições isobáricas e isotérmicas é dada por:

$$\Delta G = \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_V + 4\pi r^2 \sigma \qquad (18)$$

A figura 4 representa a variação da energia livre de Gibbs. Pela análise do gráfico vemos que há um ponto de máxima energia. Neste ponto são determinados o raio e a energia crítica que o núcleo pode assumir, dados por:

$$r^* = -\frac{2\sigma}{\Delta G_V} \quad \text{e} \quad \Delta G_{crítico} = \frac{16\pi\sigma^3}{3\Delta G_V^2} \qquad (19)$$

Como na abordagem dinâmica, partículas com raio $r = r^*$ são núcleos críticos, partículas com $r < r^*$ são embriões, e partículas com $r > r^*$ são núcleos, que diminuirão sua energia por meio da adesão de átomos, aumentando o seu tamanho. A barreira para a formação do núcleo crítico é representada pela quantidade $\Delta G_{crítico}$.

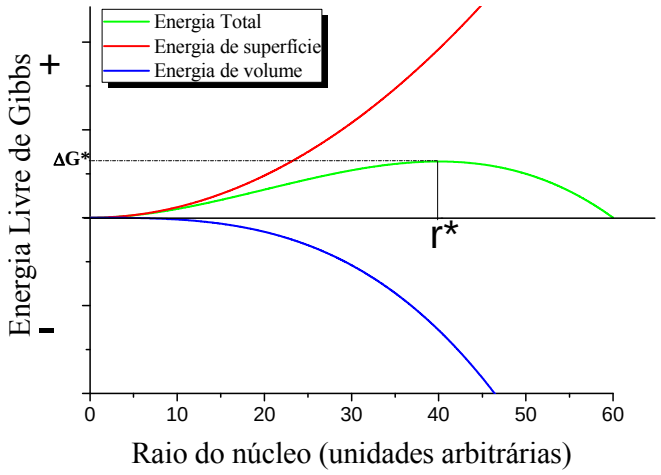


Figura 4 - Variação da energia livre de Gibbs no processo de nucleação homogênea. A curva vermelha é referente à energia superficial dos núcleos, a curva azul corresponde à diferença de energia das fases enquanto a curva verde é a soma de ambas sendo a energia livre total relativa ao sistema.

Assumimos que na fase condensada $\Delta G_V = \Delta H_V - T\Delta S_V$, na solidificação $\Delta G_V = 0$, e que em ambos a entropia e entalpia são independentes da temperatura próximo do ponto de

fusão, T_f. Desse modo $\Delta S_V = \Delta H_V / T_f$ e podemos reescrever $\Delta G_V = \Delta H_V \left(\frac{\Delta T}{T_f}\right)$ que é uma boa aproximação para esta faixa de temperatura em questão. Onde $\Delta T = T_f - T$. Com essa simples aproximação conseguimos escrever tanto o raio como a barreira crítica do núcleo em função da temperatura:

$$r^*(T) = -\frac{2\sigma T_f}{\Delta H_V (T_f - T)} \quad \text{e} \quad \Delta G_{crítico}(T) = \frac{16\pi\sigma^3 (T_f)^2}{3(\Delta H_V)^2 (T_f - T)^2} \qquad (20)$$

Substituindo $\Delta G_{crítico}$ da equação 20 na equação 18 obtemos:

$$\Delta G = \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta H_V \frac{(T_f - T)}{T_f} + 4\pi r^2 \sigma \qquad (21)$$

Ao plotarmos a equação 21 em função da temperatura, observamos que tanto o tamanho do núcleo crítico, como a barreira crítica, aumentam (figura 5). O processo de nucleação é favorecido em baixas temperaturas, efeito de super-resfriamento, a nucleação pode ser desencadeada por alguns poucos átomos que se agregam formando *clusters*. O núcleo de tamanho crítico, neste caso, é reduzido. Portanto, é mais provável a nucleação para um grande super-resfriamento, pois o raio crítico é reduzido.

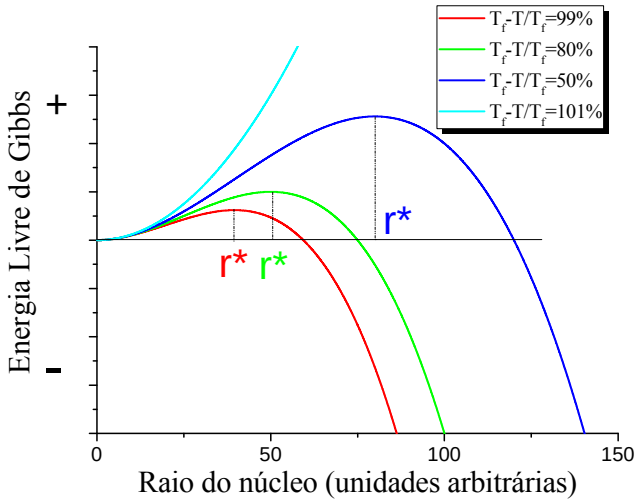


Figura 5 - Representação da influência da variação da temperatura próxima do ponto de fusão. Quanto menor a temperatura menor é o tamanho do raio crítico do núcleo bem como a barreira energética a ser superada para a formação do cristal.

Em uma primeira análise, as duas abordagens acima se mostram contraditórias, uma vez que a abordagem dinâmica mostra que o número de núcleos irá crescer à medida que o grau de saturação ou a temperatura aumentam. Enquanto que a teoria termodinâmica mostra que a formação dos núcleos, bem como a diminuição de seu tamanho, serão beneficiados em baixas temperaturas. Entretanto, deve-se notar que na teoria cinética estamos falando da energia de ativação, enquanto que na teoria termodinâmica, a energia se refere à energia livre

de Gibbs. Experimentalmente, podemos ver ambos os casos, um no qual o aumento da temperatura ajuda na ocorrência da síntese, e o outro no qual a diminuição da temperatura leva à formação de NPs menores. Na síntese de NPs metálicas utilizando redutores fortes como o boro hidreto de sódio ($NaBH_4$), a melhor distribuição e tamanho reduzidos são obtidos em temperaturas baixas, próximas de 4 ºC. Neste caso, a energia de ativação não é uma barreira grande a ser quebrada, devido ao caráter de forte agente redutor que o $NaBH_4$ apresenta, sendo mais importante o controle dos parâmetros termodinâmicos. Já na síntese utilizando redutores brandos como a QS ou o ácido cítrico, a reação só ocorre com o aumento da temperatura, corroborando com a teoria dinâmica, uma vez que a energia de ativação a ser quebrada é grande, comparada ao $NaBH_4$. Para que os redutores brandos sejam ativados como grupos doadores de elétrons na redução da prata, se faz necessário o aumento de temperatura[35, 70], ou a adição de outro composto químico, como NaOH[73], ou ambos[60]. Vale ressaltar também que as duas abordagens acima tratam apenas da etapa de nucleação, não levando em conta a etapa de aglomeração a qual possui um papel tão importante quanto a nucleação na formação das NPs[74].

Outro processo importante que tem papel fundamental na obtenção das NPs é o fenômeno de *ripening* de Ostwald, no qual as partículas menores são consumidas pelas partículas maiores durante o crescimento. Este comportamento está previsto pela equação de Gibbs-Thomson, na qual observamos que a solubilidade da partícula aumenta com a diminuição do tamanho. Nesta etapa a distribuição de partículas é dada por:

$$f(r,t) = [N^*(t)/\bar{r}(t)]p_0(\rho(t)) \qquad (22)$$

Sendo $N^*(t)$ o número de partículas nucleadas, $\rho(t) \equiv r/\bar{r}(t)$ e $p_0(\rho(t))$ a função dependente do tempo, relacionada com a dimensão absoluta dos grãos, ρ. Para a síntese de NPs pequenas e com uma baixa distribuição de tamanho, a etapa de nucleação deve ser relativamente rápida e ampla, por outro lado, a etapa de crescimento deve ser lenta[42, 75].

Assim como a termodinâmica é importante no processo de obtenção de NPs, ela também está presente no processo de aglomeração destas. As NPs coloidais são termodinamicamente muitos instáveis mesmo quando $r > r^*$, devido à minimização da energia livre de Gibbs. A energia livre de Gibbs pode ser escrita também em função da tensão superficial γ e da variação na área superficial $d\sigma$.

$$dG = \gamma d\sigma \qquad (23)$$

De acordo com a equação acima, a variação da energia livre de Gibbs será negativa quando $d\sigma$ for negativo. Logo, o sistema tende a minimizar a razão superfície/volume, ou

seja, favorece o fenômeno de aglomeração. Adicionalmente, as NPs reagem mutuamente umas com as outras devido às forças de Coulomb, tendendo a formação de aglomerados.

A minimização de energia de superfície é também importante para se explicar a formação de NPs metálicas quase-esféricas na maioria das rotas de sínteses adotadas. Para NPs no vácuo, a termodinâmica estipula que deve ser alcançada a minimização de energia superficial, que é atingida para formas quase-esféricas, uma vez que essa morfologia apresenta a menor relação área/volume. Contudo, deve-se lembrar que os metais apresentam uma estrutura cristalina bem definida, logo a energia de superfície é uma função da direção cristalográfica. Para os metais com estrutura cúbica de face centrada (cfc), caso da prata, as energias para as facetas de baixos índices seguem a seguinte sequência: $\sum 111 < \sum 100 < \sum 110$[76], já que a densidade de átomos é diferente em cada uma destas superfícies. A figura 6 exemplifica melhor cada superfície.

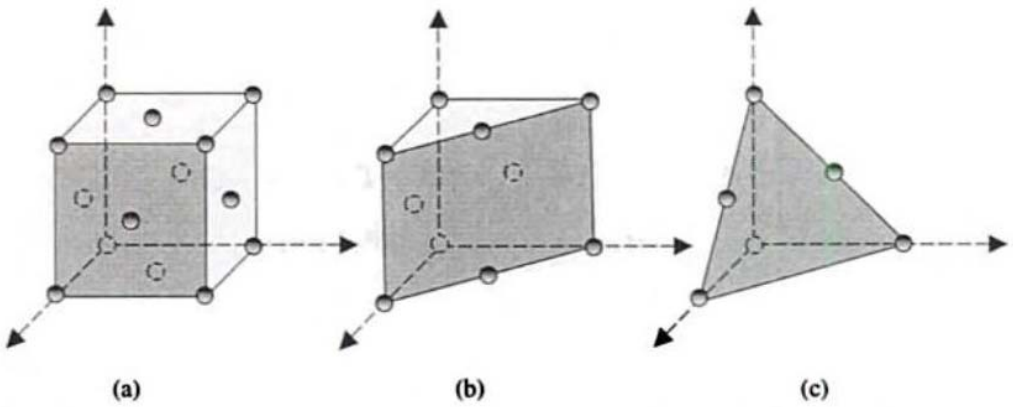


Figura 6 - Esquema ilustrativo mostrando as faces e conseguentemente o número de átomos em cada face de uma estrutura cristalina cfc com os índices {100} (a), {110} (b) e {111} (c).

A formação de NPs esféricas pequenas requer a exposição de planos cristalinos de altos índices na superfície, aumentando substancialmente a energia superficial. Pela construção de Wulf podemos obter a forma de menor energia que as NPs irão assumir. Tomando a energia de superfície como uma função cristalográfica, obteremos que a área de uma determinada faceta será inversamente proporcional à sua energia de superfície. As menores energias superficiais para metais com estrutura cfc são constituídas por uma combinação de facetas {111} e {100}. Diferentes formas possíveis para NPs com tais facetas, diferentes razões $\sum 100 / \sum 111$ são mostradas na figura 7. AgNPs apresentam a razão de $\frac{\sum 100}{\sum 111} = 1{,}1554$ para a mínima energia de superfície, tendo como forma resultante um cubo-octaedro, construído por facetas hexagonais {111} de maior área e facetas quadrangulares de {100}. Entretanto, a construção de Wulf não considera as energias associadas a arestas e

vértices, e pode não fornecer a forma de equilíbrio para partículas muito pequenas (< 3nm). Com o intuito de diminuição de energia, tendo apenas facetas {111}, pode ocorrer a formação de estruturas não-cristalográficas para partículas pequenas que por transições estruturais formam decaedros e/ou icosaedro, figura 7. Essas partículas são comumente chamadas de *Multiple Twinned Particles* (MTP)[77].

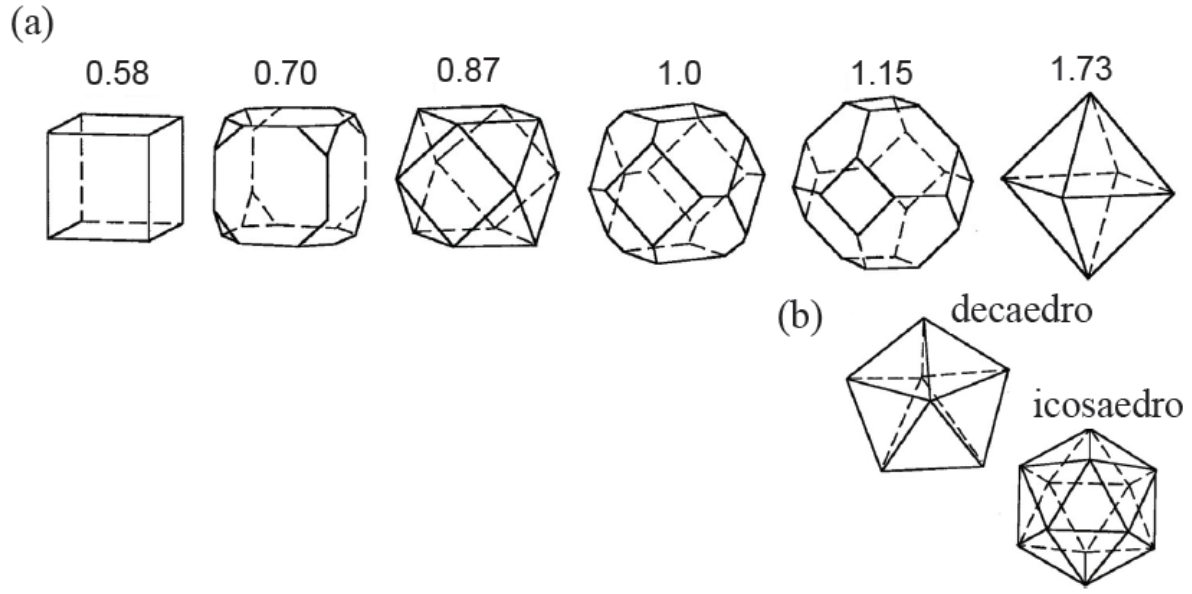


Figura 7 - Diferentes formas de nanoparticulas (a) dependentes da relação dos planos cristalográficos {100} e {111}, os números acima das figuras são referentes a razão $\sum \mathbf{100} / \sum \mathbf{111}$ e (b) de estruturas não-cristalinas. Figura retirada da Tese de Doutorado do Dr. Túlio Rocha[78].

2.3 Estabilizantes

A fim de se evitar o fenômeno de aglomeração, as NPs devem ser estabilizadas de alguma forma, durante a síntese, ou em sua estocagem, para aumentar o seu tempo de uso. A estabilidade das AgNPs pode ser atingida tanto por meio de interações eletrostáticas, na qual a estabilização ocorre por meio de cargas na superfície da NP, quanto pela interação estérica, na qual há a presença de grandes moléculas ligadas à NP, vide figura 8[79]. Grande parte dos estudos nesta área se beneficia da estabilização estérica, utilizando para isso, algum tipo de molécula orgânica como polímeros/biopolímeros[6, 35, 40, 48, 60, 73, 80-87], biomoléculas como o citrato[36, 69] ou até o uso de DNA e peptídeos[89, 90, 91]. Entretanto, outros trabalhos mostram a possibilidade da síntese de NPs estabilizadas somente por interações eletrostáticas[37, 38, 42, 75, 92 93]. Ressalta-se que a utilização somente da interação eletrostática para inibir o processo de

aglomeração não é muito indicado, já que tal inibição não é resistente a mudanças em uma ampla faixa de pH.

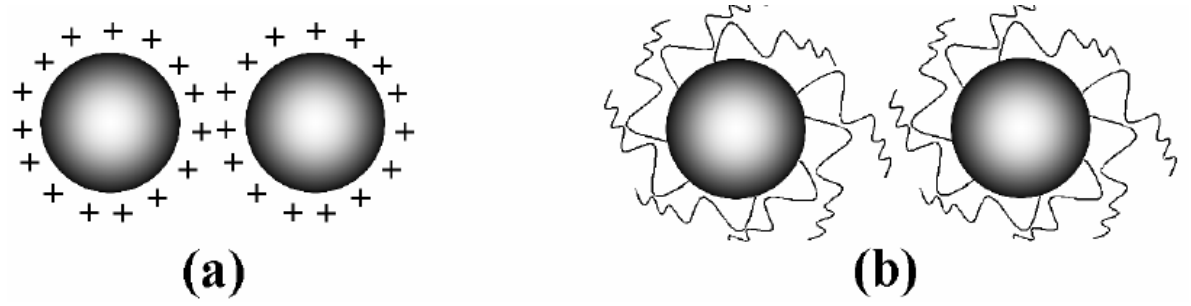


Figura 8 - Representação dos mecanismos existentes para a estabilização das NPs, (a) estabilização por forças eletrostáticas, partículas carregadas ou (b) por ação do efeito estérico. Figura retirada do manual do equipamento ZetaSizer Nano.

Motivados pela busca de processos e materiais mais amigáveis ao meio ambiente, inúmeros grupos de pesquisas optam atualmente por inibir o fenômeno de aglomeração por meio do uso de biopolímeros e polímeros biocombatíveis[6, 7, 13, 17, 35, 40, 46, 60, 65, 73, 80, 82-85, 87, 89, 90, 5, 94, 95]. Com o objetivo em comum, acerca do desenvolvimento de processos e materiais menos agressivos, nosso trabalho optou pelo uso dos polímeros PVA e QS para a inibição do efeito de aglomeração.

2.3.1 Polivinil álcool

O PVA é um polímero composto pela unidade repetitiva de fórmula [-CH_2CHOH-], figura 9, que possui risco nulo para saúde, podendo ter amplo contato com a pele e ser ingerido sem problemas[96], sendo solúvel em água a 60 ºC. O PVA é utilizado em indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, devido às suas propriedades de barreira contra umidade, oxigênio e outros agentes externos[97]. Por tais características, e por ser tão pouco reativo contra o organismo, o mesmo foi adotado como estabilizante neste, e em muitos trabalhos[65]. Com a inserção de AgNPs ocorre um aumento das propriedades térmicas do polímero, como o aumento do ponto de transição vítrea em 20 ºC, e mecânicas[65, 83]. A interação das AgNPs com o PVA se dá por meio do grupo OH[65, 83]. Em vários casos, o agente redutor utilizado para a obtenção das AgNPs em PVA é o $NaBH_4$[65] sendo geralmente obtidas NPs com diâmetro de 20 nm.

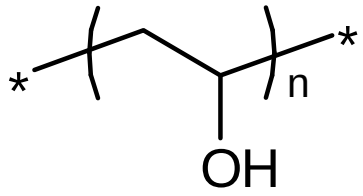


Figura 9 - Representação do monômero do polímero PVA.

2.3.2 Quitosana

A QS é um biopolímero natural obtido por meio da desacetilização da quitina, que por sua vez é obtida do exoesqueleto de artrópodes, principalmente de caranguejos, camarões e lulas. Além de apresentar ótima biocompatibilidade, apresenta também ação bactericida, sendo uma excelente alternativa no uso como estabilizante de NPs metálicas. Sua ação fungicida foi descoberta por Henri Branconnet em 1811. A quitina, assim como a celulose, é um polissacarídeo de cadeia linear e seus monômeros são compostos por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopironase, sendo a ligação entre os mesmos do tipo β (1→4). A quitina, junto com a celulose, são os polímeros mais abundantes encontrados na natureza, ocupando o segundo e primeiro lugares, respectivamente. Além disso, suas estruturas são muito semelhantes, tendo apenas um grupo funcional diferente acetoamido ($NHCOCH_3$) para a quitina e OH para a celulose, apresentando a mesma função estrutural nos organismos.

A QS, assim como a celulose e quitina, apresenta a mesma estrutura, exceto pela presença de uma amina primaria (NH_2) como grupo funcional, ao invés do grupo acetoamido ou OH, como mostrado na figura 10. Mais precisamente, a QS é toda quitina que tem 50% ou mais de grupos acetoamidos desacetilados, ou seja, pelo menos metade dos grupos acetoamidos foram transformados em aminas primárias ($NHCOCH_3 \rightarrow NH_2$)[99]. O grau de desacetilação da QS pode variar de 50 % até 90 %, e o seu peso molecular de 50 a 1000 Da.

A solubilidade da QS está intrinsecamente relacionada com o número de grupos NH_2, assim como sua distribuição na cadeia, randômica ou em blocos. De maneira geral, a QS é insolúvel em água pura, ácidos concentrados, álcool, acetona e solventes orgânicos, apresenta um pKa em torno de 6,5[98]. Entretanto, ela é praticamente solúvel em soluções de ácidos

orgânicos (acético, fórmico e cítrico) além de ácidos inorgânicos diluídos (clorídrico, perclórico ou fosfórico e nítrico) em pH menor que 6[99], uma vez que a solubilidade se dá pela protonação do grupo NH_2 convertendo um polissacarídeo em polieletrólito[99].

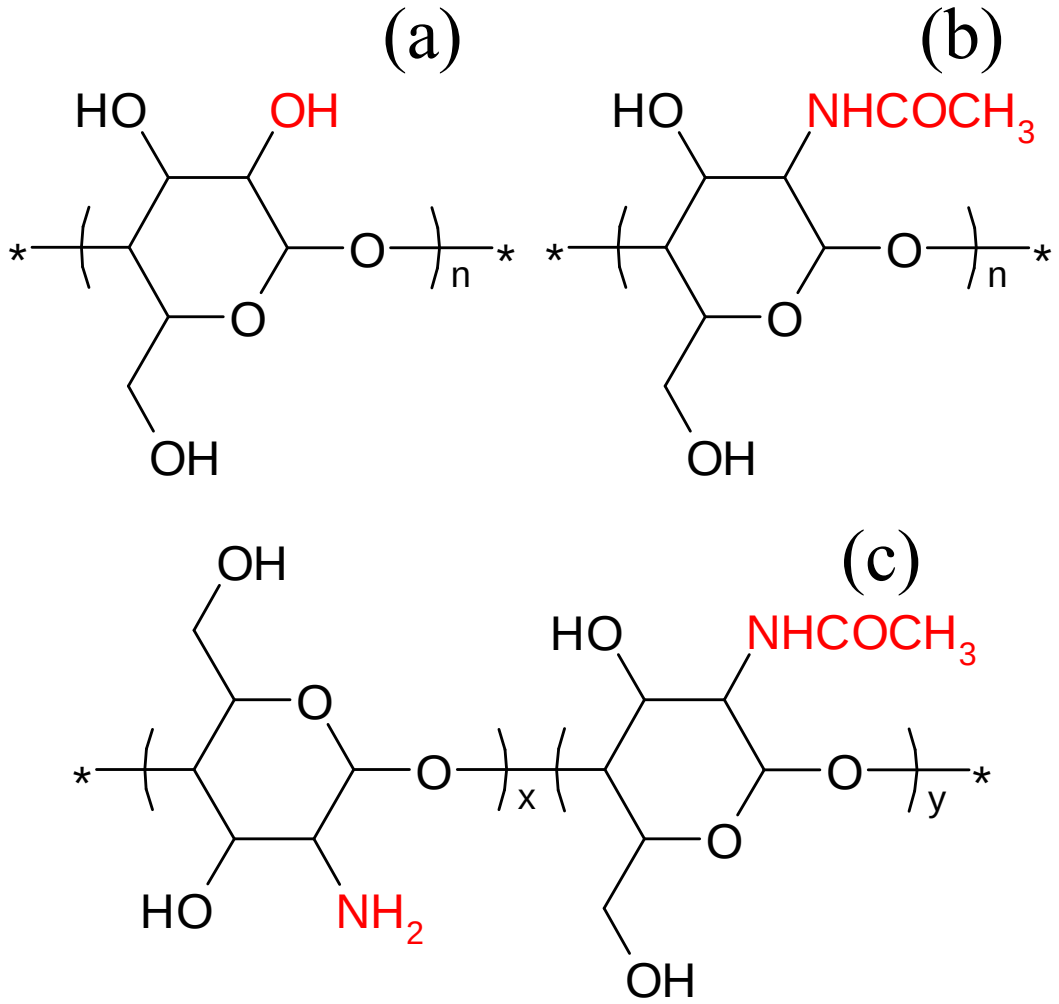


Figura 10 - Estrutura química da (a) celulose, (b) quitina e (c) QS, respectivamente. Os termos x e y na QS representam a relação entre os grupos com aminas primárias e com acetoamidas respectivamente, x+y =100%.

A QS é um polímero pseudonatural catiônico, sendo assim desejado em diversas aplicações[99]. As proteínas, por exemplo, podem também apresentar caráter catiônico, entretanto, não apresentam somente carga positiva por toda a sua cadeia. Assim como a quitina, a QS pode apresentar estrutura cristalina α ou β, ambas mantidas por pontes de hidrogênio, sendo que a estrutura α possui interações com as cadeias adjacentes, enquanto a estrutura β apresenta interações somente entre os grupos de uma mesma cadeia[99]. Ogawa, Yui e Okuyama determinaram que nos cristais de QS, os monômeros interligados por ligações glicosídicas possuem uma rotação de 180^0 entre si, sendo estabilizados por pontes de

hidrogênio entre o grupo OH do carbono 3 e o oxigênio da posição 5, como ilustrado na figura 11. Moléculas de água podem ou não ser encontradas estabilizando cristais de QS, sendo mais abundante moléculas com a presença de água[100, 101].

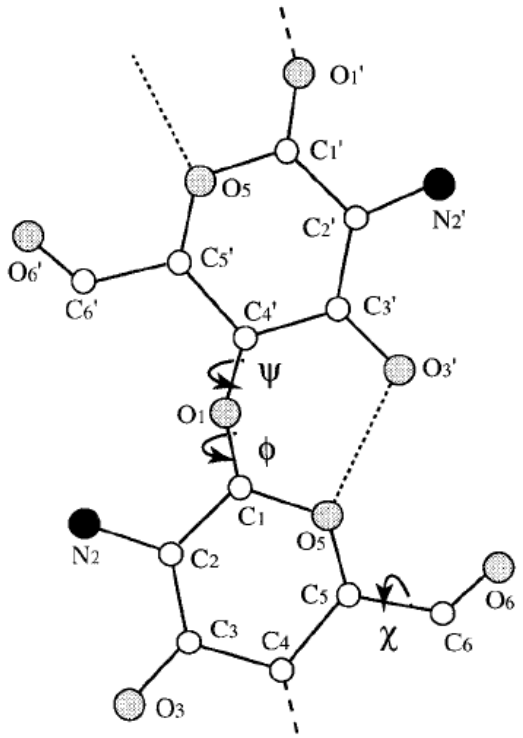


Figura 11 - Representação das possíveis interações que molécula de QS faz consigo mesma por meio de pontes de Hidrogênio. Figura retirada do trabalho de *Molecular and Crystal Structure of Hydrated Chitosan*[101].

Dentre as características mais importantes apresentadas pela QS estão: biocompatibilidade e atoxicidade, biodegrabilidade (pela ação de enzimas como lisoenzimas ou quitosanase), adesividade, capacidade de acelerar a formação de osteoblastos para a formação do osso, ação homeostática e imunoadjuvante, aceleradora no processo de cicatrização, formação de complexos, tanto com proteínas, como com metais, e sua ação bactericida e bacterisotática[102, 103, 104]. Em sua ação como quelante em íons de cobre, a complexação chega à $[Cu]/[-NH_2]=0,5$ mol/mol[99].

Neste trabalho, em particular, o uso da QS se deve à sua capacidade de quelante, bem como na ação bactericida contra uma grande gama de microorganismos. Inúmeros estudos estão sendo realizados para a melhor compreensão da ação da QS contra microorganismos[15, 105, 106], apresentando tanto ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, como *S. aureas* e *E. coli*, fungos e mesmo alguns vírus[15]. Especula-se que sua ação ocorra somente na membrana plasmática, por interações com os componentes aniônicos da mesma, por meio de grupos fosfolipídicos, ocasionando mudanças na permeabilidade da membrana[105]. A Mínima

Concentração Inibitória (MCI) para os seguintes fungos *B. cinérea*, *F. oxysporum*, *D. sorokiana*, *M. nivalis*, *P. oryzae*, *R. solani* e *T. equinum* variou de 10 a 5000 ppm[15], resultados dependentes tanto do tipo de QS, bem como do meio no qual o ensaio foi efetuado. Contra o *R. solani*, por exemplo, mostrou ação mesmo em temperaturas de estocagem de 13 ºC [15]. A faixa de MCI contra bactérias é mais estreita, *A. tumefaciens*, *B. cereus*, *C. michiganence*, *E. sp.*, *E. carotovora subsp.*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. luteus*, *P. fluorescens*, *S. aureus* e *X. campestris* com o MCI variando de 10 a 1000 ppm[15].

2.4 Nanocompósitos

2.4.1 Nanocompósitos bactericidas

A aplicabilidade dos nanocompósitos varre praticamente todos os campos da ciência e tecnologia, proporcionando aos materiais características como maior resistência térmica e mecânica[65, 108], efeito lótus[88], catálise[114], e propriedades bactericidas[11, 13, 55, 60].

A pesquisa em nanocompósitos bactericidas se baseia principalmente no uso de uma matriz polimérica e NPs metálicas e/ou cerâmicas. Dentre estas, as AgNPs são as mais útilizadas devido à sua ampla faixa de ação contra microorganismos[10, 11] e principalmente aos microorganismos mais resistentes como *S. aureus, E. fuecium, Tuberculosis, S. pneumoniae*[12], fungos como a *C. albicans*[61] *e* também contra o vírus HIV[57]. Entretanto, alguns trabalhos relatam o uso de AuNPs[115], porém sua ação é menos eficaz que a das AgNPs[57]. Alguns trabalhos relatam que se as partículas forem suficientemente pequenas, < 500 átomos, muitos outros metais, além da prata e do ouro, terão efeito bactericida, a saber: Co, Cu, Pt, Fe, Cr, Pd, Ni, Rh e Pb[42]. Já para as NPs cerâmicas tem-se como destaque o uso do TiO_2[7, 114]. Entretanto seu modo de ação se diferencia do da prata, uma vez que o TiO_2 possui uma ação bacteriostática e não bactericida, ou seja, ele apenas impede que colônias de bactérias cresçam sobre a superfície na qual ele está depositado[7]. Na presença de luz, no entanto, o TiO_2 fica mais reativo gerando radicais livres na solução, os quais podem agir sobre as bactérias. Assim, na presença de luz, o TiO_2 também se mostra bactericida. Tal reatividade se dá pela excitação dos elétrons da banda de valência (geração de buracos) para a banda de condução,

uma vez que o *band gap* é da ordem de 3 a 4 eV, suficiente para ser excitado pelo comprimento de onda da luz ultra violeta (UV)[116].

Por sua conhecida atividade bactericida, a QS é muito utilizada em combinação com inúmeras NPs[82], ou com Na-Montmorillonite, Cloisite 30B e íons de prata[13]. A presença das aminas na cadeia da QS confere propriedades de policátion em soluções ácidas, pH < 6,5, favorecendo tanto a sua ação bactericida, quanto de quelante, complexando diversos metais[35, 40, 60]. A simples adição de 2,15% (massa) de AgNPs na matriz de QS aumenta significativamente sua ação contra a *E. coli* , comparada à QS pura[60], através de uma menor concentração e maior velocidade de ação. Com o intuito de aumentar ainda mais a atividade bactericida, grupos de pesquisa desenvolveram filmes multicamadas TiO_2/ QS e heparin, os filmes foram deixados em uma solução de $AgNO_3$ por 8 h e depois mantidos na temperatura de 150ºC por 2 horas para a redução da prata, apresentando uma ótima ação sobre a radiação UV, devido à ação conjunta do TiO_2 e da prata. Na ausência de luz a ação bactericida ainda é mantida pela liberação dos íons de prata[7].

Uma vez que os nanocompósitos bactericidas são desenvolvidos para aplicações em utensílios, como embalagens de alimentos, cateter urinários[55], tecidos[73], tintas[110] medicamentos (uso tópico), a troca de redutores fortes como o $NaBH_4$, dimetilformaldeido que são muito reativos, por redutores mais brandos como açucares, citrato entre outros[46, 85] se faz cada vez mais necessária. Esta busca tem sido chamada de nanotecnologia "verde". Nesta linha, alguns grupos utilizam a QS tanto como surfactante, como redutor brando, em rotas de síntese em meios levemente básicos ou básicos, e temperaturas relativamente altas, 60ºC - 100ºC [6, 60, 84, 73]. Entretanto, altas concentrações de NaOH causam a degradação do biopolímero QS[35]. Nestas rotas são geralmente obtidas AgNPs de 1 - 20 nm, estáveis de 1 a 2 meses[6, 60, 73]. Para concentrações baixas de QS, agindo como redutor e estabilizante, a reação é mais rápida, sendo proposta a ação do grupo CH_2OH da QS como agente redutor[84]. Contudo, estudos mostram que quando a QS sofre auto-hidrólise, em altas temperaturas, gera a abertura irreversível de seu anel, fenômeno de degradação da mesma, tal fato ocorre pela oxidação do grupo CHO em COOH, figura 12[85].

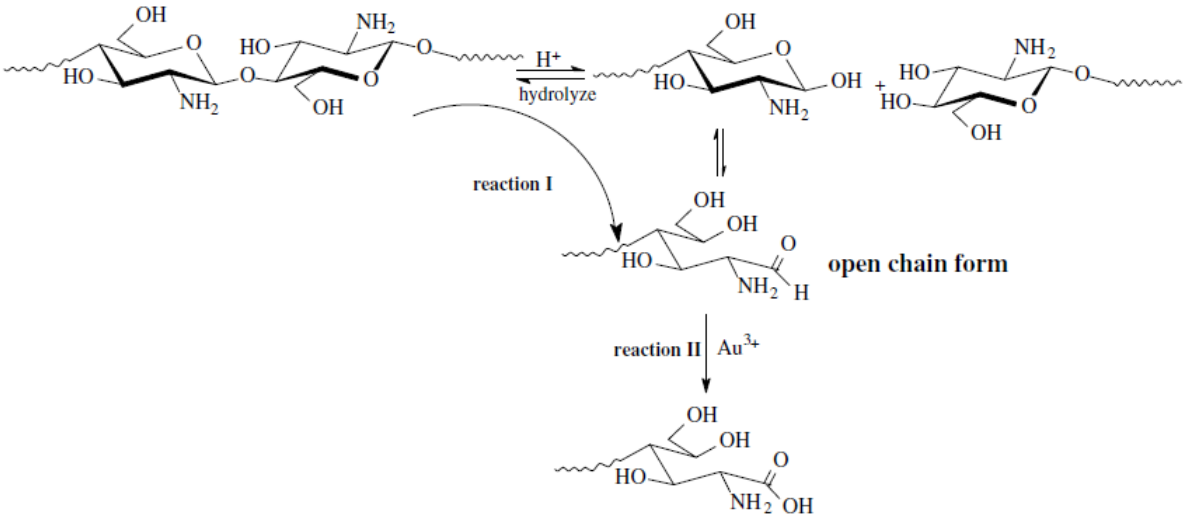


Figura 12 - Esquema da possível forma de degradação da QS presente em um sistema com íons de ouro e alta temperatura. Figura retirada do artigo *Degradation Behavior of Chitosan chains in the "Green" Synthesis of Gold Nanoparticles*[85].

3. Parte experimental

3.1 Materiais

Os materiais utilizados referem-se aos reagentes das sínteses das AgNPs. A seguir são descritos os materiais e suas origens:

-Nitrato de prata ($AgNO_3$) adquirido da Sigma Aldrich.

-Polivinil álcool - PVA, 99% hidrolisado adquirido da Sigma Aldrich.

-Boro hidreto de sódio ($NaBH_4$) adquirido da Sigma Aldrich.

-Quitosana de alto peso molecular adquirido da Sigma Aldrich.

-Citrato de sódio adquirido da LabSynth.

3.2 Rotas de sínteses

Neste trabalho, utilizamos síntese coloidal em meio aquoso, sendo utilizadas duas rotas distintas: i) utilizando o $NaBH_4$ como redutor; ii) utilizando tanto a QS como o citrato de sódio como redutores.

Antes das sínteses utilizando o $NaBH_4$, todas as soluções eram resfriadas em banho de gelo por 30 minutos e a mistura era realizada em agitadores magnéticos, sendo o agente redutor o último a ser adicionado. Para a dissolução da QS é necessário um meio ácido, assim era preparada uma solução 1 % de ácido acético e deixada sobre agitação *overnight* para completa solubilização. Para solubilizar o PVA foi necessário o aquecimento da solução a 60ºC. A relação entre $AgNO_3$ e o $NaBH_4$ foi mantida em 1:3 em massa para garantir que a quantidade de redutor seria sempre maior que a do precursor. A equação que descreve a redução dos íons de prata por meio do $NaBH_4$ é dada por:

$$2AgNO_3 + 2NaBH_4 \rightarrow 2Ag^0 \downarrow + 2NaNO_3 + H_2 \uparrow \qquad (23)$$

<u>Na primeira etapa do trabalho foram realizadas as seguintes sínteses:</u>

Síntese 1) Inicialmente foram preparadas soluções de QS e PVA (230 $mg.mL^{-1}$), $AgNO_3$ (90 $mg.mL^{-1}$) e $NaBH_4$ (540 $mg.mL^{-1}$). Posteriormente foram adicionadas alíquotas

de 80 mL das soluções de QS ou PVA e $AgNO_3$ em um béquer sob agitação, e em seguida 40 mL de $NaBH_4$. Ambos os nanocompósitos formados, QS:AgNPs e PVA:AgNPs, tem a relação em massa de 4:1, polímero:AgNPs.

Síntese 2) Foi preparada uma solução de $AgNO_3$, a 0,0375 $mg.mL^{-1}$. Em seguida, em uma alíquota de 60 mL desta solução em banho de gelo, foi adicionado 6,75 mg de $NaBH_4$. A concentração limite na síntese sem a presença de polímero foi de 0,2 $mg.mL^{-1}$, sendo que em concentrações maiores ocorria precipitação de prata micrométrica, a solução apresentava pontos negros e um filme prateado na interface ar/líquido. Assim, para evitar possíveis fenômenos de aglomeração durante as medidas foi adotada a concentração de 0,0375 $mg.mL^{-1}$. Logo após a síntese, todas as amostras foram armazenadas em freezer em frascos protegidos com papel alumínio.

Na segunda etapa do trabalho foram realizadas sínteses similarmente à etapa 1, entretanto, variou-se a relação polímero:AgNPs. Foram realizadas 4 sínteses com QS, e uma com PVA, para comparação. Em todas as sínteses foram utilizadas soluções de 85 mg/L de $AgNO_3$ e 1 g/L de $NaBH_4$. O objetivo foi o estudo do nanobiocompósito QS:AgNPs. A tabela 1 relaciona a concentração de cada reagente, sendo adicionadas alíquotas de 5 mL de estabilizante (QS ou PVA) e $AgNO_3$, e de 1,2 mL de $NaBH_4$. Como antes, todas as soluções ficaram mantidas em banho de gelo por no mínimo 30 min., para minimizar os efeitos de aglomeração.

Tabela 1 - Relação dos reagentes presentes em cada nanobiocompósito.

Amostra	QS (g. $.L^{-1}$)
QS:AgNPs_11:1	0,62
QS:AgNPs_9:1	0,48
QS:AgNPs_6:1	0,34
QS:AgNPs_4:1	0,21
PVA:AgNPs_11:1	0,62

Na terceira etapa deste trabalho foram também produzidos nanocompósitos de QS:AgNPs. Nesse caso, desejamos realizar uma síntese mais amigável ao meio ambiente, sem adição de $NaBH_4$. Necessitou-se de uma montagem experimental um pouco mais complexa, figura 13. As reações ocorreram em um balão de três bocas acoplado a um condensador, para evitar evaporação da água. Inicialmente, foram preparadas 3 soluções de citrato, nas concentrações de 0,0 $mg.mL^{-1}$, 0,5 $mg.mL^{-1}$ e 1 $mg.mL^{-1}$, que tiveram o pH corrigido para 7,2 e aquecidas até a ebulição. Em seguida, em alíquotas de 100 mL dessas soluções, adicionou-

se 200 mg de QS e 80 mg de $AgNO_3$, variando-se a massa e o tempo de reação (90 ou 600 segundos). Todos os nanocompósitos apresentavam uma proporção de 4:1 em massa de QS:AgNPs. Todas as sínteses foram realizadas em 100 mL das soluções aquosas de citrato com diferentes tempos de reação, como ilustrado na tabela 2. Em todas as síntese foram utilizadas 200 mg de QS e 79 mg de $AgNO_3$.

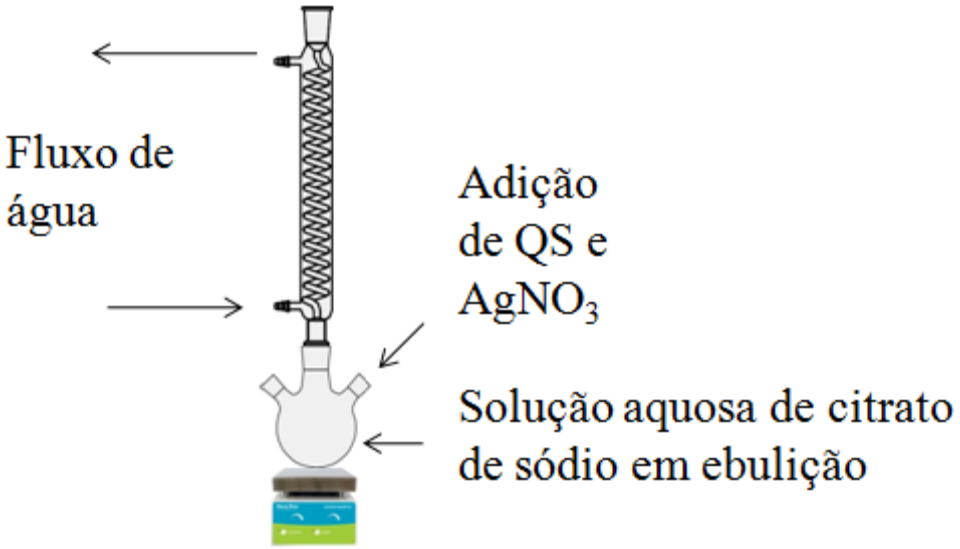


Figura 13 - Esquema ilustrativo do aparato utilizado para a síntese dos nanobiocompósitos.

Tabela 2 - Relação das massas de cada reagente bem como o tempo de síntese em cada nanobiocompósito.

Amostra	Citrato de Sódio ($mg\ mL^{-1}$)	Tempo de reação (seg)
AM1	0,00	600
AM2	0,50	600
AM3	1,00	90
AM4	0,50	90

Após a síntese, as soluções foram filtradas com filtro de 0,45 µm, depois os filtrados foram secos em estufa por 4 horas a 60ºC. Para as caracterizações espectroscópicas e morfológicas, os nanocompósitos em pó foram re-dissolvidos em uma solução de 1 % de ácido acético, já as demais medidas como difração de raio-X (DR-X) e análise térmica de Termogravimetria (TGA) foram realizadas diretamente com o pó.

3.3 Preparação dos filmes

A última etapa do trabalho consistia na preparação de filmes de PVA com o nanocompósito que apresentasse as melhores características, neste caso o AM4, sintetizado exatamente como especificado acima. Os filmes foram preparados com diferentes relações de PVA e AM4 em massa, sendo preparados 5 filmes diferentes. Após a imediata síntese do nanocompósito AM4 o pó presente na solução foi dissolvido na própria solução pela adição de ácido acético, atingindo a concentração de 1%, não sendo filtrado como antes. Com o intuito de se obter a mesma concentração final em massa em todos os filmes, diferentes massas de PVA foram dissolvidas em suas respectivas quantidades de água MilliQ e posteriormente misturadas em alíquotas da solução de AM4, dados presentes na tabela 3. Somente o filme com a maior quantidade de AM4 teve o PVA dissolvido diretamente na em sua solução.

Tabela 3 - Relação das massas de cada reagente para a produção dos filmes.

Filme	PVA (g)	Água MilliQ (ml)	AM4 (ml)
PVA:AM4_100:0	1,5000	60	0
PVA:AM4_97,5:2,5	1,4625	45	15
PVA:AM4_95:5	1,4250	30	30
PVA:AM4_92,5:7,5	1,3875	15	45
PVA:AM4_90:10	1,3500	0	60

Depois de misturados as soluções dos filmes foram colocadas sobre placas de Petri e estas acondicionadas, somente elas, em uma estufa à 40ºC por 3 dias. Depois de secos os filmes descolaram facilmente das placas e foram armazenados em sacos do tipo ZipLoc® até os ensaios térmicos, de resistência mecânica e teste de halo de inibição, os quais foram realizados com no máximo 1 semana após a manufatura dos mesmos.

3.4 Técnicas de Caracterização

3.4.1 Espectroscopia UV - vis

As propriedades ópticas das NPs metálicas são basicamente tratadas com base na eletrodinâmica clássica, pelas teorias de Rayleigh e Mie, e pela teoria quântica utilizada principalmente para explicar partículas com tamanhos inferiores a 4 nm. A mudança de cores nas NPs se origina pelo fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície, que é a excitação coletiva dos elétrons na interface entre um condutor e um isolante. O efeito de superfície plasmônica é muito sobressalente nas NPs metálicas, devido à sua razão superfície/volume. Essa excitação é gerada quando uma onda EM incide sobre uma NP metálica fazendo sua nuvem eletrônica oscilar, gerando uma freqüência de oscilação entre o núcleo e a nuvem por meio das interações de Coulomb, figura 14. Para NPs esféricas ocorre a formação de dipolos, já as NPs anisotrópicas são capazes de gerar quadrupolos ou multipolos[17]. O momento de dipolo induzido é provocado pela movimentação da nuvem eletrônica dentro da partícula na mesma freqüência que o comprimento de onda incidente, tal movimentação é gerada pela interação da onda EM com a partícula. A oscilação do dipolo induzido tem como origem a onda EM incidente, sendo que grande parte da luz espalhada possui a mesma freqüência ν_0 que a onda incidente, conhecida como espalhamento elástico. Cada comprimento de onda produz uma oscilação diferente na nuvem eletrônica, podendo ser ressonante ou não. Oscilações ressonantes transformam a energia da radiação EM incidente em energia térmica[4]. Alguns dos fatores que determinam a faixa espectral de absorção, ou seja, onde ocorre à ressonância, são: densidade eletrônica, massa efetiva e principalmente o tamanho e formato das NPs, além da sua interação com seus estabilizantes, e o meio no qual se encontram[117].

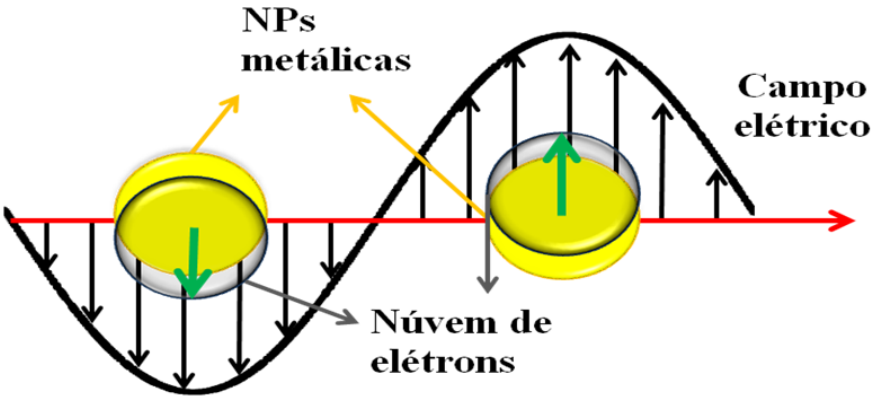


Figura 14 - Esquema representativo da oscilação da nuvem eletrônica da NP em resposta à um campo eletromagnético, geralmente luz UV - vis.

Sendo possível, em princípio a produção de qualquer forma de partícula, NPs metálicas como as de prata podem apresentar absorção por praticamente todo o espectro visível[4]. Outro ponto interessante é a possibilidade de inferir características importantes das NPs como tamanho, forma e distribuição das mesmas em solução, por meio da espectroscopia no UV-vis. Dessa forma, a espectroscopia no UV-vis é uma das técnicas utilizadas neste trabalho para identificar a existência de AgNPs, e sua estrutura básica. O equipamento utilizado foi espectrofotômetro de modelo U2800 Spectrophotometer da empresa Hitachi. Este equipamento também foi utilizado na medida de Densidade Óptica (OD_{595}) utilizada nos ensaios microbiológicos, os quais serão detalhados posteriormente. A medida de OD_{595} consistia em medir a absorbância do meio de cultura que continha tanto a bactéria *E. coli* em função do tempo, intervalos de 1 hora. A medida de absorbância era realizada no comprimento de onda específico de 595 nm, comprimento este que a *E. coli* possui uma ótima absorção.

3.4.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*) FTIR

A espectroscopia no infravermelho investiga a interação da luz com a matéria, pela absorção dos fótons com mesma energia de vibração das moléculas. A intensidade da absorção depende de quão eficiente é a transferência da energia do fóton para a molécula. As moléculas que são sensíveis à esta técnica devem ter dipolos, moléculas que não possuem mudança de dipolo devido ao campo EM aplicado são ditas inativas, exemplo de tais moléculas são N_2, H_2 entre outras, que apresentem ligações simétricas. O número de onda, utilizado nas medidas de espectroscopia no infravermelho, é dado em cm^{-1} ($cm^{-1}=1/\lambda$) que geralmente vai de 4000 cm^{-1} até 600 cm^{-1}. A região entre 4000 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} é responsável pelas assinaturas dos grupos funcionais presentes na molécula, vibrações mais energéticas. As vibrações entre 1000 cm^{-1} até 600 cm^{-1} referem-se àquelas com mudança nos ângulos entre os átomos. A espectroscopia no infravermelho neste trabalho será utilizada com dois enfoques principais, o primeiro é na determinação das interações das AgNPs com o polímero, por meio

do deslocamento de bandas de grupos funcionais específicos, e também da investigação da degradação dos polímeros por meio do surgimento de novas bandas.

O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Thermo Nicolet Nexus 470 FTIR.

3.4.3 Espalhamento Dinâmico da Luz (*Dynamic Light Scattering*) DLS

Esta técnica mede o tamanho das partículas por meio do espalhamento de luz em um modelo de uma esfera difusa que se movimenta em meio aquoso devido ao movimento Browniano, de maneira que a velocidade da partícula no meio determina o seu tamanho. Uma fonte laser incide sobre a amostra que espalha a luz. Esse padrão de espalhamento é projetado em um anteparo e a aquisição dos dados é tomada em função do tempo. Dessa forma são analisadas as flutuações devido ao espalhamento da luz, estimando assim a velocidade das partículas em solução. Com estes dados, e utilizando a equação de Stokes-Einstein é possível estimar o raio hidrodinâmico das partículas.

O equipamento utilizado foi o Zeta Sizer Nano ZS da Malvern Instruments, capaz de determinar tamanhos de partículas desde 0,6 nm até 6 μm.

3.4.4 Potencial Zeta

Todas as partículas em suspensão apresentam um determinado valor para o potencial Zeta, e com o conhecimento deste, é possível caracterizar se um colóide é estável ou não. A estabilidade total de uma suspensão depende do seu potencial total, que é a soma do potencial devido ao solvente, do potencial atrativo e do potencial repulsivo, que contém o termo de potencial Zeta (ζ), de acordo com a teoria DVLO (oriundo do nome dos cientistas Derjaguin, Verwey, Landau e Overbeek). Para não ocorrer o fenômeno de aglomeração o potencial repulsivo deve ser maior que o potencial atrativo. A estabilidade de partículas em soluções ocorre quando o valor do potencial Zeta é de $\zeta \leq -30mV$ ou $\zeta \geq 30mV$, caso contrário, $-30mV \leq \zeta \leq 30mV$ a aglomeração das partículas irá ocorrer, sendo a velocidade de aglomeração aumentada quanto mais próximo de zero for o potencial Zeta. Conhecendo o

valor do potencial Zeta em função do pH é possível determinar qual a faixa ideal de trabalho do colóide.

A medida de potencial Zeta também ocorre pelo espalhamento dinâmico da luz, contudo neste caso a cela na qual se encontra a solução a ser determinada o potencial Zeta é composta por dois eletrodos, nos quais uma diferença de potencial (ddp) é aplicada, a qual gera uma movimentação das partículas em solução. Com o espalhamento de luz determina-se a velocidade das partículas em função da ddp, e conhecendo a viscosidade e a constante dielétrica do material se obtem o valor do potencial Zeta. O equipamento utilizado na medida do potencial Zeta é o mesmo utilizado nas medidas de DLS, o Zeta Sizer Nano ZS da Malvern Instruments.

3.4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de MET são formadas por elétrons que atravessam a amostra carregando toda a informação do volume analisado. O contraste presente nas imagens (contraste entre claro e escuro) é majoritariamente proveniente de três mecanismos: i) contraste de massa e espessura, que esta relacionado com a seção de choque de espalhamento elástico. Esta seção de choque depende do número atômico do átomo espalhador (proporcional à Z^2) assim, regiões com átomos de maior numero atômico aparecem mais escuras, ii) contraste de difração causado por orientações cristalográficas ou por perturbações locais da estrutura cristalina da amostra, e iii) contraste de fase produzido pela modulação em fase do elétron, visto como onda quando é refratado pelo material. Este último mecanismo é o predominante na MET de Alta Resolução.

As amostras utilizadas neste trabalho foram depositadas em uma grade de cobre revestida de carbono, com posterior evaporação do solvente. Contudo, no caso de soluções aquosas, a hidrofibicidade do filme de carbono sobre a grade juntamente com a alta tensão superficial da água geram um menisco que se movimenta à medida que a amostra vai evaporando ocasionando assim uma possível aglomeração das NPs.

O equipamento utilizado é um CM 120 da Philips, pertencente ao CCDM da UFSCar.

3.4.6 Difração de raio X (DR-X)

O uso da técnica de DR X permite o conhecimento da estrutura cristalina das NPs, sendo importante para confirmação da existência de NPs, e também para o estudo da dependência da estrutura cristalográfica com a síntese. Ressalta-se que a análise de difratogramas para partículas muito pequenas não é de fácil interpretação, uma vez que os padrões de DR-X são dependentes do tamanho das NPs, e que pode ocorrer a contração da rede pela alta pressão superficial, levando à posição e largura de picos anômalas. NPs muito pequenas podem apresentar inúmeras facetas, sendo chamadas de *Multi Twinned Particle* (MTP), apresentando assim formas externas diferentes. Há 4 explicações primárias para tais partículas: i) erros durante o processo de crescimento; ii) equilíbrio intrínseco de estruturas com menor energia em cristais muito pequenos; iii) transformação de fase para rômbica ou ortorrômbica; iv) fenômenos cinéticos, crescimento do cristal ao redor de um eixo de simetria. Adicionalmente pode ocorrer a presença de estruturas não-cristalinas estáveis para as NPs, como dodecaédricas e/ou icosaédricas. O surgimento de picos anômalos está também ligado à heterogeneidade estrutural.

O equipamento utilizado nestas análises foi o LABX XRD-6000 da empresa Shimadzu.

As medidas foram realizadas tanto em filmes do tipo *cast* depositados em substratos de vidro e depois fixados no porta-amostra, como pela compactação do pó em um porta-amostra específico.

3.4.7 Ensaios microbiológicos

Nos ensaios microbiológicos, realizamos inicialmente o teste de Mínima Concentração Inibitória (MCI), no qual concentrações de 10 $\mu g.mL^{-1}$ até 150 $\mu g.mL^{-1}$ do nanocompósito foram testadas. Este teste consistia em adicionar 20 µL de uma solução de *E. coli* (na qual o número de colônias da bactéria estava saturado) juntamente com até 300 µL da solução a ser testada, partindo de uma solução inicial de $4g.L^{-1}$, em tubos de ensaios contendo 10 mL de

uma solução com o meio de cultura específico do microorganismo, Luria Bertani (LB). Estes tubos de ensaios foram deixados a 37ºC, por um período de pelo menos 10 horas. Pela turbidez das soluções determinava-se a ocorrência ou não da proliferação da bactéria. Tubos de ensaios turvos continham inúmeras colônias de microorganismos, significando a ocorrência da proliferação. O segundo ensaio foi o monitoramento do crescimento das bactérias em concentrações específicas do nanocompósito, teste de Densidade Óptica, monitorando a absorção no comprimento de onda de 595 nm (DO_{595}), faixa que a *E. Coli* possui uma ótima absorção. As concentrações foram estipuladas com base nos dados encontradas pelo teste MCI. Para a comparação do aumento da ação da QS e AgNPs em conjunto, foram também testadas soluções de PVA:AgNPs e QS pura. Em ambos os testes foi utilizado o meio de cultura LB e a incubação foi a 37ºC.

Todas as amostras partiram de soluções iniciais com concentração de 4 $g.L^{-1}$, para que, através de alíquotas de no máximo 300 µL de amostra, fosse possível atingir uma concentração final de 150 $\mu g.mL^{-1}$. O estudo de AgNPs puras não foi realizado devido a impossibilidade de sintetizar AgNPs sem estabilizantes em alta concentrações. A máxima concentração de AgNPs sem estabilizantes alcançada neste trabalho foi de 200 $\mu g.mL^{-1}$. Assim, para a concentração mais baixa, 10 $\mu g.mL^{-1}$, necessitaríamos de 500 µL de solução. Infelizmente o meio LB não poderia ser dissolvido na solução de AgNPs, pois este necessita ser esterilizado a uma temperatura de 120^0 e a uma pressão de 1 $kgf.cm^{-2}$, e nestas condições as AgNPs livres seriam severamente modificadas.

Um terceiro ensaio microbiológico investigou a ação das AgNPs incorporadas como aditivos em filmes de PVA. Nesse caso, utilizou-se o teste de halo de inibição. Foram cortados 3 círculos de cada filme com diâmetros de 12 mm. É necessário que os filmes sejam esterilizados, contudo nas condições de esterilização da auto-clave, temperatura de 120^0 e uma pressão de 1 $kgf.cm^{-2}$ em atmosfera úmida, os filmes de PVA provavelmente solubilizariam. Assim cada amostra circular de filme foi colocada em tubos *eppendorf* e lacrados com *parafilm*. Devido a alta temperatura ocorreram modificações no filme como a sua coloração, que passou a ser mais sobressalente para o amarelo, possivelmente tanto o número, quanto o tamanho das AgNPs aumentaram, devido ao aumento de temperatura.

3.4.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise TGA consiste no monitoramento da variação da massa de um material em função da temperatura, em uma atmosfera controlada, geralmente de Nitrogênio ou Ar. Neste trabalho, análises de TGA foram realizadas para determinar a influência das AgNPs na temperatura de degradação da QS, além de ser possível estimar-se a quantidade de material inorgânico, no caso AgNPs, que foi incorporado na matriz polimérica.

O equipamento utilizado foi uma balança termograviométrica modelo TGA Q500, TA Instruments-USA, com taxa de variação da temperatura de 10ºC.min^{-1}, razão de aquecimento mais adequada no estuda de QS[119], desde temperatura ambiente até 600ºC. A atmosfera utilizada foi de Ar sintético na amostra, e de nitrogênio na balança, ambas com vazão de 60 mL.min^{-1}.

3.4.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise DSC utilizada neste trabalho está baseada no fluxo de calor, na qual é medida a diferença de temperatura entre a amostra e a referência, enquanto ambos são submetidos a um ambiente com a temperatura rigorosamente controlada. Neste ensaio a amostra foi acondicionada em uma panelinha de alumínio e a referencia consistia de uma mesma panelinha só que vazia. Cada uma das capsulas foi posicionada sobre discos termoelétricos e aquecidas por uma única fonte de calor, de uma temperatura de 10ºC até 240ºC, o fluxo de calor diferencial sobre as amostras é controlado por meio de termopares. A diferença de temperatura entre os discos é proporcional a variação de entalpia. Com o uso desta técnica foi possível realizar o estudo da mudança sobre os processos de fusão e cristalização dos filmes de PVA após a adição do nanocompósito AM4, o qual continha QS:AgNPs na proporção de 4:1.

O equipamento utilizado foi o calorímetro modelo Q200, TA Instruments-USA, com taxa de variação da temperatura de 10ºC.min^{-1}, começando em uma isoterma de 2 min em 10ºC, depois a atingindo a temperatura de 240ºC, e outra isoterma de 3 min na maior

temperatura e voltando novamente para 10ºC. A atmosfera utilizada foi de Ar sintético na amostra, e de nitrogênio na balança, ambas com vazão de 60 $mL.min^{-1}$.

3.4.10 Ensaios Tensão-Deformação

As propriedades mecânicas dos polímeros, como tensão de ruptura, módulo de eslaticidade, elongação, entre outras, possuem um grande interesse científico - tecnológico, devido as diversas exigências que os mesmos devem atender para determinados usos. O conhecimento dessas propriedades permite a comparação entre os diversos polímeros exitentes, bem como o efeito que cargas, como no caso deste trabalho, nanocompósito de QS e prata, podem gerar no polímero, afetando de maneira positiva ou não o material. Neste tipo de análise os resultados são expressos em curvas do tipo Tensão (MPa) *versus* Deformação(%). Sobre os corpos de prova são aplicadas forças controladas de tração, flexão ou compressão, até um valor pré - determinado, ou ruptura do mesmo. O ensaio mecânico apresentado neste trabalho consistiu no estudo do comportamento dos filmes quando estes eram submetidos a trações mecânicas, para verificar o efeito da inserção do nanocompósito na matriz polimérica. Para o ensaio, foram cortados 5 corpos de prova no modelo de gravata, com dimensões de 3,16 mm x 12,60 mm. A espessura de cada filme foi medida individualmente por meio de um micrometro analógico. A velocidade de tração dos ensaios foi de 5 mm/min e a cela de carga utilizada foi a Tr21 (50 kgf). O equipamento utilizado foi a máquina de ensaio EMIC, linha DL2000.

4. Resultados

4.1 Síntese e Estudo da Estabilidade das Nanopartículas de Prata

A primeira etapa do trabalho consistia na síntese de AgNPs estabilizadas com QS, PVA, ou sem estabilizantes, com o objetivo de investigarmos principalmente suas estabilidades. Os espectros UV-vis das três soluções são apresentados na figura 15. Como a QS apresentou uma grande absorção na faixa de 190 nm a 230 nm, *inset* da figura 15, as medidas foram realizadas em uma faixa de 230 nm a 800 nm, pois na região de 200 nm, mesmo com os recursos de linhas de base do equipamento, as medidas nesta faixa não foram totalmente confiáveis. Todos os espectros mostraram uma única banda centrada em 400 nm, característica de AgNPs com formato esférico. O espectro de ambas as solução mostram-se semelhantes, com uma largura de banda relativamente estreita, sendo a mais estreita apresentada pelas AgNPs estabilizadas com QS. O espectro da solução de íons de prata também é mostrado na figura 15. Na comparação entre os espectros, observa-se um leve deslocamento da banda plasmônica das NPs recobertas com PVA e QS, para maiores comprimentos de onda, em relação à solução que apresenta somente AgNPs, sem estabilizante. Tal fato pode estar associado tanto à interação polímero:NPs, que gera mudanças na banda plasmônica ressonante, ou à diferença de tamanho das NPs entre os sistemas, revelando que possivelmente as NPs estabilizadas mostraram um maior tamanho que as AgNPs livres.

No trabalho de Mbhele *et. al*[65], foi observado o aumento no diâmetro de 5 nm para 20 nm das AgNPs, depois de incorporadas no polímero PVA, sendo feita primeiramente a síntese do colóide sem a presença de nenhum estabilizante, para depois incorporar as NPs na matriz de PVA. A presença do ombro por volta de 260 nm se refere a *clusters* quânticos (partículas de 1 - 2 nm); tais estruturas apresentam também picos em 211 nm e 227nm[42].

Levando-se em conta que a primeira etapa da síntese utilizando o $NaBH_4$ leva a formação de NPs de 2 a 3 nm[74], é de se esperar NPs com esse tamanho em todos os nanocompósitos, o que de fato ocorreu, figura 17b e 17c. Mesmo para uma maior concentração de $AgNO_3$ nas amostras contendo estabilizantes (410 $\mu g.mL^{-1}$ c/ QS e PVA) e 37,5 $\mu g.mL^{-1}$ (s/ estabilizante), observamos nos espectros apenas um pequeno deslocamento

para o vermelho, para as amostras com estabilizantes, em relação à amostra sem estabilizantes, figura 15. Levando em consideração que quanto maior o número de precursores, maior é o grau de saturação, e consequentemente, maior serão as NPs e o deslocamento da banda plasmônica para o vermelho, pode se inferir que o tamanho das partículas nas três amostras foi relativamente próximo, fato confirmado pelo DLS, figura 17.

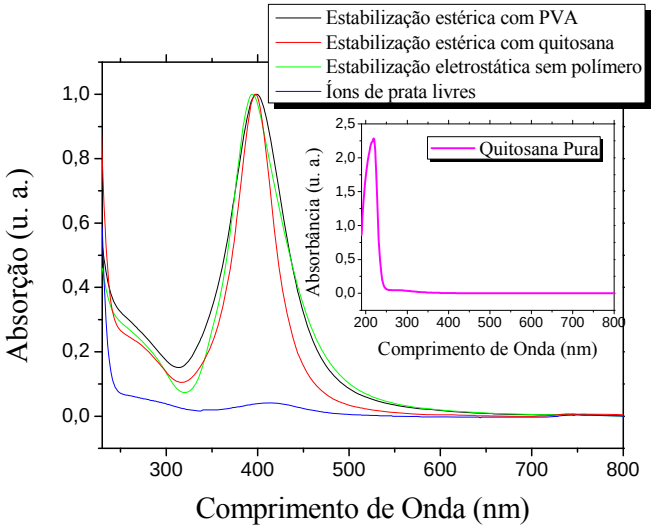


Figura 15 - Espectros de absorção no UV - vis das AgNPs, tanto estabilizada pelos polímeros QS e PVA bem como na ausência de qualquer polímero. O espectro dos íons de prata revela que realmente ocorreu a formação de NPs na síntese adotada. O *inset* mostra a absorção de uma solução de QS cerca de 10 vezes mais diluída do que a apresentada pelos nanocompósitos.

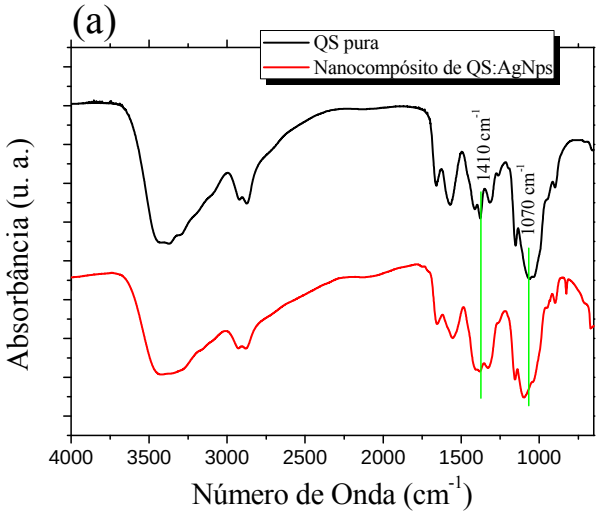
O estudo das interações entre AgNPs e os polímeros estabilizantes foi realizado utilizando-se espectroscopia FTIR, através da comparação entre o polímero puro e o nanocompósito. Para a análise foram produzidos filmes do tipo *cast* sobre lâminas de vidro recobertas com ouro, para medidas no modo refletância. Os espectros dos nanocompósitos de QS:AgNPs e PVA:AgNPs estão plotados nas figuras 16a e 16b, respectivamente.

A QS pura mostrou uma banda larga centrada em 3390 cm^{-1} e um ombro em 3310 cm^{-1} referentes aos grupamentos amina primária (NH_2) e secundária (NHR), sendo que o ombro em 3310 cm^{-1} também pode ser atribuído ao grupamanento OH.

O nanocompósito QS:AgNPs apresentou uma única banda em 3350 cm^{-1}, sugerindo a interação das AgNPs com algum desses grupos. A banda em 1560 cm^{-1} sofre também um alargamento quando as AgNPs estão presentes. Esta banda é referente aos grupos NHR, e também às aminas carregadas ($R'NH_2R\ X^-$). A banda em 1070 cm^{-1} referente à NH_2, presente em grupos alifáticos, sofreu um deslocamento de cerca de 30 cm^{-1} para números de ondas maiores (1100 cm^{-1}), na presença das AgNPs. Dessa forma podemos inferir que a interação entre a QS e as AgNPs ocorre principalmente via aminas, preferência para as aminas

primárias. Também espera-se algum tipo de interação com o grupo OH. Observamos ainda o aparecimento de uma banda bem estreita em 826 cm^{-1}. Bandas nessa faixa de freqüências fornecem informações sobre estrutura das macromoléculas, com respeito ao ângulo entre os átomos. Dessa forma, é de esperar que a presença das AgNPs modifique, mesmo que de forma branda, a estrutura da QS. Este fato já foi descrito em outros trabalhos para NPs tanto de prata como de ouro[40, 82].

Os espectros referentes aos nanocompósitos contendo PVA são mostrados na figura 16b. O PVA puro apresenta bandas bem definidas na faixa de 3440 cm^{-1}, referente ao estiramento do grupo OH, e bandas na faixa de 2900 cm^{-1} (estiramento anti-simétrico e simétrico do CH_2 alifático). A região entre 550 cm^{-1} e 750 cm^{-1} corresponde às vibrações fora do plano do grupo OH[65]. A banda em 1375 cm^{-1} é referente ao acoplamento entre os grupos OH, e a banda em 1420 cm^{-1} corresponde à vibração do CH. O alargamento da banda de 3440 cm^{-1} sugere a interação das AgNPs com o grupo OH. Por outro lado, as bandas de 2910 cm^{-1} e 2940 cm^{-1} referentes ao estiramento do grupo CH_2 não sofrem deslocamento ou alargamento, sugerindo a ausência de interação das NPs com tal grupo. O alargamento das bandas entre 1500 cm^{-1} e 750 cm^{-1} no nanocompósito sugere também a interação das AgNPs com o grupo OH[65, 83]. O desaparecimento da banda 840 cm^{-1} referente à vibração fora do plano do grupo CH é devido à interação OH/Ag, que inibe tais oscilações[65, 83]. Ocorreu também um aumento na intensidade das bandas em 1662 cm^{-1} e 1573 cm^{-1} após a inserção das NPs.



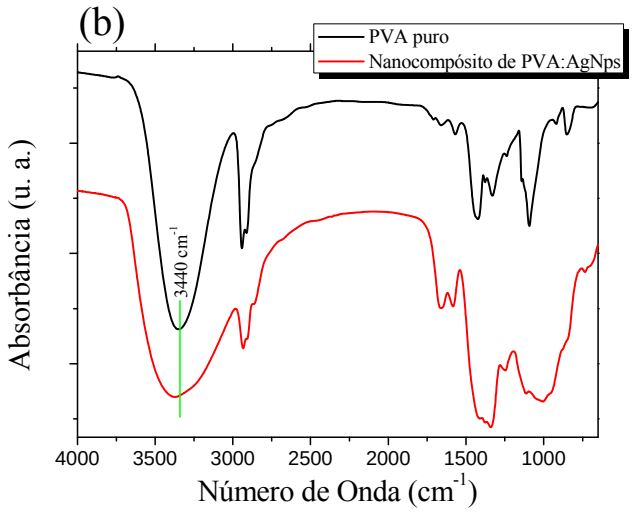


Figura 16 - Espectro de FTIR dos nanocompósitos de (a) QS:AgNPs e (b) PVA:AgNPs e seus respectivos polímeros puros. No nanocompósito QS:AgNPs ocorre principalmente o deslocamento e alargamento das bandas referentes as aminas. O alargamento das bandas na região de 1500 cm^{-1} e 750 cm^{-1} demonstram a interação das AgNPs com o grupo OH do PVA.

O tamanho das NPs foi avaliado utilizando-se a técnica de DLS. As NPs presentes nos nanocompósitos contendo QS apresentaram o tamanho entre 12 - 14 nm, ao passo que nos compósitos com PVA o tamanho observado foi de 8 - 10 nm. As NPs na solução sem polímero apresentaram diâmetros entre 2 a 3 nm. Esses dados estão ilustrados na figura 17a. O aumento no tamanho das partículas pelo uso do estabilizante PVA, em comparação à solução sem estabilizante, já foi relatado na literatura[65]. Adicionalmente, podemos esperar um aumento no tamanho das AgNPs estabilizadas com QS. Além disso, a concentração de precursor na rota utilizando tanto QS como PVA é cerca de 11 vezes maior que a rota sem estabilizante. Em ambas as amostras também foram detectados aglomerados e/ou NPs maiores. Contudo, estes estão em um número muito reduzido. Imagens de MET comprovam o tamanho em torno de 10 nm das NPs estabilizadas com PVA e de 13 nm para a QS, além da presença de NPs de 2 - 3 nm devido a primeira etapa da síntese utilizando o $NaBH_4$ que leva a formação de NPs pequenas[74], figuras 17b e 17c, respectivamente.

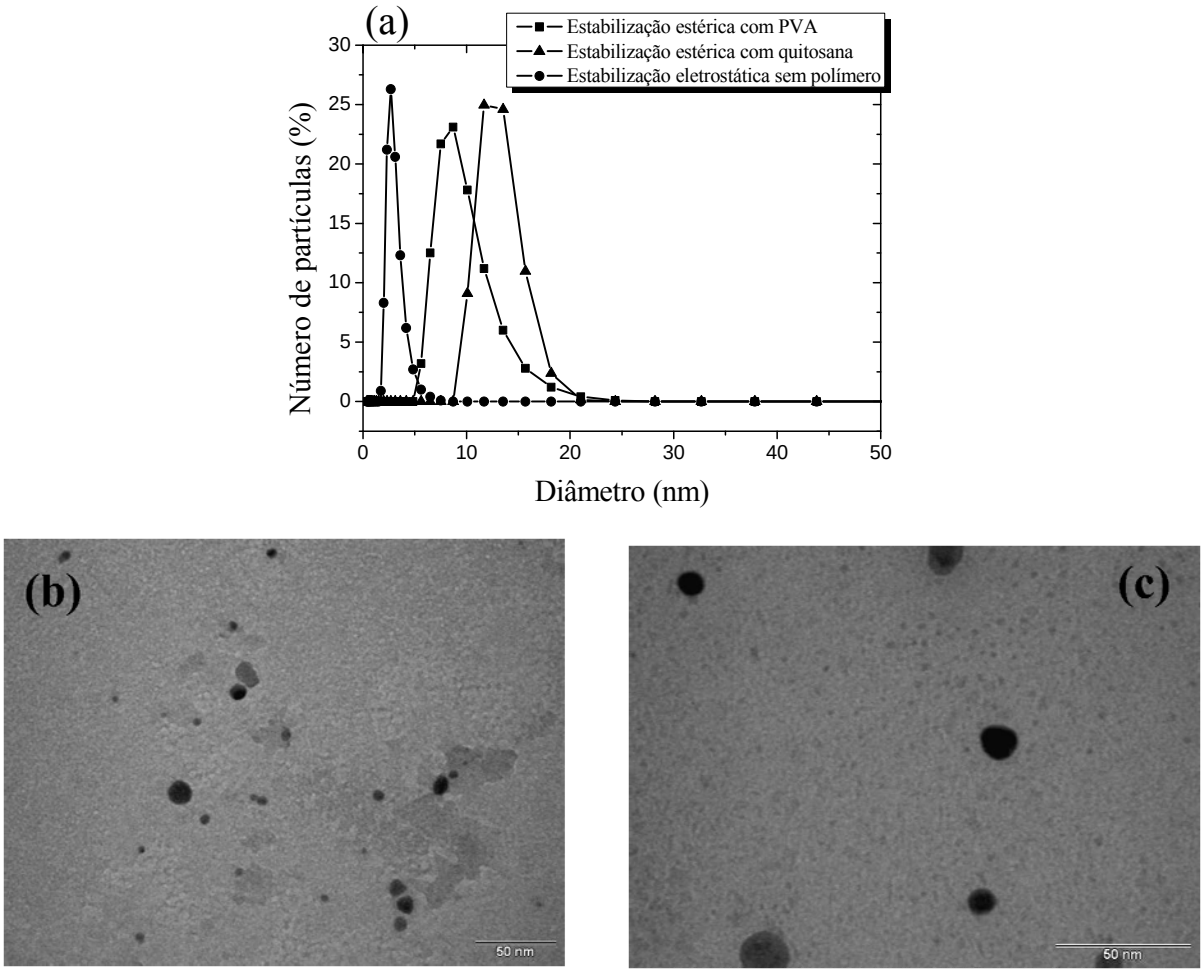


Figura 17 - Tamanho das partículas obtido pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (a), para os sistemas estabilizados e não estabilizado. Imagens de MET para os nanocompósitos PVA:AgNPs (b) e QS:AgNPs (c). Ambos apresentam a escala de 50 nm.

A estabilidade dos nanocompósitos (em relação à agregação) foi avaliada analisando-se o potencial Zeta ( ). Os resultados são mostrados na figura 18. Pela análise do gráfico, observa-se que as soluções contendo estabilizantes, QS ou PVA, apresentaram um maior valor do potencial Zeta, sendo desta forma, sistemas mais estáveis para as NPs, principalmente para valores de pH de 4 - 6,5. Por outro lado, o sistema sem estabilizante possui o valor em módulo do potencial Zeta sempre menor que 30 mV, revelando a vulnerabilidade do mesmo com relação à agregação. Juntamente com as medidas do potencial Zeta foram realizadas medidas do diâmetro das AgNPs. Ambas as análises foram realizadas variando-se o pH da solução de 4 - 10. Foi possível observar que a solução sem estabilizante tem o início da aglomeração mais prematuro, em pH 6, porém seu tamanho final em pH 10 é menor, em torno de 500 nm. A solução contendo PVA começa a mostrar agregação em pHs mais altos, mas seu tamanho final é maior cerca de 600 nm. O nanocompósito contendo QS tem o início da agregação para pH maiores que 7, entretanto neste sistema ocorre

aglomeramento catastrófico, cerca de 6 µm, como mostrado no *inset* da figura 18. Entretanto deve se ressaltar que a própria QS forma glóbulos em pH acima de 7, assim pode ser que o tamanho medido não seja o tamanho real das NPs, mas sim o tamanho de um aglomerado de QS:AgNPs, uma vez que a técnica de DLS utiliza o raio hidrodinâmico para determinar o tamanho da partícula.

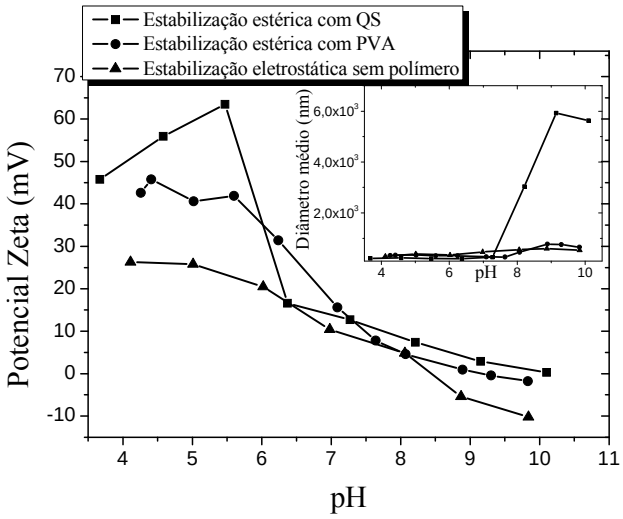


Figura 18 - Dependência do potencial Zeta em função do pH, das amostras contendo estabilizantes (QS ou PVA) e sem a presença de qualquer estabilizante. O gráfico em *inset* é com respeito à variação do tamanho das NPs em função da mudança de pH.

Podemos concluir que o uso de estabilizantes na síntese de AgNPs se faz viável e útil. Apesar do tamanho das NPs aumentar com o uso dos estabilizantes, tanto QS como PVA, em comparação aos sistemas sem estabilizantes, o aumento não é prejudicial em termos da ação bactericida, na qual geralmente NPs de até 100 nm apresentam uma ação satisfatória.

Os tamanhos das NPs para os nanocompósitos contendo QS e PVA foram próximos, de 12 - 14 nm, e de 8 - 10 nm, respectivamente. O uso do estabilizante é vantajoso, uma vez que se pode produzir soluções mais concentradas, por exemplo, até cerca de 4 $g.L^{-1}$ utilizando QS, e cerca de 3 $g.L^{-1}$, utilizando o PVA. Em ambos os casos, os polímeros foram usados na razão de 4:1 em massa de polímero:AgNPs. Pela comparação entre os dois sistemas com estabilizantes, foi possível concluir que a QS possui mais grupos possíveis de interagir com as NPs. Além disso, a concentração limite da QS é maior. Outro fator vantajoso à QS evidenciado neste estudo foi a estreita banda no espectro UV-vis (revelando uma distribuição de tamanho de partículas menor).

Devido a estas características, e também devido ao fato da conhecida ação bactericida da QS[15, 99, 105, 106], os nanocompósitos a base de QS:AgNPs foram utilizados na realização de

um estudo mais profundo acerca de sua estrutura e ação bactericida. Estes estudos são detalhados a seguir.

4.2 Nanobiocompósito QS:AgNPs, estrutura e ação bactericida

Esta etapa do trabalho refere-se ao estudo de nanocompósitos utilizando QS como estabilizante. O intuito foi de investigarmos mais detalhadamente os processos de degradação/agregação (estabilidade) do nanocompósito e os tipos de interação entre AgNPs/QS. Tivemos por objetivo também averiguar se ocorreria algum efeito sinérgico na ação bactericida, uma vez que dois materiais que apresentem tal ação foram combinados. Foram sintetizados nanocompósitos em quatro formulações, com diferentes relações polímero/AgNPs em massa, para estimarmos qual é a melhor relação QS:AgNPs na ação bactericida contra a *E.Coli*.

Os espectros de UV-vis referentes às quatro formulações de AgNPs/QS são mostrados na figura 19. Podem ser observadas bandas de absorção relativamente estreitas, centradas em 400 nm, características de AgNPs isotrópicas. A velocidade de reação foi monitorada pela absorção em 400 nm, sendo atingida completa reação depois de 4 segundos de síntese, como mostrado no *inset* da figura 19. Os espectros de todas as amostras foram normalizados.

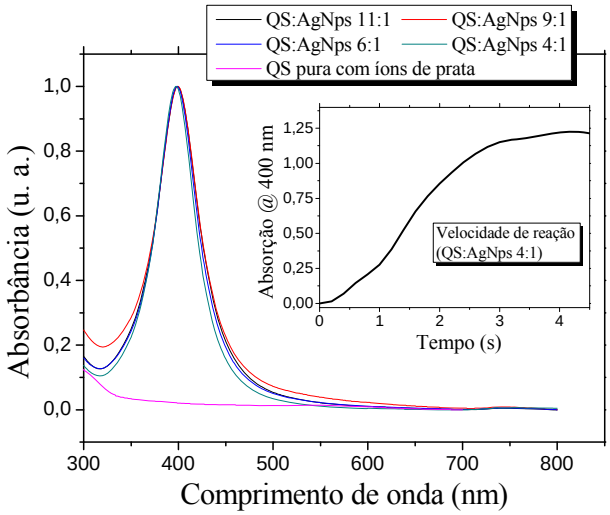


Figura 19 - Espectro de absorção da banda plasmônica da prata nos 4 nanobiocompósitos sintetizados e o espectro do sal de prata e QS apenas, sem redução dos íons metálicos. O gráfico em *inset* diz respeito à cinética de reação da síntese que mostra completa reação depois de 4 segundos.

Não são observados deslocamentos da banda de absorção, o que indica que todas as NPs possuem aproximadamente a mesma distribuição de tamanhos.

Após a análise espectrofotométrica, as soluções com os nanocompósitos foram analisadas por DR-X. As análises foram realizadas com amostras na forma de filmes *cast* depositados sobre lâminas de vidro, e os difratogramas são mostrados na figura 20. Observamos que todas as amostras apresentaram os mesmos picos (38,2º; 44,4º; 64,5º e 77,5º) referentes aos respectivos índices {111}, {200}, {220} e {311} que caracterizam todas as amostras como prata de estrutura cfc[83].

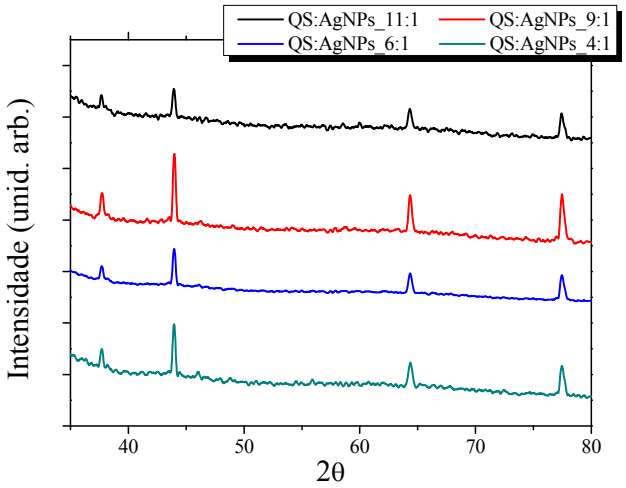


Figura 20 - Difratograma dos nanocompósitos evidenciando a presença de prata metálica com estrutura cfc.

Os tamanhos dos nanocompósitos QS:AgNPs foram investigados por medidas de DLS, e comparados com imagens obtidas por MET. A figura 21a mostra as distribuições de tamanhos das NPs obtidas por DLS. São apresentadas também na figura 21, as imagens de MET referentes a todos os nanocompósitos sintetizados. Os tamanhos médios obtidos pela técnica de DLS foram de 25 nm, 25 nm, 15 nm e 13 nm para os nanocompósitos de QS:AgNPs_11:1, QS:AgNPs_9:1, QS:AgNPs_6:1 e QS:AgNPs_4:1, respectivamente. Ambas as técnicas (DLS e MET) detectaram a presença de poucos aglomerados. Partículas menores, de 1 a 5 nm, observadas nas imagens de MET não foram detectadas por DLS. As imagens de MET revelaram similaridade na distribuição de tamanho entre as amostras QS:AgNPs_6:1, QS:AgNPs_9:1 e QS:AgNPs_11:1, com NPs variando de 5 a 15 nm, mostradas nas figuras 21c, 21d e 21e, respectivamente. Já a amostra QS:AgNPs_4:1, figura 21b, apresentou duas distribuições de tamanho, tanto NPs menores, com tamanhos variando de 1 a 3 nm, como NPs maiores com tamanhos de 15 a 25 nm.

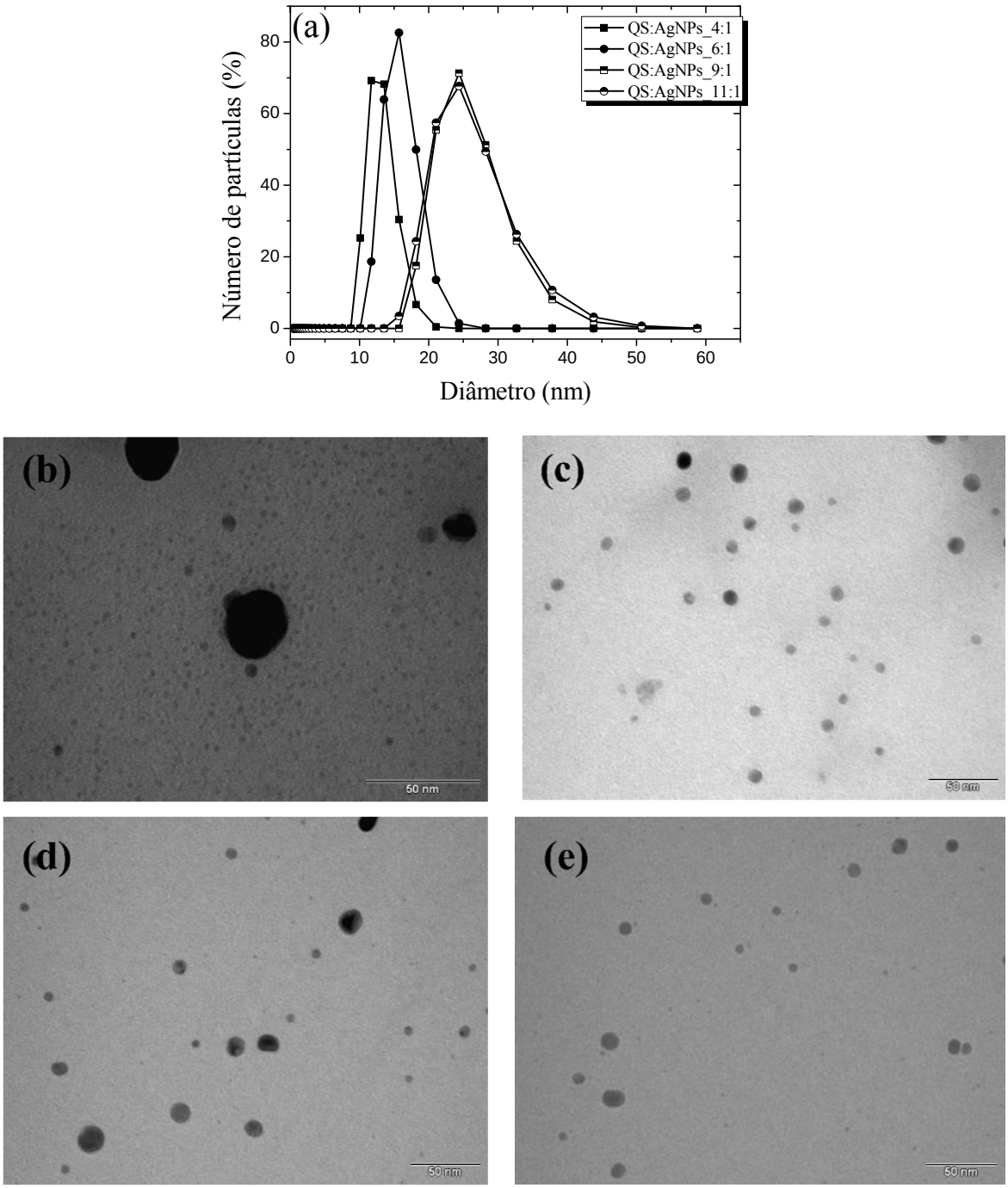


Figura 21 - Análise da dispersão de tamanho das partículas de duas formas distintas, por DLS (a) e imagens de MET dos 4 diferentes nanocompósitos QS:AgNPs_4:1 (b), QS:AgNPs_6:1 (c), QS:AgNPs_9:1 (d) e QS:AgNPs_11:1 (e). A escala de todas as imagens de MET são de 50 nm.

O potencial Zeta de todas as amostras foi medido em função do pH. O ponto isoelétrico de todas as amostras foi praticamente o mesmo, em torno do pH 10, como ilustrado na figura 22a. Ocorreram pequenas diferenças somente para pHs ácidos, sendo que a amostra QS:AgNPs_4:1 possui o potencial Zeta mais alto, seguida das amostras QS:AgNPs_6:1, QS:AgNPs_9:1 e QS:AgNPs_11:1, respectivamente. Esta diferença pode ter

ocorrido devido ao grau de exposição das AgNPs presente em cada nanocompósito, ou seja, mais expostas quanto menor a concentração de QS, e/ou ao caráter catiônico que as AgNPs livres apresentam em pHs ácidos, figura 18. Este fenômeno ocorre somente para pHs ácidos, sendo que em pHs básicos o potencial Zeta passa a apresentar o mesmo valor para todas as amostras, fato confirmado pela gráfico de potencial Zeta apresentado na figura 22a.

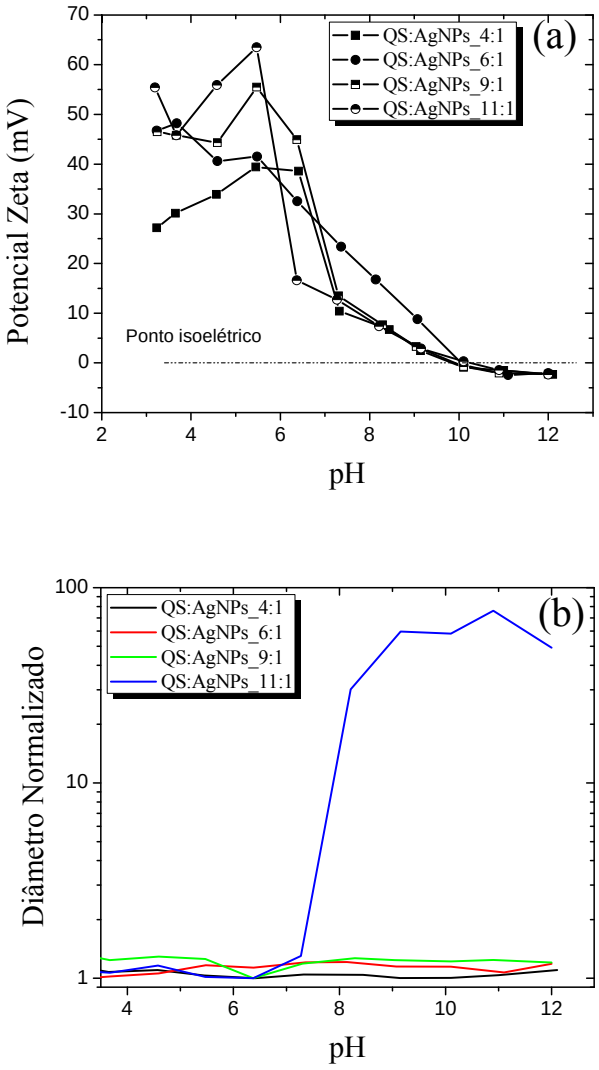


Figura 22 - Variação do potencial Zeta (a) e do diâmetro normalizado (b) de todos os nanobiocompósitos ambos em função do pH.

Podemos observar que a melhor faixa do uso do nanocompósitos se encontra entre os pHs de 4 - 7, referente ao valor do potencial Zeta acima de 30 mV (figura 22a). Conjuntamente com as medidas de potencial Zeta, foram estimadas as distribuições de tamanho das NPs em função do pH, na qual foi observada a agregação apenas da amostra com a menor quantidade de QS, ou seja, QS:AgNPs_4:1. No sistema de QS:AgNPs_4:1, as NPs

estão mais expostas que nos outros sistemas, podendo assim ocorrer o contato entre as NPs, e consequentemente a agregação, resultando no aumento do tamanho das NPs. Esses dados são ilustrados na figura 22b.

A figura 23 mostra as análises obtidas por espectroscopia FTIR, para nanocompósitos contendo diferentes proporções de QS e AgNPs. A fim de verificarmos se ocorreriam mudanças nas interações entre AgNPs e QS, em função do tempo, os espectros foram coletados imediatamente após o preparo, e após 24 hs, com armazenamento em condições ambiente. As medidas foram realizadas em amostras depositadas sobre lâminas de vidro recoberto com ouro, como detalhado na seção experimental.

Podemos observar que em todos nanocompósitos ocorreu um deslocamento da banda de 1567 cm^{-1}, atribuída à NH_2, para números de ondas maiores, em relação à QS pura. Esse deslocamento é atribuído ao acoplamento da AgNP com o grupo amina da QS, após a síntese os valores desta banda para as amostras QS:AgNPs_11:1, QS:AgNPs_9:1, QS:AgNPs_6:1 e QS:AgNPs_4:1 são respectivamente 1576 cm^{-1}, 1577 cm^{-1}, 1579 cm^{-1} e 1576 cm^{-1}.

Após 24 h, foi observado que a banda em 1567 cm^{-1} desloca novamente para números de ondas menores. Por exemplo, para a amostra de QS:AgNPs11:1 imediatamente após a síntese, a banda referente à amina é centrada em 1576 cm^{-1}, e depois de 24 h, observa-se seu deslocamento para 1568 cm^{-1}. Este comportamento é observado para todas as amostras, e ilustrado na figura 23.

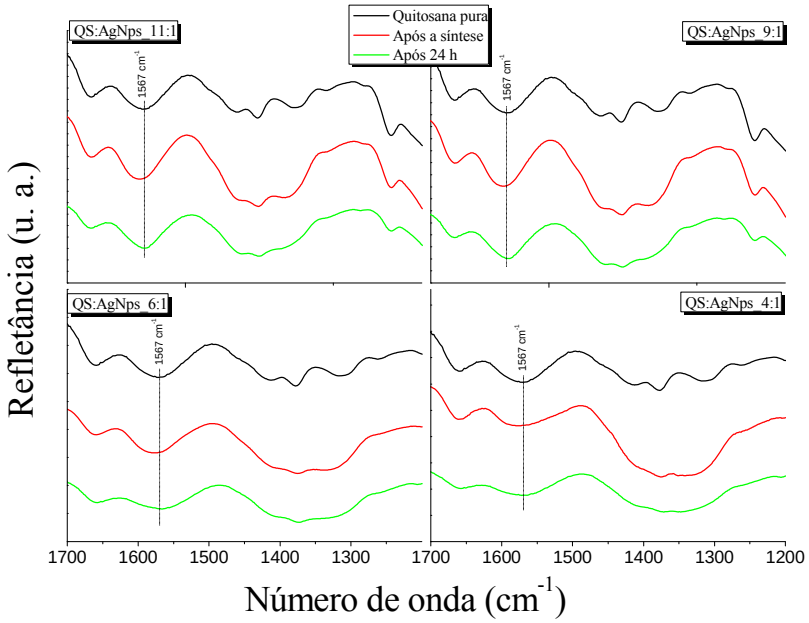


Figura 23 - Espectro de FTIR para os diferentes nanobiocompósitos em função do tempo de degradação. A banda de 1562 cm^{-1} se refere ao grupo NH_2 da QS.

A estabilidade das soluções de AgNPs foi investigada mais detalhadamente monitorando-se sua absorção eletrônica em função do tempo, uma vez que a diminuição da banda plasmônica pode indicar oxidação, ou liberação de íons das NPs[63]. Foram avaliados nanocompósitos com até 25 dias após o preparo. Os espectros são mostrados na figura 24. A semelhança na forma e posição das bandas revela que os tamanhos das NPs nos diferentes nanocompósitos estavam relativamente próximos, mesmo nos diferentes tempos da aquisição dos espectros. Pode-se inferir também que os nanocompósitos continham NPs isotrópicas, e com uma baixa dispersão, devidos aos espectros relativamente estreitos. Podemos inferir também que um possível processo de degradação tenha ocorrido, mas sem implicar em mudanças estruturais drásticas nas NPs, uma vez que nenhuma banda adicional ou deslocamentos foram observados em função do tempo.

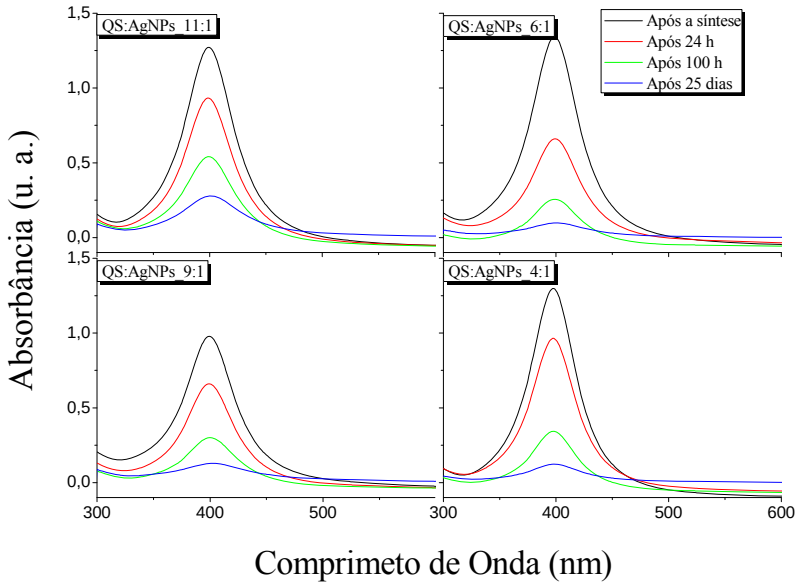


Figura 24 - Absorção plasmônica em função do tempo, as amostras foram deixadas em solução e temperatura ambiente para sofrer o processo de degradação durante 25 dias. A menor absorção da banda plasmônica indica o processo de oxidação e/ou liberação de íons das AgNPs.

Assumindo que a degradação (neste caso, referente à falta de estabilidade) do nanocompósito ocorra apenas nas AgNPs, os possíveis mecanismos podem ser oxidação ou liberação de íons de prata. Não houve deslocamento de banda significativo em nenhum dos casos analisados. Na figura 25a são mostradas as variações da intensidade no máximo de absorbância, em função do tempo. As curvas estão normalizadas em relação ao máximo de absorção de cada amostra.

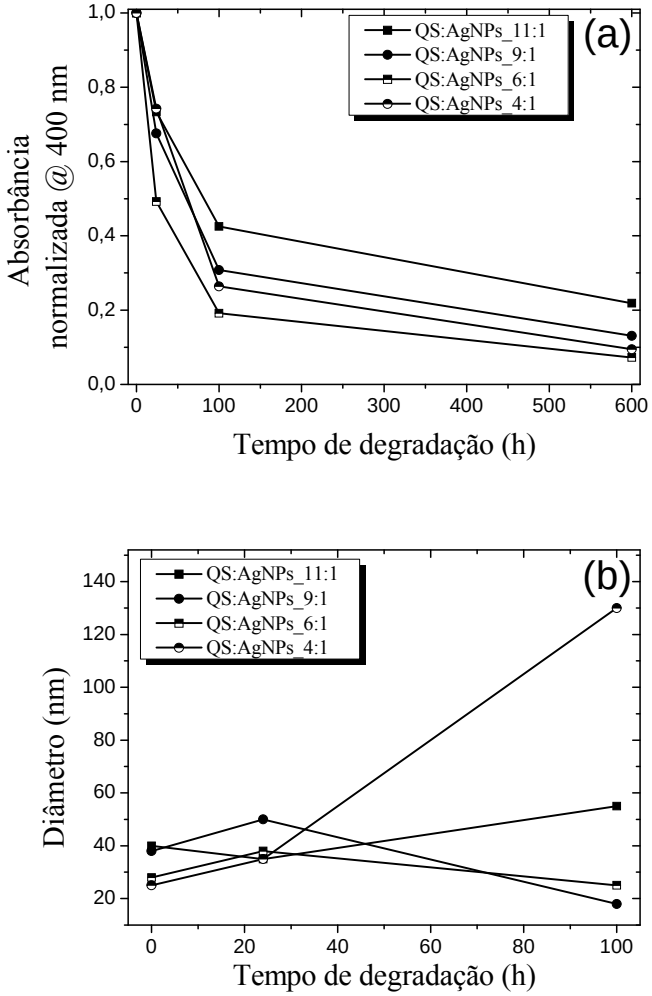


Figura 25 - Análise da forma de degradação de duas maneiras diferentes pela absorção do pico em 400 nm da banda plasmônica (a) e pelo fenômeno de aglomeração monitorado pela técnica de DLS (b).

Pela figura 25a, observamos que mesmo em diferentes proporções de QS:AgNPs, o processo de degradação das partículas, em termos de intensidade da absorção, é semelhante: um decaimento praticamente exponencial, extremamente rápido no início, e tendendo a um patamar final, que provavelmente seria o equilíbrio entre NPs e os íons de prata, $Ag_n^0 \rightarrow nAg^+$. Também foram realizadas medidas referentes ao aumento de tamanho em função do tempo, ocorrendo uma maior aglomeração/agregação no nanocompósito QS:AgNPs_4:1, motivado pela maior exposição que estas partículas apresentavam no nanocompósito em solução. Provavelmente nem todas estavam completamente protegidas estericamente pelo polímero QS, figura 25b.

Os nanocompósitos foram então submetidos a diferentes ensaios biológicos contra a bactéria *E. Coli,* incluindo o teste de MCI e o teste de densidade óptica (OD_{595}). Os resultados

referentes ao MCI são mostrados na tabela 3. Observamos que ocorre um aumento da ação do nanocompósito em comparação aos componentes, QS e AgNPs puras, uma vez que na mesma relação de 11:1 (polímero/NP) a concentração necessária para o nanocompósito de PVA:AgNPs é de 150 $\mu g.mL^{-1}$, e de 75 $\mu g.mL^{-1}$ para o nanocompósito de QS:AgNPs, ao passo que para a QS pura, esse valor é de 150 $\mu g.mL^{-1}$.

Na proporção de 4:1, a concentração do nanocompósito pode ser diminuída consideravelmente, e um valor de MCI de 20 $\mu g.mL^{-1}$ foi observado. Dentre todas as condições estudadas, a condição de 4:1 foi estipulada como a ideal, para produção de nanocompósitos bactericidas. Outro dado interessante refere-se ao valor de MCI do nanocompósito QS:AgNPs11:1, que é a mesma para o nanocompósito QS:AgNPs9:1.

Tabela 4 - Dados da mínima concentração necessária para inibir completamente a proliferação da *E.* Coli.

Amostras	Concentração do Nanocompósito						
	150 $\mu g.mL^{-1}$	100 $\mu g.mL^{-1}$	75 $\mu g.mL^{-1}$	50 $\mu g.mL^{-1}$	30 $\mu g.mL^{-1}$	20 $\mu g.mL^{-1}$	10 $\mu g.mL^{-1}$
QS:AgNPs_11:1	Inibição	Inibição	Inibição	Proliferação	Proliferação	Proliferação	Proliferação
QS:AgNPs_9:1	Inibição	Inibição	Inibição	Proliferação	Proliferação	Proliferação	Proliferação
QS:AgNPs_6:1	Inibição	Inibição	Inibição	Inibição	Proliferação	Proliferação	Proliferação
QS:AgNPs_4:1	Inibição	Inibição	Inibição	Inibição	Inibição	Inibição	Proliferação
QS Pura	Inibição	Proliferação	Proliferação	Proliferação	Proliferação	Proliferação	Proliferação
PVA:AgNPs_11:1	Inibição	Proliferação	Proliferação	Proliferação	Proliferação	Proliferação	Proliferação

Com base nos dados da tabela acima, algumas concentrações foram escolhidas para estudos da ação bactericida em função do tempo, cujos resultados são mostrados na figura 26. Pela análise das curvas, observamos a eficácia dos nanocompósitos, em especial os que apresentam relações de 4:1 e 6:1, em relação à atividade bactericida. Ressaltamos ainda a atividade bactericida do nanocompósito com PVA.

Apesar de estar abaixo da concentração de MCI, 150 $\mu g.mL^{-1}$, a QS com concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$ inibe o crescimento da bactéria por um período de 5 h, aproximadamente, mas não é suficiente para a completa eliminação dos microorganismos.

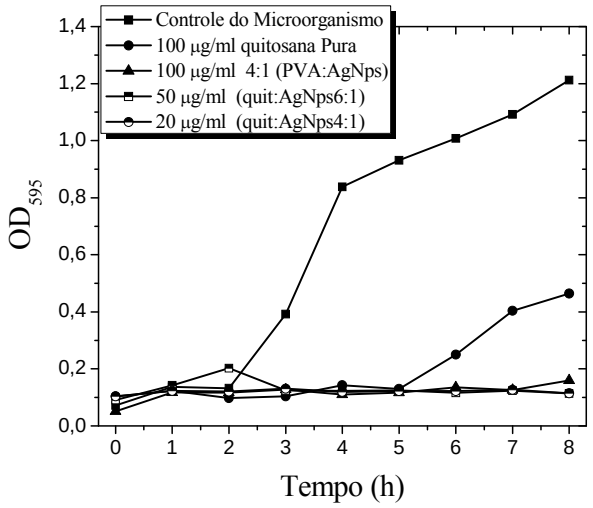


Figura 26 - Ensaio microbiológico da ação bactericida dos nanobiocompósitos sobre a *E. Coli* em função do tempo. A ação tanto da QS pura como do nanocompósito contendo PVA foram também analisadas.

Em resumo, podemos deduzir que a melhor relação entre QS e prata a ser utilizada é a de 4:1, já que são obtidas NPs menores, e sua estabilidade é bastante satisfatória até o valor de pH de 7,4. Além disso, esta proporção apresentou os menores valores de MCI contra o microorganismo *E. coli*. O uso de proporções menores de QS:AgNPs não se mostrou viável devido a problemas de aglomeração catastrófica na concentração de $AgNO_3$ utilizada, 7,6 mg/ml.

4.3 Síntese de AgNPs utilizando um agente redutor mais brando

Depois de comprovada a ação do nanobiocompósito QS/AgNPs e a melhor relação entre os mesmos, focalizamos esforços no desenvolvimento de uma rota de síntese amigável ao meio ambiente, com uso de redutores brandos, ao invés do $NaBH_4$, que é extremamente reativo e nocivo ao ambiente. Baseado em trabalhos que utilizavam QS, tanto como estabilizante, quanto agente redutor[6, 60] foi adotada uma rota de síntese similar. Contudo nessas rotas referenciadas acima, que utilizam açucares como redutores, a síntese só ocorre em duas condições: i) os sistemas necessitam de altas temperaturas, próximas da ebulição da água, juntamente com íons OH^-, ou ii) são utilizadas temperaturas mais baixas entre 40 - 60ºC, porém em tempos muito longos de síntese, por exemplo, 20 h[46]. Infelizmente, a QS

num meio com alta temperatura e na presença de íons metálicos sofre quebra de cadeia, ocorrendo assim sua degradação[85]. Para contornar este problema, propusemos uma rota empregando QS e citrato de sódio, ambos agindo como estabilizantes e agentes redutores, amplificando a ação de ambos, a fim de diminuir o tempo de reação, minimizando a degradação da QS.

Após a síntese, as AgNPs foram analisadas por espectroscopia UV-Vis, e os espectros são mostrados na figura 27. Todas as amostras analisadas possuíam a mesma concentração de $AgNO_3$, e a absorção está intimamente ligada às NPs metálicas na solução.

A identificação das amostras utilizadas nesse estudo é descrita na seção experimental. Na amostra AM1 observa-se uma menor absorção, devido ao baixo poder de redução da QS sozinha, mas é notada a presença de NPs. Na amostra AM2, como esperado, observa-se uma maior absorção, devido à adição do citrato de sódio, e a amostra AM3, por sua vez, apresenta uma absorção menor que a AM2, e maior que a AM1, mesmo com um tempo de reação menor, 90 segundos. Com o mesmo tempo de reação, mas com metade da quantidade de citrato de sódio em relação à amostra AM3, a amostra AM4 apresentou uma menor intensidade de absorção. Dessa forma, podemos inferir que a adição do citrato de sódio favorece a diminuição do tempo de reação, e promove um maior número de íons de prata reduzidos, para um mesmo tempo de reação, como era esperado. Outro fator a ser considerado é que o espectro da amostra AM2 aparece bem mais alargado, e com duas bandas, provenientes provavelmente de multipolos gerados por estruturas mais complexas, como cilindricas, prismáticas, e/ou dendriticas. Nesta rota de síntese também são observados a banda em 260 nm, revelando a presença de partículas muito pequenas, menores que 3 nm[42].

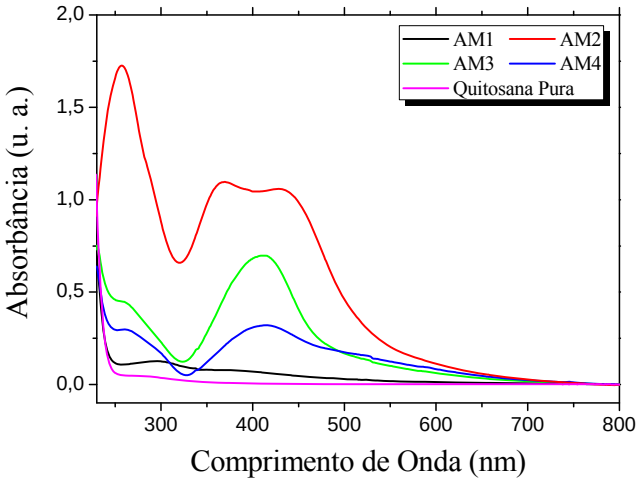


Figura 27 - Medidas da absorção da banda plasmônica para os nanobiocompósitos com diferentes massas de citrato de sódio e tempo de reação.

Os nanocompósitos QS/AgNPs referentes às amostras AM1 a AM4 foram analisados por MET, e as imagens são mostradas nas figuras 28, 29, 30 e 31. Para a amostra AM1 foram observadas apenas partículas circulares, com o tamanho entre 10 e 50 nm, com poucos aglomerados e uma distribuição pouco homogênea, figura 28a e 28b.

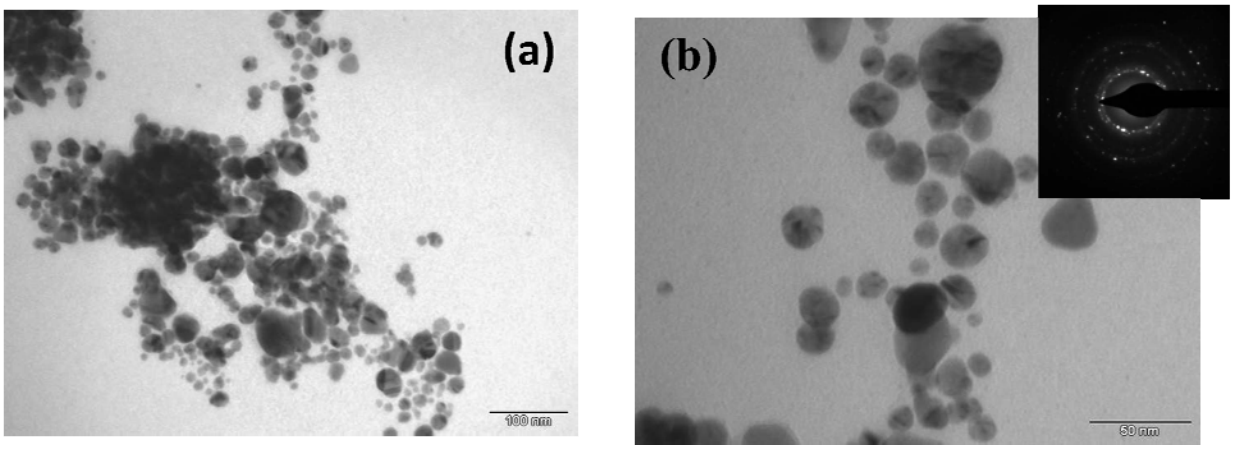


Figura 28 - Medidas de MET da amostra AM1 nas escalas de 100 nm (a) e 50 nm (b). O *inset* em (b) diz respeito à difração de elétrons confirmando a presença das Nps.

A amostra AM2 apresentou estruturas lamelares, ilustradas na figura 29a. Estas estruturas possuem tamanhos de aproximadamente 500 a 600 nm, e explicam os dois picos e a banda alargada no espectro UV-vis da figura 27. As dendritas são a forma predominante na amostra AM2, porém ocorrem também formas esféricas de tamanhos menores como apresentado na figura 29b, com tamanho de 20 a 40 nm.

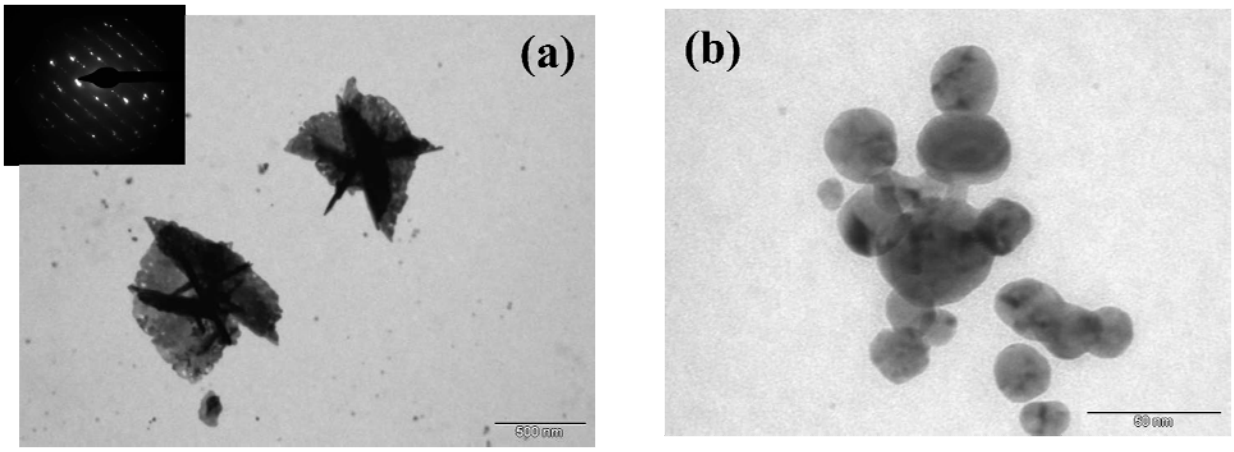


Figura 29 - Medidas de MET da amostra AM2 nas escalas de 500 nm (a) e 50 nm (b). A difração de elétrons presente no *inset* em (a) foi realizado sobre a área mais clara das dendritas confirmando a presença das AgNps nesta região.

Na amostra AM3, as mesmas estruturas dendríticas descritas acima foram observadas, mas não de maneira majoritária. Pelo contrário, eram exceções. Estas estruturas apresentavam

um tamanho menor, de aproximadamente 150 nm, como mostra a figura 30a. A grande maioria das NPs era composta por esferas de diâmetro menor que 10 nm, e com uma boa dispersão sobre toda a matriz polimérica, figura 30b. Isto leva a crer que a estrutura dendrítica é devido à ação conjunta da QS e do citrato de sódio, sendo que o tempo de síntese atua no crescimento das mesmas. Uma única estrutura de triângulo comumente observada em sínteses contendo citrato também foi observada, *inset* da figura 30b, entretanto parece que a mesma ainda não estava completamente formada, mas sim em processo de formação, devido aos contornos de grão das AgNPs bem sobressalentes.

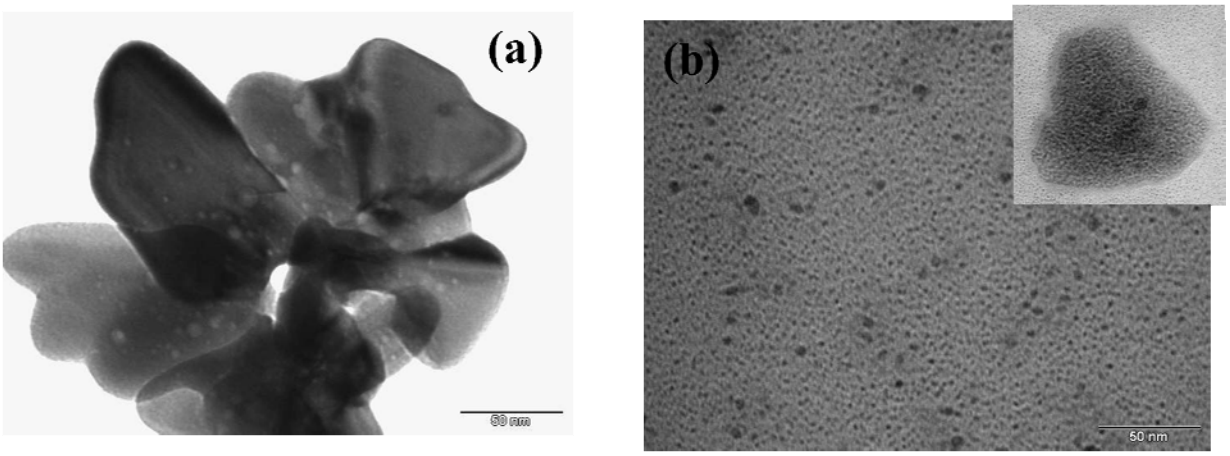


Figura 30 - Medidas de MET da amostra AM3, ambas as imagens possuem a escala de 50 nm, são observados tanto aglomerados que possivelmente viriam a evoluir em dendritas (a) como AgNps bem dispersas e com tamanho médio de 10 nm (b). O *inset* em (b) mostra um dos estágios da formação de um nanotriângulo de 100 nm.

Na amostra AM4, foram observadas AgNPs relativamente menores, com diâmetros variando de 2 a 5 nm, mas também ocorre a presença de partículas maiores como nas demais amostras, com um diâmetro de 10 nm, figuras 31a e 31b. Uma única partícula com estrutura dendrítica foi observada, *inset* da figura 31a, com um tamanho em torno de 350 nm.

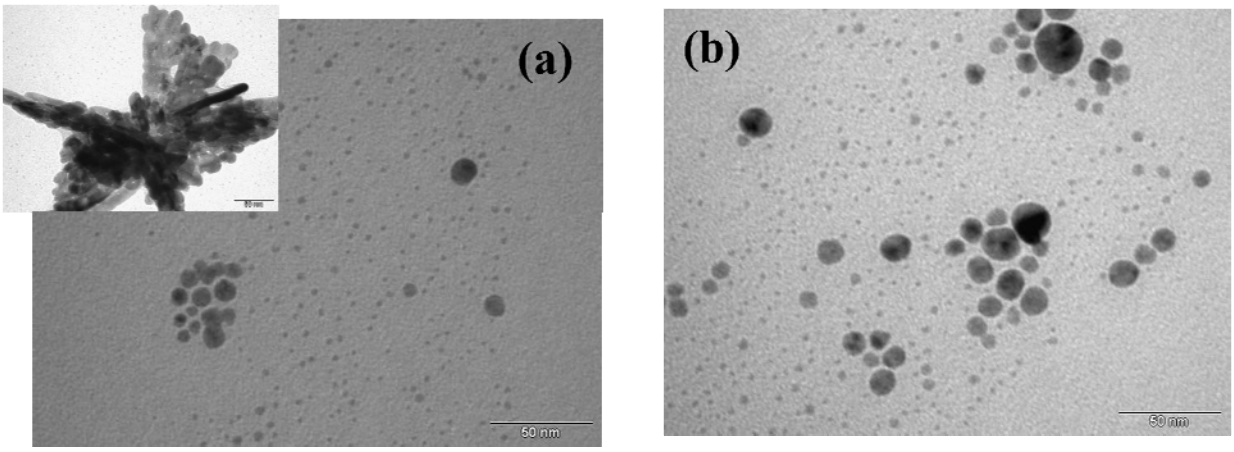


Figura 31 - Medidas de MET da amostra AM4, ambas as imagens possuem a escala de 50 nm, são observadas

AgNps esféricas e majoritariamente pequenas com o tamanho de 2 a 5 nm (a) ocorrendo a presença de partículas de 10 nm (b). Estruturas dendríticas são muito pouco usuais nesta amostra, sendo mostrada a formação de uma delas no *inset* em (a).

Medidas do tamanho das AgNps realizadas por DLS, em função da intensidade de luz espalhada, indicam a presença de grandes aglomerados em torno de 1 µm para as amostras AM2 e AM3, e de 0,5 µm para as amostras AM1 e AM4, como mostra a figura 32. Como aglomerados tão grandes não foram observados em nenhuma das imagens de MET, tais medidas são atribuídas à junção de partículas menores em uma mesma molécula de QS movimentando conjuntamente, e gerando assim um padrão de espalhamento de uma partícula maior do que realmente é.

Na figura 32 ainda visualizamos partículas menores, apresentando diâmetros de 140 nm (AM2), 90 nm (AM3) e 60 nm (AM4). A amostra AM1 apresentou o pico da distribuição de tamanho somente em 0,5 µm, contudo a distribuição de tamanho da amostra AM1 é bem mais ampla comparada com as demais (AM2, AM3 e AM4). Acreditamos que essa distribuição de tamanhos menores das AgNPs apresentadas pelas amostras AM2, AM3 e AM4 esteja relacionada às estruturas dendríticas, observadas pelas imagens de MET.

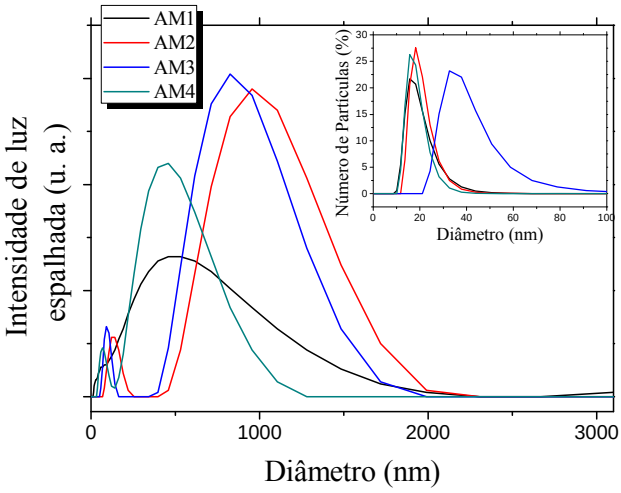
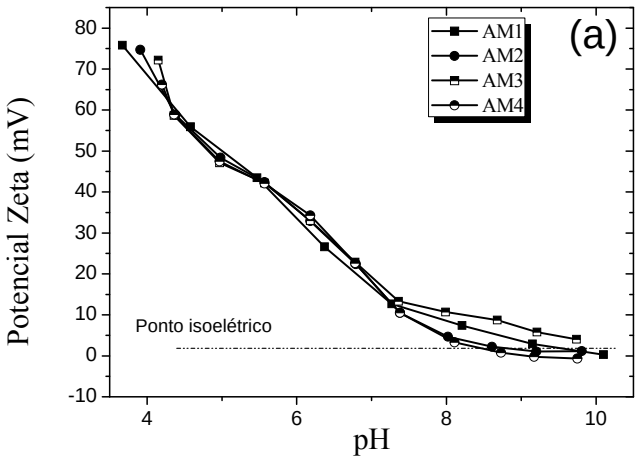


Figura 32 - Tamanho das Nps medido por DLS em função da intensidade espalhada e o *inset* diz respeito ao tamanho em função do número de Nps.

Ao se analisar o tamanho das partículas em função não mais da luz espalhada, mas sim do número de partículas presentes, *inset* da figura 32, vemos que todas apresentam majoritariamente partículas de até 20 nm, exceto a amostra AM3 que apresenta partículas de 40 nm. Neste modo de análise todas as amostras apresentaram somente uma distribuição de tamanho, diferentemente do observado utilizando a análise em função da intensidade de luz

espalhada. Considerando o modo de funcionamento do equipamento, que faz toda a análise baseada no espalhamento da luz, e sendo o mesmo proporcional ao diâmetro da partícula elevado à sexta potência, espalhamento Rayleigh, as NPs menores, de 10 nm da amostra AM3 e de 2 nm a 5 nm da amostra AM4, observadas pela técnica de MET foram possivelmente mascaradas pelas maiores.

As amostras AM1 a AM4 também foram analisadas em função do seu potencial Zeta, ilustrados na figura 33a. A adição de citrato de sódio não gerou mudanças significativas, sendo a melhor faixa de pH entre 4 - 6 ($|\zeta| \geq 30mV$). O ponto isoelétrico foi praticamente o mesmo para todos os nanocompósitos, já que acima do pH 8 todos tendem a um potencial nulo. Nas medidas do diâmetro das Nps em função do pH ocorreu uma diferença entre os nanocompósitos devido à adição de citrato, quanto maior a quantidade do memso, menores as AgNPs, como ilustra a figura 33b. Entretanto, deve ser levado em conta que o tamanho observado não é devido ao aumento das AgNps, mas sim da aglomeração/agregação da própria QS. Antes da solução de qualquer uma das amostras ser tratada com um pH básico e sofrer o fenômeno de aglomeração, cada uma apresentava um tamanho específico de AgNPs e depois de ocorrer a aglomeração e o posterior tratamento com 1% de ácido acético ocasionado a re-dissolução de todas as amostras (AM1 - AM4), o tamanho das AgNPs foi o tamanho medido inicialmente, sendo que todos os nanocompósitos apresentaram uma ótima proteção estérica para as AgNPs. Assim sugerimos que o citrato deixa a molécula de QS mais compacta na aglomeração, por meio de interações eletrostáticas entre os grupos OH e NH_3^+ do citrato e QS respectivamente. O citrato atua blindando as cargas da QS, diminuindo a repulsão eletrostática, e a molécula fica mais enovelada.



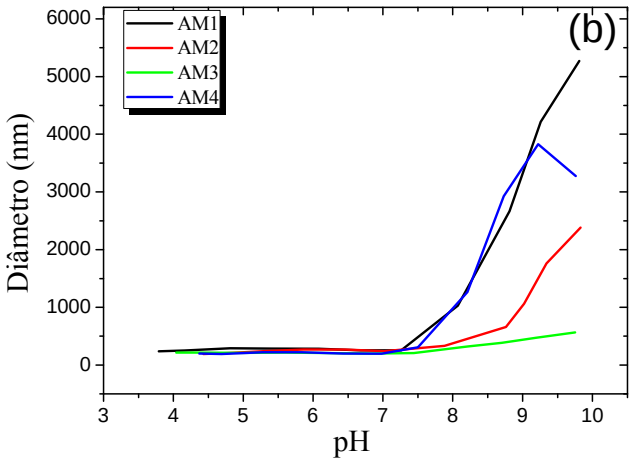


Figura 33 - Variação do Potencial Zeta (a) e o diâmetro normalizado (b) de todos os nanobiocompósitos ambos em função do pH.

Para a análise de DR-X foi utilizado o pó dos nanocompósitos, ambos apresentaram os picos característicos da QS, em 10º e 20º [118], ilustrados pelos asteriscos verdes na figura 34. Entretanto, os picos referentes à prata, principalmente para os ângulos menores, não foram tão sobressalentes, quanto antes. Possivelmente devido à característica da medida de DR-X em amostras em pó de polímeros, material amorfo. Essas bandas características de medidas de polímeros em pó podem ter mascarado os picos em 38,2º e 44,4º da prata. Outro fator foi provavelmente a presença de MTP discutidas anteriormente. Mas em todas as amostras foram observados os picos em 64,5º e 77,5º que dizem respeito à estrutura cristalina {220} e {311} respectivamente, representados pelos asteriscos vermelhos na figura 34. As amostras AM2 e AM3 mostram todos os picos referentes à prata metálica de estrutura cfc, picos em 38,2º, 44,4º, 64,5º e 77,5º referente aos seguintes planos respectivamente {111}, {200}, {220} e {311}, asteriscos vermelhos da figura 34. Podemos concluir que as AgNPs apresentam estrutura metálica cfc, mesmo com as amostras não apresentando todos os picos da prata metálica tão sobressalentes.

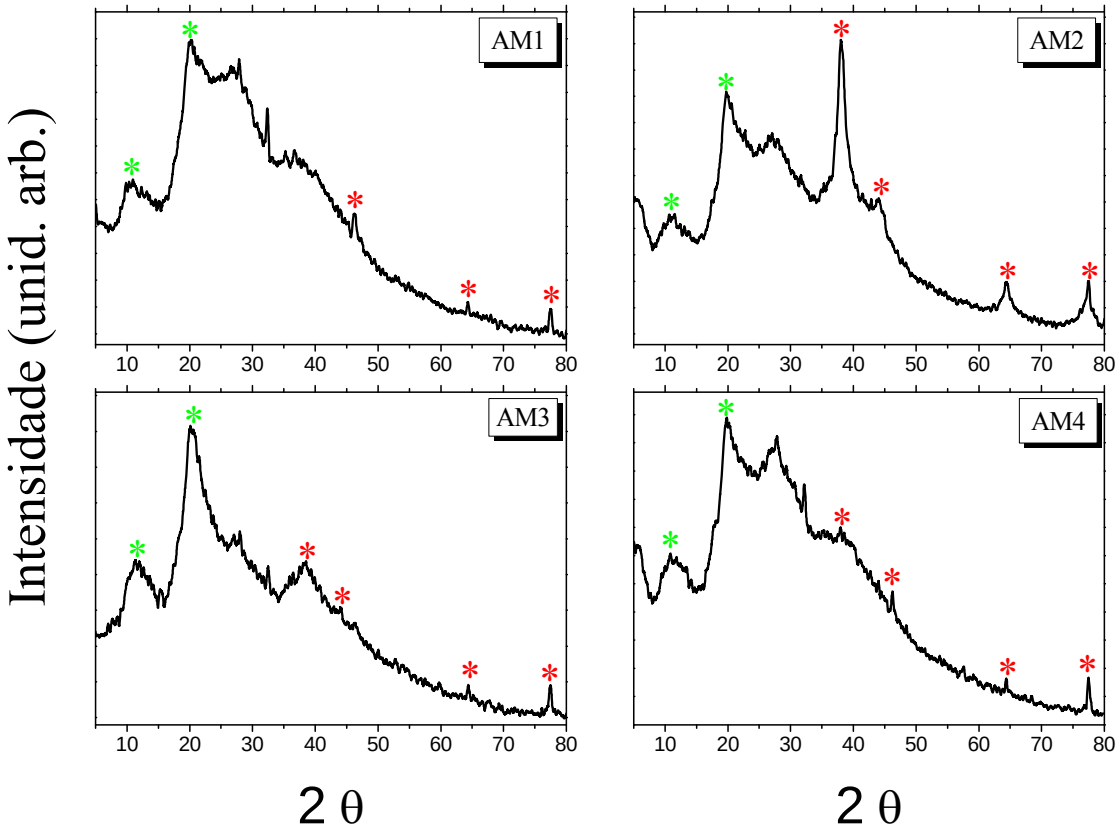


Figura 34 - Difratogramas das amostras AM1, AM2, AM3 e AM4. Os asteriscos verdes correspondem aos picos característicos da QS, 10^0 e 20^0, de medidas feitas com o pó do polímero. Os asteriscos vermelhos correspondem aos picos da prata metálica de estrutura cfc, picos em $38{,}2^0$, $44{,}4^0$, $64{,}5^0$ e $77{,}5^0$ referente aos seguintes planos respectivamente {111}, {200}, {220} e {311}.

Novamente foi utilizada a técnica de FTIR para o estudo da degradação do nanocompósito, entretanto desta vez o foco de interesse era a degradação da própria QS evidência pelas bandas em 1740 cm^{-1} e 1710 cm^{-1} referente ao grupo COOH, que é o grupo formado pela quebra de cadeia da QS. As medidas foram realizadas logo após a síntese, e após 15 dias, com as amostras armazenadas sobre luz e temperatura ambientes. Foi realizado a deconvolução de Fourier em todas as amostras. Após a deconvolução, apenas na amostra AM1 tais bandas foram claramente observadas.

A amostra AM1 não mostrou indícios de mudanças das bandas de 1740 cm^{-1} e 1710 cm^{-1} em função do tempo de degradação, que foi de 15 dias. A banda em 1110 cm^{-1} sofre deslocamento para comprimento de ondas menores somente na amostra AM1. Todas as outras amostras mantiveram essa banda inalterada em função do tempo de degradação. O grupo NH_2 apresenta vibração na banda em 1110 cm^{-1}, assim é de se esperar que a amostra AM1 vai perdendo a interação QS/prata em comparação as demais amostras, figura 35.

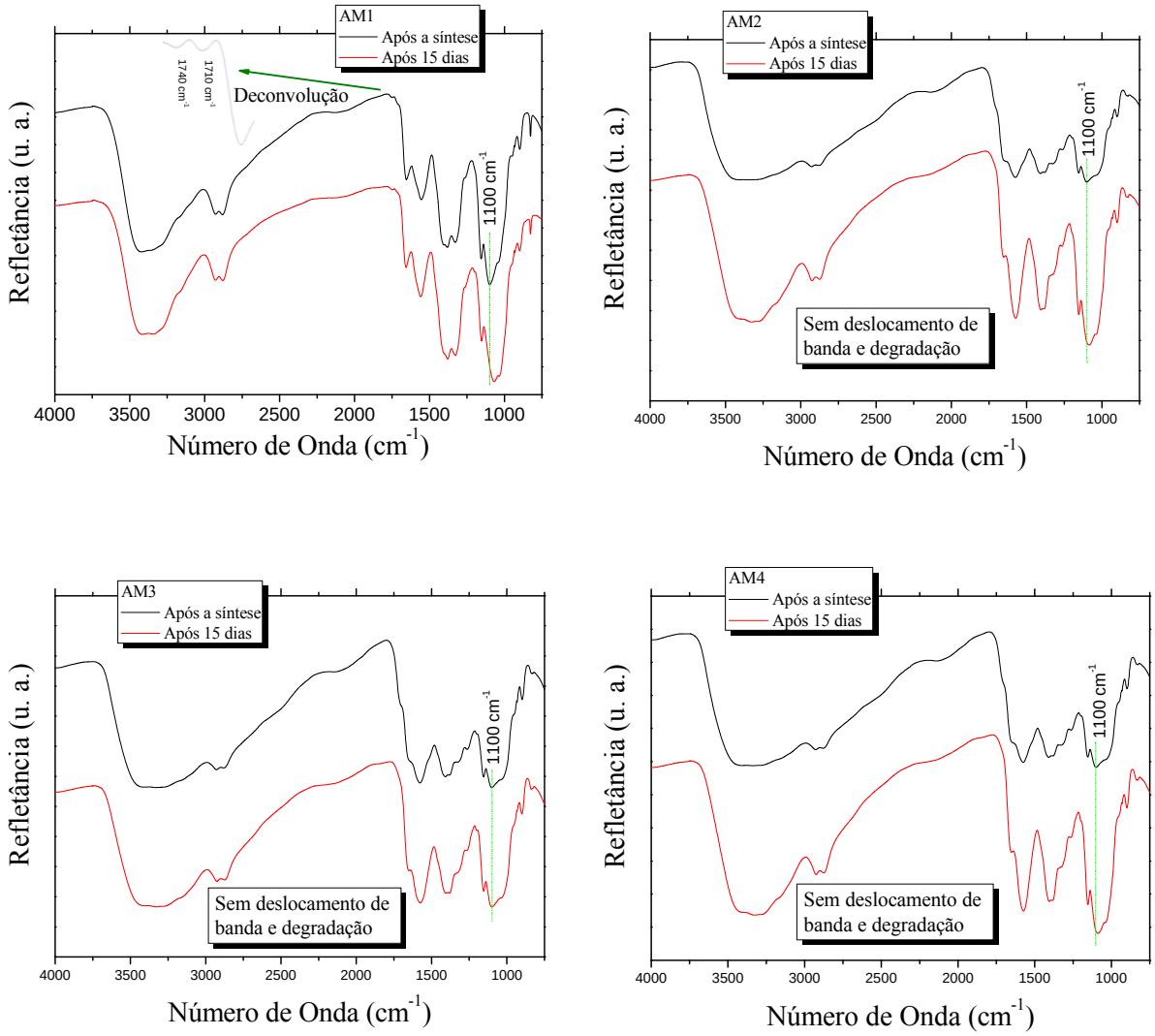


Figura 35 - Medidas de FTIR das amostras AM1, AM2, AM3 e AM4 em função do tempo de degradação. O espectro de FTIR mostra a degradação da QS na amostra AM1 pelo aparecimento das bandas em 1740 cm^{-1} e 1710 cm^{-1} referentes ao grupo COOH. A perda de interação QS/AgNPs é evidenciada pelo deslocamento da banda em 1100 cm^{-1} para comprimento menores, referente ao grupo NH_2.

Juntamente com as análises de FTIR foram tiradas fotografias das soluções no intervalo de 15 dias, contudo nenhuma mudança visual foi observada. As fotografias são mostradas na figura 36.

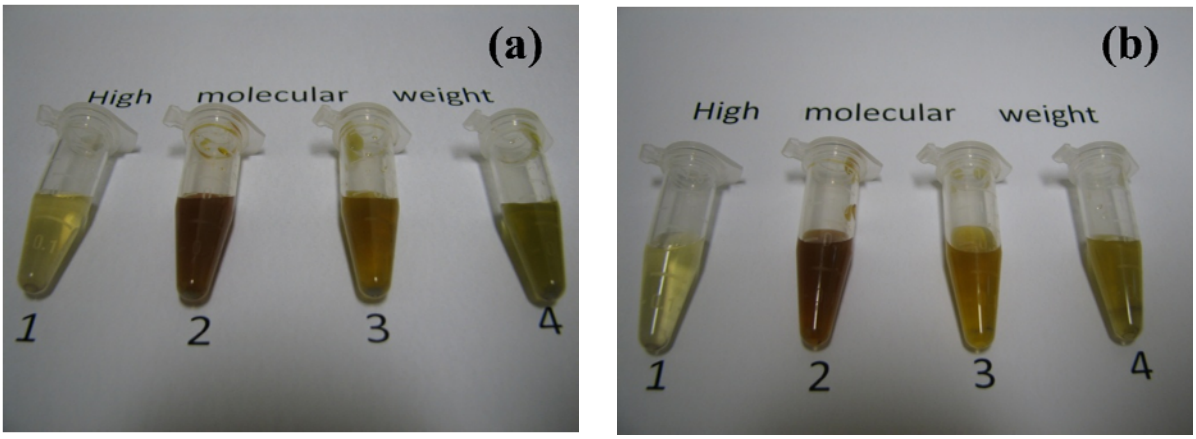


Figura 36 - Fotos das amostras solubilizadas na concentração de 6,5 $g.L^{-1}$, logo após a solubilização (a) e com 15 dias de degradação em luz e temperatura ambiente (b).

Após a caracterização estrutural, morfológica, e o estudo de degradação, realizamos um estudo das propriedades térmicas dos nanocompósitos, por TGA. A figura 37 contém a curva termogravimétrica (TG) da QS pura. Pela análise da derivada da curva termograviométrica (DTG) vemos que a amostra apresenta uma perda de massa em três estágios: i) primeiro estágio que vai da temperatura ambiente até 110ºC que está relacionado à perda de água adsorvida, e aquela presente em sua estrutura[100, 101] com uma velocidade de perda menor ( ) na temperatura de 54ºC; ii) segundo estágio de 210ºC até 380ºC, referente à primeira etapa de degradação da QS, apresentando a velocidade máxima de perda ( ) na temperatura de 290ºC e; iii) terceiro estágio de 380ºC a 600ºC. Esta etapa é referente à degradação da QS, sua velocidade máxima de perda de massa é de na temperatura de 520ºC.

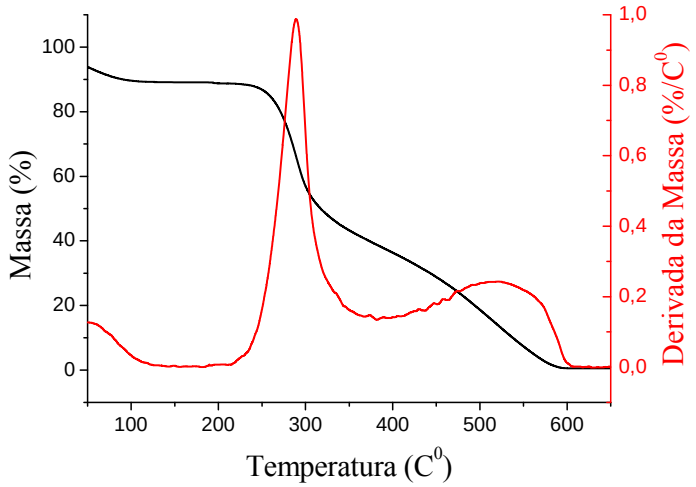


Figura 37 - Curvas de TG e DTG da QS pura, obtidas sobre uma atmosfera de ar sintético até a completa degradação do material em 600ºC.

Com a introdução das AgNps no sistema, ocorrem mudanças significativas nas características térmicas da QS, como ilustrado na figura 38. A amostra AM1, apresenta uma etapa a mais na perda de massa. A etapa de perda de água é similar. A segunda etapa começa em 190ºC, mas continua até 270ºC, com uma velocidade máxima de perda $dm/dt = 0{,}65$ na temperatura de 250ºC. Uma nova etapa surge em 270ºC até 380ºC com uma velocidade máxima de perda de $dm/dt = 0{,}41$ na temperatura de 290ºC. Esta nova etapa é possivelmente oriunda da dissociação das AgNps com a QS. A última etapa de degradação começa para temperaturas mais baixas, em relação à QS pura. O início da ultima etapa de degradação ocorre em 380ºC e termina em 490ºC, com a completa degradação da QS, e com um resíduo de prata de 8,56% em massa.

A inserção do citrato de sódio também gera modificações nas características térmicas do sistema (figura 38). As amostras AM2, AM3 e AM4 (que contém citrato) mostram praticamente os mesmos valores de temperatura e velocidades máximas de perda de massa. A evaporação da água ocorre até 150ºC com uma velocidade de $dm/dt = 0{,}10$ na temperatura de 58ºC. A eliminação das moléculas de água presentes na estrutura da QS ocorre na faixa de 150ºC a 240ºC, com uma velocidade máxima de perda de massa de $dm/dt = 0{,}08$ na temperatura de 190ºC. A degradação do nanocompósito ocorre em duas etapas: i) a primeira de 245ºC a 360ºC com velocidade máxima de perda de $dm/dt = 0{,}72$ na temperatura de 296ºC, e a outra de 360ºC a 440ºC com uma velocidade máxima de perda de $dm/dt = 0{,}81$ na temperatura de 397ºC, resultando na completa degradação dos materiais orgânicos.

Outro dado importante que podemos obter das análises de TG refere-se à quantidade de resíduo, neste caso, devido às AgNps presentes em cada nanocompósito. A QS pura teve um resíduo de 0,53% com relação à massa inicial. Em todos os nanocompósitos (AM1, AM2, AM3 e AM4) a quantidade inicial de prata utilizada na síntese era de 20% da massa de QS, contudo, nas amostras AM2, AM3 e AM4 foram adicionadas diferentes massas de citrato de sódio, mudando assim a percentagem de massa de prata em relação à massa orgânica total do nanocompósito. Na amostra AM1, dos 20% da massa inicial de prata, foram obtidos 9,11% de resíduo, atribuído a prata metálica. Já na amostra AM2 a quantidade de prata inicial relativa às quantidades de QS e citrato de sódio foi de 16,7%, e a de sódio de 3,9%. Tomando o caso extremo de que todo o sódio fosse incorporado ao pó, 3,9% do resíduo seria de sódio, e o restante seria de prata. Como o resíduo final da amostra AM2 foi de 14,56% teríamos que 10,66% do resíduo seriam de prata. Contudo, a fixação de sódio pelo sistema não é tão grande assim, como pode ser confirmado pela comparação dos resíduos das amostras AM3 e AM4: a primeira tem o dobro de citrato de sódio que a segunda, mas o resíduo final de ambas é

respectivamente de 15,57% e 14,01%, e, portanto, o sódio não apresenta uma incorporação tão grande ao sistema.

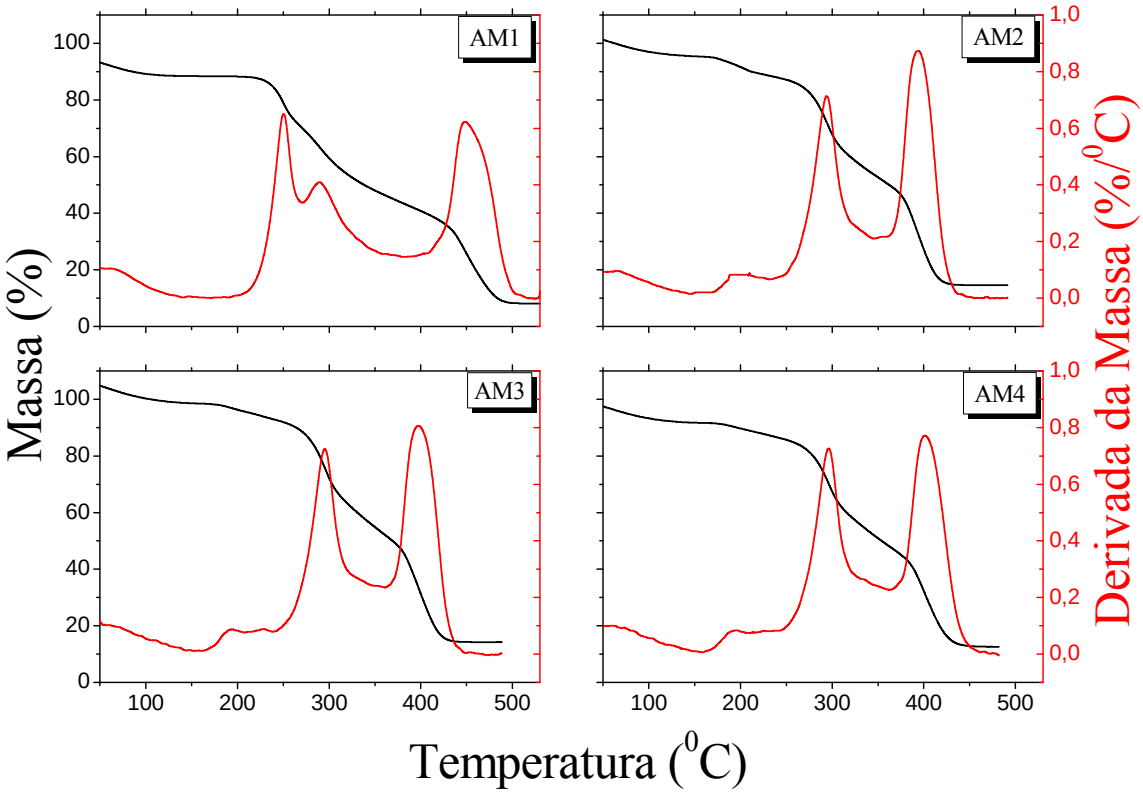


Figura 38 - Medidas de termogravimetria das amostras AM1 (a), AM2 (b), AM3 (c) e AM4 (d). São mostradas tanto as curvas de TG com as de suas derivadas DTG.

Podemos concluir que o uso do citrato de sódio neste tipo de síntese, é vantajoso, pois impede a degradação da QS devido à diminuição do tempo de reação, e também pela formação de um maior número de núcleos no processo de síntese.

4.4 Caracterização de filmes de PVA contendo o nanocompósito AM4

Após encontrar a melhor proporção de QS/AgNPs a ser utilizada na preparação do nanocompósito, assim como a melhor rota de síntese para a produção do mesmo, este nanocompósito foi incorporado em uma matriz polimérica, visando-se futuras aplicações como materiais de embalagens inteligentes. A matriz escolhida foi o PVA, e o nanocompósito

o AM4, devido as melhores características apresentadas, como melhor relação QS:AgNPs, menor tempo de síntese, e a melhor distribuição de tamanho entre os nanocompósitos sintetizados. Os filmes foram confeccionados com diferentes quantidades do nanocompósito AM4, como descrito na seção experimental.

Os filmes foram analisados por espectroscopia UV-vis. Devido a não homogeneidade de espessura por todo o filme, e a dificuldade de se determinar o exato local no qual foi incidido o feixe de luz, o espectro de todos os filmes foram normalizados. Os espectros normalizados estão presentes na figura 39, juntamente com o espectro da solução pura do nanocompósito AM4. Pela análise do gráfico pode ser observado que todos os filmes confeccionados apresentam AgNPs e que o alargamento em relação ao espectro da amostra pura ocorreu, sugerindo que a incorporação das AgNPs na matriz polimérica gera uma maior distribuição de tamanho das mesmas.

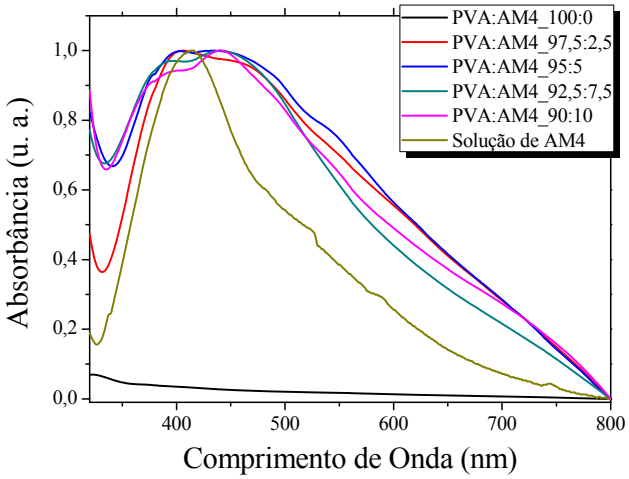


Figura 39 - Espectros UV-vis dos filmes de PVA contendo o nanocompósito AM4, juntamente com os espectros do filme de PVA puro e do nanocompósito AM4 em solução.

Depois de comprovado a presença das AgNPs nos filmes, foram efetuados ensaios de TGA e DSC. Os ensaios de TGA foram realizados em atmosfera de Ar sintético. A figura 40 contém a curva TG do PVA puro e sua derivada. Pela análise da derivada da curva, DTG, em amostra de Ar sintético vemos que a amostra apresenta uma perda de massa em cinco estágios: i) primeiro estágio que vai da temperatura ambiente até 180ºC que está relacionado à perda de água adsorvida, com uma velocidade máxima de perda ($dm/dt = 0{,}07$) na temperatura de 99ºC; ii) segundo estágio de 180ºC até 318ºC, primeira etapa de degradação do PVA, apresentando a velocidade máxima de perda maior ($dm/dt = 0{,}53$) na temperatura de 275ºC; iii) terceiro estágio de 318ºC a 340ºC com velocidade máxima de perda de massa

de $dm/dt = 0{,}37$ na temperatura de 388ºC; iv) quarto estágio de 387ºC a 470ºC com velocidade de perda de massa de $dm/dt = 0{,}27$ na temperatura de 436ºC; e v) último estágio de 470ºC a 575ºC com velocidade máxima de perda de massa de $dm/dt = 0{,}26$ na temperatura de 495ºC. Em atmosfera de N_2 o PVA apresenta apenas 3 estágios de perda de massa, como mostrado *inset* da figura 40.

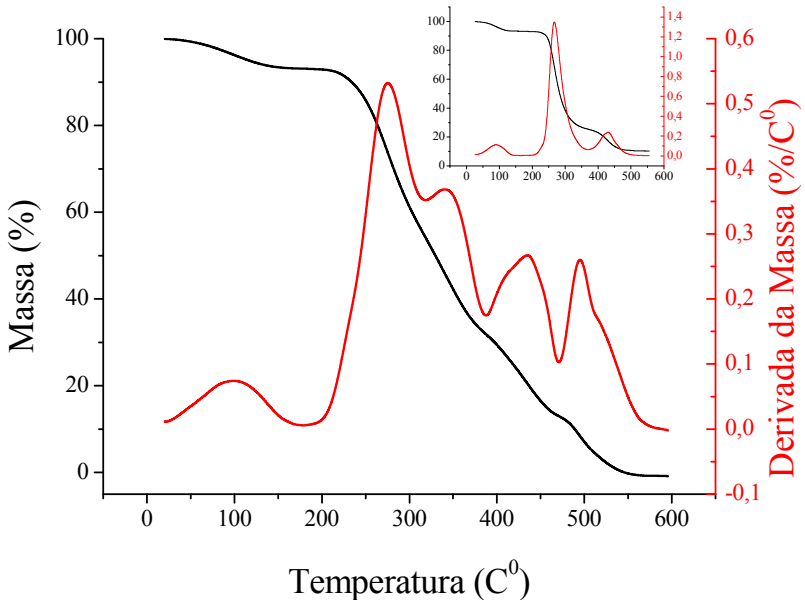


Figura 40 - Curvas de TG e DTG do PVA puro, obtidas sobre uma atmosfera de ar sintético até a completa degradação do material em 600ºC. No *inset* mostra-se um ensaio de degradação do PVA em atmosfera de N_2.

A não homogeneidade das curvas de TGA obtidas nos filmes contendo os nanocompósitos, figura 41, se deve possivelmente ao fato de que a análise foi feita sobre amostras cortadas de diferentes locais dos filmes. Contudo, o intuito das medidas de TGA, nesse caso, foi verificar se a inserção do nanocompósito AM4 afetaria (diminuiria) a temperatura de degradação do polímero PVA inviabilizando o uso do nanocompósito AM4 na matriz de PVA. Como foi observado, a inserção do nanocompósito AM4 não modificou de maneira significativa as características térmicas do PVA, dando perspectivas do uso deste tipo de combinação, PVA:AM4. As mudanças geradas pela introdução do nanocompósito AM4 no filme de PVA são ilustradas na figura 41. Todos os filmes produzidos tiveram a omissão de alguns estágios da perda de massa. A perda de água em todos os filmes parece ocorrer em duas etapas. A primeira, provavelmente é relacionada à água presente na cadeia de PVA, e a segunda, à água presente na cadeia de QS. A primeira etapa de degradação de todos os filmes ocorre para a mesma faixa de temperatura, tendo início em 210ºC e término em 380ºC, com velocidade máxima de perda ocorrendo em cerca de 280ºC. A completa degradação dos

filmes ocorre em 500ºC. Com o aumento do número de AgNPs temos um aumento da velocidade máxima de perda de massa do segundo pico de degradação (figura 41). Neste caso, acredita-se que as AgNPs funcionem como ilhas de calor, aumentando a condutividade térmica do sistema e acelerando assim a sua degradação.

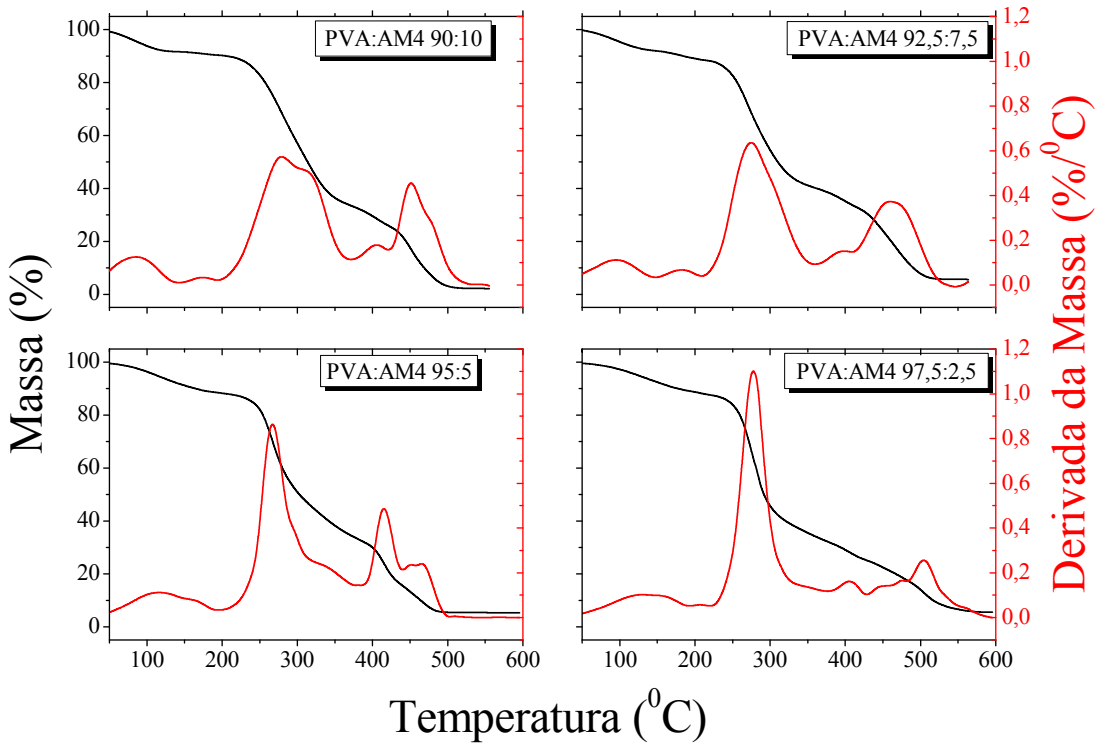


Figura 41 - Curvas de TG e DTG dos filmes de PVA com o nanocompósito AM4, obtidas sobre uma atmosfera de ar sintético até a completa degradação do material.

Outras evidências de que as AgNPs atuam como ilhas de calor nos filmes são o resíduo e temperatura final de degradação, presentes na tabela 5.

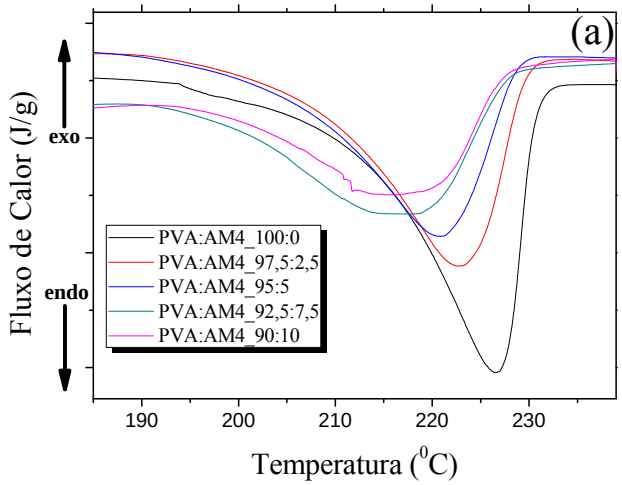
Tabela 5 - Dados de TGA dos filmes de PVA contendo o nanocompósito AM4.

Filme	Resíduo (%)	AgNPs (%)	Temperatura final (ºC)
PVA:AM4_90:10	2,33	2	505
PVA:AM4_92,5:7,5	5,63	1,5	514
PVA:AM4_95:5	5,33	1	490
PVA:AM4_97,5:2,5	5,53	0,5	540

Pela a análise dos dados da tabela 5, vemos que quando é inserida uma maior quantidade de prata no sistema, o resíduo é menor, já para as demais amostras

(PVA:AM4_92,7:2,5 a PVA:AM4_97,5:2,5) o resíduo se mantem praticamente o mesmo. Assim, podemos inferir que para certa concentração limite de AgNPs o processo de degradação da fase orgânica é aumentado. Adicionalmente, a temperatura final de degradação do filme vai diminuindo com relação ao aumento da quantidade de AgNPs, exceto para a amostra PVA:AM4_95:5. Tais dados corroboram com a hipótese de que as AgNPs atuam como ilhas de calor na matriz polimérica, catalisando o processo de degradação, pelo aumento da difusidade térmica do material.

Os ensaios de DSC dos filmes são mostrados nas figuras 42a e 42b. Observamos que a incorporação de AgNPs afetou a temperatura de fusão dos filmes (figura 42a). A temperatura de fusão dos filmes diminuiu com o aumento da quantidade de AgNPs. Novamente, é provável que as AgNPs atuem como ilhas propagadoras de calor favorecendo a difusão térmica no material, outro mecanismo a ser proposto é que as AgNPs afetam a formação dos esferulitos. Quanto maiores e mais espessas as lamelas que compõem os esferulitos, mais perfeitos os cristais, e maior a Tm. Dessa forma, é provável que as AgNPs afetam o processo de cristalização do PVA, levando a formação de esferulitos com lamelas menos espessas e cristais imperfeitos, diminuindo a temperatura de fusão. Este fato é evidenciado também pelas curvas de resfriamento da figura 42b, onde se observam as variações do pico exotérmico referente à cristalização.



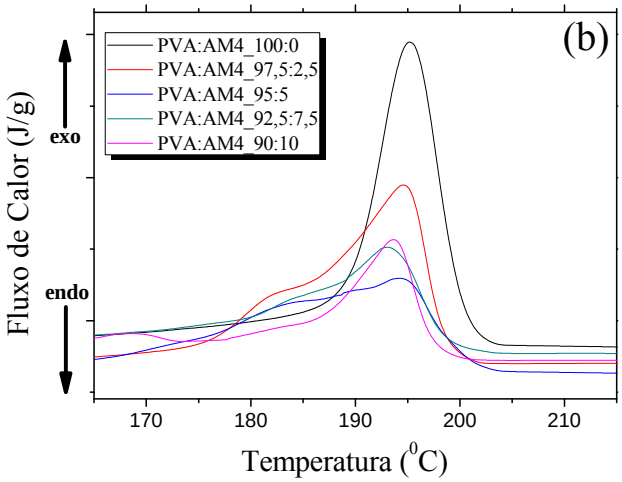


Figura 42 - Análises de DSC do processo endotérmico de fusão (a) e do processo exotérmico de cristalização (b).

Após a análise térmica, foram analisadas as propriedades mecânicas dos filmes, através de curvas de tensão-deformação. O ensaio foi realizado como descrito na parte experimental. Foram realizadas 5 medidas de tração de cada filme, sendo as mais significativas de cada amostra mostradas na figura 43. Os dados referentes aos ensaios mecânico estão presentes na tabela 6.

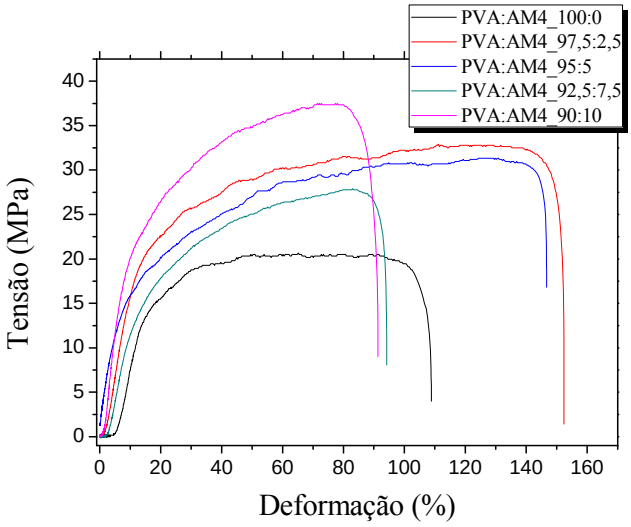


Figura 43 - Curvas dos ensaios mecânicos realizados nos filmes de PVA e AM4.

Tabela 6- Média dos valores obtidos no ensaio de tensão-deformação.

Filme	Tensão @máx	Módulo de Young	Deformação na força
PVA:AM4_90:10	35,67	250	180
PVA:AM4_92,5:7,5	25,96	175	170
PVA:AM4_95:5	31,21	230	220

PVA:AM4_97,5:2,5	31,69	170	220
PVA _100:0	25,18	220	180

Os ensaios mecânicos permitiram observar que a inserção do nanocompósito AM4 na matriz polimérica de PVA aumentou a tensão de ruptura para os filmes PVA:AM4_90:10; PVA:AM4_95:5 e PVA:AM4_97,5:2,5, assim como a deformação na tensão máxima para os filmes PVA:AM4_97,5:2,5 e PVA:AM4_95:5.

Os filmes de PVA:AM4 foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana, através de ensaios microbiológicos, nesse caso, o teste de halo de inibição. Todos os testes foram realizados em triplicata. A figura 44 mostra o ensaio realizado sobre o filme PVA:AM4_100:0, o qual era constituído somente do polímero puro PVA.

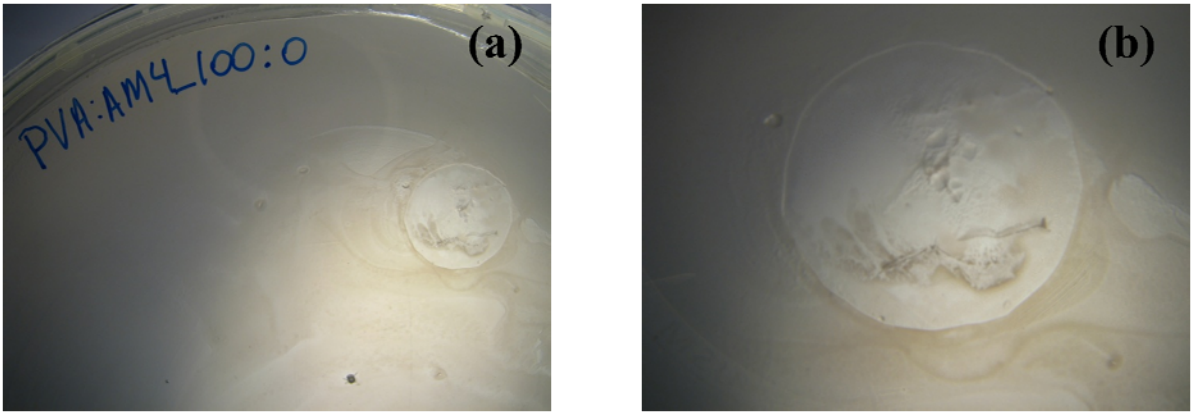
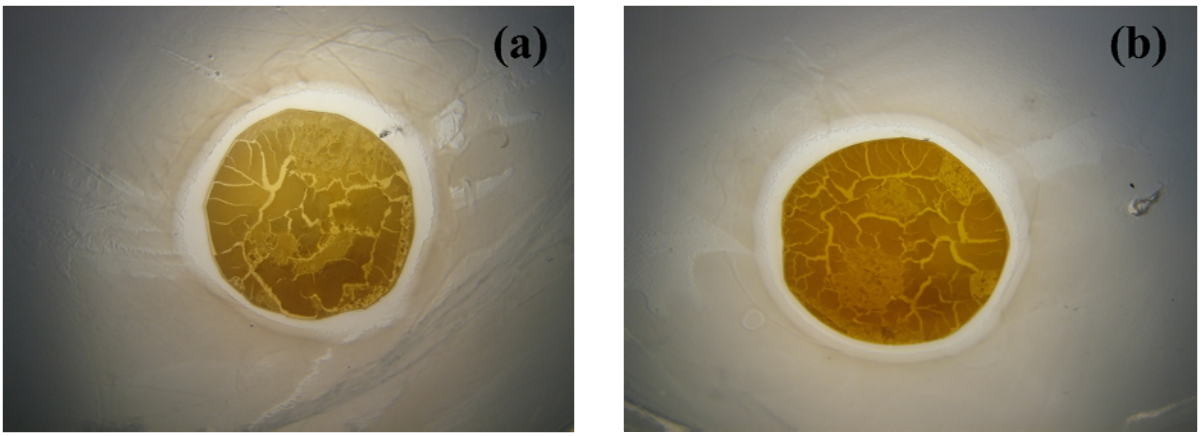


Figura 44 - Fotos do filme PVA:AM4_100:0 evidenciando o crescimento do microorganismo *E. coli*.

Todos os filmes que continham o nanocompósito AM4 (PVA:AM4_97,5:2,5; PVA:AM4_95:5; PVA:AM4_92,5:7,5 e PVA:AM4_90:10) apresentaram ação bactericida contra o microorganismo estudado a bactéria *E. coli*, como mostra a figura 45. As porcetagens das áreas dos halos de inibição de cada filme estão contidas na tabela 7.



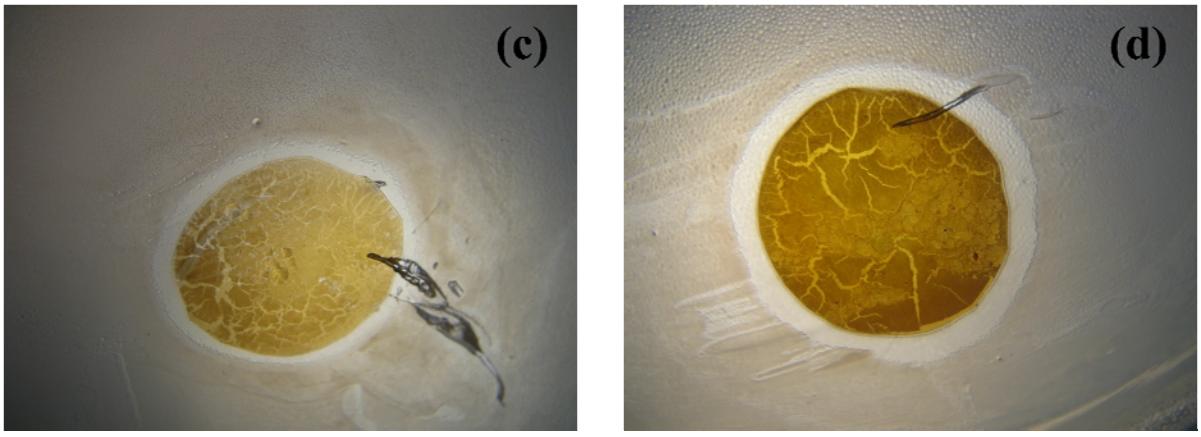


Figura 45 - Fotos do filme PVA:AM4_97,5:2,5 (a), PVA:AM4_95:5 (b), PVA:AM4_92,5:7,5 (c) e PVA:AM4_90:10 (d) evidenciando a ação bactericida de todos os filmes sobre o microorganismo *E. coli*.

Tabela 7 - Porcentagem da área e diâmetro de inibição dos halos contra o microorganismo *E. coli*.

Filme	Área de inibição (%)	Diâmetro de inibição (%)
PVA:AM4_90:10	145	120
PVA:AM4_92,5:7,5	142	119
PVA:AM4_95:5	140	118
PVA:AM4_97,5:2,5	137	117
PVA:AM4_100:0	0	0

Pela tabela 7, verificamos que áreas de inibição maiores foram obtidas para filmes contendo maiores quantidades de AM4, evidenciando a atividade bactericida desta composição.

Dessa forma, verificamos que a incorporação de um nanocompósito na matriz polimérica de PVA proporciona características bactericidas ao sistema, sugerindo assim a possibilidade da produção de embalagens inteligentes com ação bactericida.

5. Conclusões

5.1 Conclusões

Na primeira etapa do trabalho foi observado que a estabilidade dos colóides de prata pode ser obtida tanto estérica, como eletrostaticamente, sendo que a estabilização estérica permite o uso dos colóides em uma concentração mais alta e maior estabilidade (com base nos valores de potencial Zeta). Foi mostrado também que materiais como a QS, que contém grupos amina, possuem uma maior interação com as AgNPs, do que aqueles que possuem apenas grupos OH como o PVA. Assim a escolha de estabilizantes que possuam um maior número de grupos funcionais, principalmente grupos que contenham nitrogênio, enxofre e fósforo[11, 63, 64], se faz uma melhor opção do que o uso de estabilizantes que contenham apenas grupos hidroxilas, grupo que apresenta uma interação mais branda com as AgNPs[65]

Ao utilizarmos somente a QS na síntese, mas modificando a relação QS:AgNPs em massa, não foram observadas mudanças drásticas no sistema, em relação à posição da banda plasmônica ou forma da estrutura cristalina. Entretanto, a relação QS:AgNPs se mostrou de extrema importância no aumento da atividade bactericida do nanocompósito final contra a bactéria *E. coli* em solução. Assim, buscou-se o limite no qual a relação QS:AgNPs tivesse uma boa estabilidade e a melhor ação bactericida, sendo estabelecida em 4:1 de QS:AgNPs em massa.

Foi também observado a possibiliade do uso de redutores mais brandos na obtenção de AgNPs, como citrato de sódio e QS, em um rota de síntese alternativa àquela utilizada com $NaBH_4$. Nesse caso, verificou-se que os parâmetros de reação, como tempo e concetração de citrato de sódio, influênciam a morfologia final das NPs. Observou-se também que na rota de síntese utilizada sem o $NaBH_4$ o uso do citrato de sódio inibe a degradação da QS, em comparação da síntese utilizando somente a QS como redutor.

Na última parte do trabalho, verificamos o efeito da incorporação do nanocompósito AM4 (QS:AgNPs) na matriz de PVA. Através de análises térmicas, verificou-se que as AgNPs atuavam como ilhas de calor, aumentando a difusidade térmica dos sistemas, contribuindo para o aumento de perda de massa no segundo pico de degradação, além de inflênciarem da má formação dos esferulitos. Verificou-se também a diminuição da

temperatura de fusão do PVA em função do aumento da quantidade de carga de AgNPs. Já as características mecânicas dos filmes não foram modificadas de maneira significativas, com a adição de AM4, em relação ao PVA puro. Os testes de halo de inibição dos filmes revelaram um aumento da ação bactericida dos compósitos, com o aumento da quantidade de AM4, como esperado. Dessa forma, as análises térmicas, mecânicas e bactericidas dos compósitos revelam o grande potencial de aplicação destes materiais em embalagens inteligentes bactericidas, uma vez que são preservadas muitas das características do polímero da matriz, o que é de grande importância para o seu processamento.

6. Trabalhos futuros

Como continuação deste trabalho, propomos:

i) Sintese de nanoesferas do nanocompósito QS:AgNPs, permitindo assim uma liberação controlada das AgNPs.

ii) Inserção dos nanobiocompósitos de QS:AgNPs em polímeros/materiais utilizados em medicina para o desenvolvimento de curativos, pomadas de uso tópico ou instrumentos incisivos como cateters, diminuindo os riscos de infecções hospitalares.

iii) Uso do nanocompósito AM4 no tratamento de efluentes contaminados com patogênicos, por meio da mudança de pH. Em pH ácido (em torno de 4 a 5) o nanocompósito teria sua máxima ação bactericida, depois o efluente seria tratado até retornar ao pH 7 a 7,5, resultando na floculação do nanocompósito, sendo o mesmo filtrado e reaproveitado posteriormente.

Referências

1 FREESTONE, I.; MEEKS, N.;SAX, M.; HIGGITT, C. The lycurgus cup - a roman nanotechnology. *Gold Bulletin*, v. 40, n. 4, p. 270-277, 2007.

2 YACAMAN, J. M.; RENDON, L.; ARENAS, J.; PUCHE, M. C. S. Maya blue paint: an ancient nanostructured material. *Science,* v. 273, n. 5272, p. 223-225, 1996.

3 CAMUSSO, L.; BORTONE, S. *Ceramics of the world:* from 4000 b.c. to the present. New York: Harry N. Abrams, 1991.

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

5 ZHANG, C.; DING, Y.; PING, Q.; YU, L. L. Novel chitosan-derived nanomaterials and their micelle-forming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 22, p. 8409-8416, 2006.

6 MURUGADOSS, A.; CHATTOPADHYAY, A. A 'green' chitosan-silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst. *Nanotechnology,* v. 19, n. 1, p. 1-9, 2008.

7 YUAN, W.; JI, J.; FU, J.; SHEN, J. A facile method to construct hybrid multilayered films as a strong and multifunctional antibacterial coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 85B, n. 2, p. 556-563, 2007.

8 MILLER, J. C.; SERRATO, R.; REPRESAS-CARDENAS, J. M.; KUNDAHL, G. *The Handbook of nanotechnology, business, policy, and intellectual property law.* New Jersey: John Wiley and Sons, 2005.

9 DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C. E DE MORAIS, P. C. *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. Ed. Antenna, 2006.

10 BAKER, C.; PRADHAN, A.; PAKSTIS, L.; POCHAN, D. J.; SHAH, S. I. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v.5, n. 2, p. 244-249, 2005.

11 MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005.

12 GIBBS, R. J. *Silver colloids, do they work?* Disponível em <www.silver-colloids.com>. Acesso em: 12/05/2009.

13 RHIM, J. W.; HONG, S. I.; PARK, H. M.; NG, P. K. W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 16, p. 5814-5822, 2006.

14 DURAN, N.; MARCATO, P. D.; DE SOUZA, G. I. H.; ALVES, O. L.; ESPOSITO, E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 3, n. 2, p. 203-208, 2007.

15 RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 6, p.1457-1465, 2003.

16 MARQUES, P. R. B. D.; LERMO, A.; CAMPOY, S.; YAMANAKA, H. Double-tagging polymerase chain reaction with a thiolated primer and electrochemical genosensing based on gold nanocomposite sensor for food safety. *Analytical Chemistry,*v. 81, n. 4, p. 1332-1339, 2009.

17 ZHANG, L. Z.; YU, J. C.; YIP, H. Y.; LI, Q.; KWONG, K. W.; XU, A. W.; WONG, P. K. Ambient light reduction strategy to synthesize silver nanoparticles and silver-coated tio2 with enhanced photocatalytic and bactericidal activities. *Langmuir*, v. 19, n. 24, p. 9972-10380, 2003.

18 KELEHER, J.; BASHANT, J.; HELDT, N.; JOHNSON, L.; LI, Y. Z. Photo-catalytic preparation of silver-coated TiO2 particles for antibacterial applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 133-139, 2002.

19 ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, n. 1, p. 1-11. 2005.

20 ROSZEK, B.; DE JONG, W. H., GEERTSMA, R. E. *Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices*. RIVM report 265001001/2005.

21 EKIMOV, A. I.; ONUSHCHENKO, A. A. Quantum size effect in the optical-spectra of semiconductor microcrystals. *Soviet Physics Semiconductors,* v. 16, p. 775-778, 1982.

22 MURPHY, C. J.; JANA, N. R. Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires. *Advanced. Materials*, v. 14, n. 1, p. 80-82, 2002.

23 ALEKSEEVA, A. V.; BOGATYREV, V. A.; KHLEBTSOV, B. N.; MEL'NIKOV, A. G.; DYKMAN, L. A.; KHLEBTSOV, N. G. Gold nanorods: synthesis and optical properties. *Colloid Journal*, v. 68, n. 6, p.661-678, 2006.

24 YU, D.; YAM, V. W. W. Hydrothermal-induced assembly of colloidal silver spheres into various nanoparticles on the basis of htab-modified silver mirror reaction. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 109, n. 12, p. 5497-5503, 2005.

25 BARSOTTI JR., R. J.; O'CONNELL, M. S.; STELLACCI, F. Morfology control in self-assembled monolayers written by dip pen nanolithography. *Langmuir*, v. 20, n. 12, p. 4795-4798, 2004.

26 SINGH, Y.; JAVIER, J. R. N.; EHRMAN, S. H.; MAGNUSSON, M. H.; DEPPERT, K. Approaches to increasing yield in evaporation/condensation nanoparticle generation. *Journal of Aerosol Science*, v. 33, n. 9, p. 1309-1325, 2002.

27 FUJIMOTO, T; MIZUKOSHI, Y.; NAGATA, Y.; MAEDA, Y.; OSHIMA, R. Sonolytical preparation of various types of metal nanoparticles in aqueous solution. *Scripta Materialia*, v. 44, n. 8-9, p. 2183-2186, 2001.

28 PYATENKO, A.; SHIMOKAWA, K.; YAMAGUCHI, M.; NISHIMURA, O.; SUZUKI, M. Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in pure water. *Applied Physics A*-Materials Science & Processing, v. 79, n. 4-6, p. 803-806, 2004.

29 ZHANG, Z.; HAN, M. Template-directed growth from small clusters into uniform silver nanoparticles. *Chemical Physics Letters*, v. 374, n. 1-2, p. 91-94, 2003.

30 HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. *Química Nova*, v. 18, n. 2, p. 171-180, 1995.

31 SUN, Y. G.; MAYERS, B.; HERRICKS, T.; XIA, Y. N. Polyol synthesis of uniform silver nanowires: a plausible growth mechanism and the supporting evidence. *Nano Letters*, v. 3, n. 7, p. 955-960, 2003.

32 CAPEK, I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 110, n. 1-2, p. 49-74, 2004.

33 HEATH, J. R.; KNOBLER, C. M.; LEFF, D. V. Pressure/temperature phase diagrams and superlattices of organically functionalized metal nanocrystal monolayers: the influence of particle size, size distribution, and surface passivant. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 101, n. 2, p. 189-197, 1997.

34 KAMAT, P. V. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, v. *106, n. 32, p.* 7729-7744, 2002.

35 WEI, D.; QIAN., W. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent*. Colloids and Surfaces B*: Biointerfaces*,* v. 62, n. 1, p. 136-142, 2008.

36 MALLIN, M. P.; MURPHY, C. J. Solution-phase synthesis of sub-10 nm au-ag alloy nanoparticles. *Nano Letters,* v. 2, n. 11, p. 1235-1237, 2002.

37 EVANOFF JR., D. D.; CHUMANOV, G. Size-controlled synthesis of nanoparticles. 1. "silver-only" aqueous suspensions via hydrogen reduction. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 37, p. 13948-13956, 2004.

38 MERGA, G.; WILSON, R.; LYNN, G.; MILOSAVLJEVIC, B. H.; MEISEL, D. Redox catalysis on "naked" silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 111, n. 33, p. 12220-12226, 2007.

39 STEHR, J.; HRELESCU, C.; SPERLING, R. A.; RASCHKE, G.; WUNDERLICH, M.; NICHTL, A.; HEINDL, D.; KURZINGER, K.; PARAK, W. J.; KLAR, T. A.; FELDMANN, J. Gold nanostoves for microsecond dna melting analysis. *Nano Letters*, v. 8, n. 2, p. 619-623, 2008.

40 HUANG, H.; YUAN, Q.; YANG, X. Morphology study of gold-chitosan nanocomposites. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 282, n. 1, p. 26-31, 2005.

41 DOTY, R. C.; TSHIKHUDO, T. R.; BRUST, M.; FERNIG, D. G. Extremely stable water-soluble Ag nanoparticles. *Chemistry of Matererials*, v. 17, n. 18, p. 4630-4635, 2005.

42 LÓPEZ QUINTELA, M. A.;RIVAS REY, J.; BLANCO VARELA, M. C.. *Uso de clústeres cuánticos atómicos (AQCs) como antimicrobianos y biocidas*. 2319064, 05 out. 2007. (Oficina Espanhola de Patentes y Marcas).

43 ANJANA SARKAR, A.; KAPOOR, S.; MUKHERJEE, T. Synthesis of silver nanoprisms in formamide. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 287, n. 2, p. 496-500, 2005.

44 JIN, R. C.; CAO, Y. W.; MIRKIN, C. A.; KELLY, K. L.; SCHATZ, G. C.; ZHENG, J. G. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1901-1903, 2001.

45 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.

46 RAVEENDRAN, P.; FU, J.; WALLEN, S. L. Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the american chemical society*, v. 125, n. 46, p. 13940-13941, 2003.

47 SUN, L.; ZHANG, Z.; DANG. H. A novel method for preparation of silver nanoparticles. *Materials Letters*, v. 57, n. 24-25, p. 3874-3879, 2003.

48 PATAKFALVI, R.; VIRÁNYI, Z.; DÉKÁNY, I. Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions. *Colloid and Polymer Science*, v. 283, n. 3, p. 299-305, 2004.

49 CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; BRETT, C., M., A.; OLIVEIRA, O., N.; NART, F., C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, n. 35, p. 17478-17483, 2006.

50 FURLONG, D. N.; LAUNIKONIS, A.; SASSE, W. H. F.; SANDERS, J. V. Colloidal platinum sols - preparation, characterization and stability towards salt. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, v. 1, n. 80, p. 571-&, 1984.

51 TURKEVICH, J.; KIM, G. Palladium: preparation and catalytic properties of particles of uniform size. *Science*, v. 169, n. 3948, p. 873-879, 1970.

52 TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Faraday Discussions*, v. 11, p. 55-57, 1951.

53 KEY, F. S.; MAASS, G. *Ions, atoms and charged particles*. Disponível em <www.silver-colloids.com>. Acesso em: 12/05/2009.

54 FUNG, M. C.; BOWEN, D. L. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. *Clinical Toxicology*, v. 34, n. l, p. 119- 126, 1996.

55 GUGGENBICHLER, J. P.; BÖSWALD, M.; LUGAUER, S.; KRALL, T. A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. *Infection*, v. 27, Suppl. 1, p. 16-23, 1999.

56 GOLUBOVICH, V. N., RABOTNOVA, I. L. Kinetics of growth inhibition by silver ions. *Microbiology*, v. 43, p. 948-950, 1974.

57 SUN, R. W. Y.; CHEN, R.; CHUNG, N. P. Y.; HO, C. M.; LIN, C. L. S.; CHE, C. M. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *The Royal Society of Chemistry*, n. 40, p. 5059-5061, 2005.

58 HENDRY, A. T.; STEWART, I. O. Silver resistant *Enterobacteriaceae* from hospital patients. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 25, n. 8, p. 915-921, 1979.

59 SADOWSKI, Z.; MALISZEWSKA, I. H.; GROCHOWALSKA, B.; POLOWCZYK, I.; KOŹLECKI, T. Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. *Materials Science-Poland*, v. 26, n. 2, p. 421-424, 2008.

60 SANPUI, P.; MURUGADOSS, A.; DURGA PRASAD, P.V.; GHOSH, S. S.; CHATTOPADHYAY, A. The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*, v. 124, n. 2, p. 142-146, 2008.

61 KIM, K. J.; SUNG, W. S.; SUH, B. K.; MOON, S. K.; CHOI, J. S.; KIM, J. G.; LEE, D. G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on Candida albicans. *Biometals*, v. 22, n. 2, p. 235-242, 2008.

62 GAJJAR, P.; PETTEE, B.; BRITT, D.; W.; HUANG, W.; JOHNSON, W. P.; ANDERSON, A. J. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, Pseudomonas putida KT2440. *Journal of Biological Engineering*, v. 3, n. 9, p. 1-13, 2009.

63 MULVANEY, P.; LINNERT, T.; HENGLEIN, A. surface chemistry of coloidal silver in aqueous solution: observations on chemisorption and reactivity. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 95, n. 20, p. 7843-7846, 1991

64 HENGLEIN, A. Physicochemical properties of small metal particles in solution: “microelectrode” reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. *Journal of Physical Chemistry,*v. 97, n. 21, p 547-5471, 1993.

65 MBHELE, Z. H.; SALEMANE, M. G.; VAN SITTERT, C. G. C. E.; NEDELJKOVIĆ, J. M.; DJOKOVIĆ, V.; LUYT, A. S. Fabrication and characterization of silver-polyvinyl alcohol nanocomposites. *Chemitry of Materials*, v. 15, n. 26, p. 5019-5024, 2003.

66 FOXNEWS. Home, Health, *Man claims skin treatment turned face permanent blue*., 20 dez. 2007. Disponível em: <http://www.foxnews.com/story/0,2933,317564,00.html >. Acesso em: 10 jan. 2009.

67 OLIVEIRA, M. M. *Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades*. 2005, 174f, Tese (Doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

68 MADRAS, G.; MCCOY, B. J. Distribution kinetics theory of Ostwald ripening. *Journal of Chemical Physics*, v. 115, n. 14, p. 6699-6706. 6692001.

69 PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *Journal of Phyical Chemistry B*, v. 108, n. 3, p. 945-951, 2004.

70 KIM, D.; JEONG, S.; MOON, J. Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precurssor injection. *Nanotechnology*, v. 17, n.16, p. 4019-4024, 2006.

71 CUSHING, B.; KOLENICHENKO, V. L.;O’CONNOR, C. J. Recent advances in the liquid-phase synthesis of inorganic nanoparticles. *Chemical Review*, v. 104, n. 9, p. 3893, 2004.

72 MFLHOFER, H. F. Spontaneous precipitation from electrolytic solutions. *Pure & Applied Chemistry*, v.53, p.2041-2055.

73 TWU,Y. K.; CHEN, Y. W.; SHIH, C. M. Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions. *Powder Technology,* v. 185, n. 3, p. 251-257, 2008.

74 HYNING, D. L. V.; KLEMPERER, W. G.; ZUKOSKI, C. F. Silver nanoparticle formation: predictions and verification of the aggregative growth model. *Langmuir*, v. 17, n. 11, p. 3128-3135, 2001.

75 QUINTELA, M. A. L. AND REY, J. R. Stable atomic quantum clusters, production method thereof and use of the same. US 2009/0035852 A1, 2009.

76 CAO, G. *Nanostructures and nanomaterials*: synthesis, properties and applications., London: Imperial College Press, 2004.

77 WANG, S. W.; FALICOV, L. M.; SEARCY, A. W. The equilibrium shapes of small particles. *Surface Science*, v. 143, p. 609-625, 1984.

78 ROCHA, T. C. R. *Nanopartículas metálicas anisotrópicas: mecanismos de formação e aplicações ópticas*. 2008 172f Tese (Doutorado) - Instituto de Física Gleg Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

79 MALVERN INSTRUMENTS LTDA. *Zetasizer nano* series user manual. England: Malvern Instruments Ltda, 2005.

80 BODNAR, M.; HARTMANN, J. F.; BORBELY, J. Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*, v. 6, n.5, p. 2521-2527, 2005.

81 ZHANG, Z.; ZHANG, L.; WANG, S.; CHEN, W.; LEI, Y. A convenient route to polyacrylonitrile/silver nanoparticle composite by simultaneous polymerization-reduction approach. *Polymer*, v. 42, n. 19, p. 8315-8318, 2001.

82 HUANG, H.; YUAN, Q.; YANG, X. Preparation and characterization of metal-chitosan nanocomposites. *Colloids and Surfaces B:* Biointerfaces, v. 39, n. 1-2, p. 31-37, 2004.

83 KHANNA, P.K.; SINGH, N.; CHARAN, S.; SUBBARAO, V.V.V.S.; GOKHALE, R.; MULIK, U.P. Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method. *Materials Chemistry and Physics*, v. 93, n. 1, p. 117-121, 2005.

84 HUANG, H.; YANG, X. Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles in the absence/presence of tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, v. 5, n. 6, p. 2340-2346, 2004.

85 SUN, C.; QU, R.; CHEN, H.; JI, C.; WANG, C.; SUN, Y.; WANG, B. Degradation behavior of chitosan chains in the 'green' synthesis of gold nanoparticles. *Carbohydrate Research*, v. 343, n.15, p. 2595-2599, 2008.

86 COURROL, L. C.; OLIVEIRA, F. R.; GOMES, S. L. A simple method to synthesize silver nanoparticles by photo-reduction. *Colloids and Surfaces A:* Physicochemical Engeneering Aspects, v. 305, n. 1-3, p. 54-57, 2007.

87 LAUDENSLAGER, M. J.; SCHIFFMAN, J. D.; SCHAUER, C. L. Carboxymethyl chitosan as a matrix material for platinum, gold, and silver nanoparticles. *Biomacromolecules*, v. 9, n. 10, p. 2682-2685, 2008.

88 RAMARATNAM, K.; IYER, S. K.; KINNAN, M. K.; CHUMANOV, G. Ultrahydrophobic textiles using nanoparticles: lotus approach. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, v. 3, n. 4, p. 1-14, 2008.

89 NAIK, R. R.; JONES, S. E.; MURRAY, C. J.; MCAULIFFE, J. C.; VAIA, R. A.; STONE, M. O. Peptide template for nanoparticle derived from polymerase chain reaction-driven phage display. *Advanced Functional Materials*, v. 14, n. 1, p. 25-30, 2004.

90 LEE, E.; KIM, D. H.; WOO, Y.; HUR, H. G.;LIM, Y. Solution structure of peptide AG4 used to form silver nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 376, n. 3, p. 595-598, 2008.

91 KIM, H. S; KIM, Y. P.; OH, E.; HONG, M. Y.; LEE, T. G.; MOON, D. W. Novel construction of gold nanoparticle based peptide chip, and assaying enzyme activity and inhibtor effect using secondary ion mass spectrometric analysis. US 2008/0076676 A1, 2008.

92 FORNDEL, C. Stability of colloidal gold under hydrotermal conditions. *Economic Geology*, v. 33, n. 1, p. 1-20, 1938.

93 LI, R.; KIM, D. J.; YU, K.; LIANG, H.; BAI, C.; LI, S. Study of fine silver powder from AgOH slurry by hydrothermal techniques. *Journal of Materials Processing Technology*, v. 137, n. 1-3, p. 55-59, 2003.

94 CAI, J.; KIMURA, S.; WADA, M.; KUGA, S. Nanoporous cellulose as metal nanoparticles support. B*iomacromolecules*, v. 10, n. 1, p. 87-94, 2009.

95 JIN, R.; CAO, Y. W.;MIRKIN, C. A.; KELLY, K. L.; SCHATZ,G. C.; ZHENG, J. G. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprism. *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1901-1903, 2009.

96 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Departamento de Química Ambiental. *Álcool polivinil*.

Disponível em <http://www.qca.ibilce.unesp.br/prevenção/produtos/álcoolpolivinil.html>. Acesso em: 25 nov. 2009.

97 SAXENA, S. K. Polyvinyl alcohol (PVA) Chemical and technical assessment (CTA), *61st JECFA*, 2004.

98 DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 321, p. 477-483, 2008.

99 RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

100 OGAWA, K.; YUI, T.; OKUYAMA, K. Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 34, n. 1-2, p. 1-8, 2004.

101 OGAWA, K.; YUI, T.; OKUYAMA, K. Molecular and crystal structure of hydrated chitosan. *Macromolecules,* v. 30 , n. 19, p. 5849-5855, 1997

102 SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

103 KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

104 SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. chitosan functional properties *Glycoconjugate Journal*, v. 14, n. 4, p. 535-542, 1997.

105 HELANDER, I. M.; NURMIAHO-LASSILA, E. -L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 71, n. 2-3, p. 235-244, 2001.

106 LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 95, n. 2, p. 147- 155, 2004.

107 PARRAMON, J. S; ABDOLVAND, A.; PODLIPENSKY, A.; SEIFERT, G.; GRAENER, H.; SYROWATKA, F. Modeling of optical properties of silver-doped

nanocomposite glasses modified by electric-field-assisted dissolution of nanoparticles. *Applied Optics*, v. 45, n. 35, p. 8871-8881, 2006.

108 KOJIMA, Y.; USUKI, A.; KAWASUMI, M.; OKADA, A.; FUKUSHIMA, Y.; KURAUCHI, T.; KAMIGAITO, O. Mechanical properties of nylon 6-clay hybrid. *Journal of Materials Research*, v. 8, n. 5, p. 1185-1189, 1993.

109 SCHAEFER, D. W.; JUSTICE, R. S. How nano are nanocompoisite? *Macromolecules*, v. 40, n. 24, p.8501-8517, 2007.

110 KUMAR, A; VEMULA, P. K; AJAYAN, P. M.; JOHN, G. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nature Materials*, v. 7, p. 236-241, 2008.

1. 111 SUÁREZ, A. L.; RIVAS, J.; RODRÍGUEZ-ABREU, C. F.; RODRÍGUEZ, M. J.; PASTOR, E.; CREUS, A. H.; OSEROFF, S. B.; QUINTELA, M. A. Q. Facile synthesis of stable, sub-nanosized silver atomic clusters in microemulsions. *Angewandte Chemie International Edition,* v. 46, n. 46, p. 8823-8827, 2007.

112 KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CHING, H. S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, v. 5, n. 3, p. 205-212, 2002.

113 ROY, S. Nanostructured PZT synthesized from metal-polyvinyl alcohol gel: studies on metal-polymer interaction. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 110, n. 5, p. 2693-2697, 2008.

114 COZZOLI, P. D.; FANIZZA, E.; COMPARELLI, R.; CURRI, M. L.; AGOSTIANO, A. role of metal nanoparticles in TiO2/Ag nanocomposite-based microheterogeneous photocatalysis. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 28, p. 9623-9630, 2004.

115 BOWMAN, M. C.; BALLARD, T. E.; ACKERSON, C. J.; FELDHEIM, D. L.; MARGOLIS, D. M.; MELANDER, C. Inhibition of HIV fusion with multivalent gold nanoparticles. *Journal American Chemical Society*, v. 130, n. 22, p. 6896-6897, 2008.

116 SAKKA, S. *Sol-gel science and technology* - topics in fundamental research and applications. Norwell, Massachuusetts: Kluwer Academic Publishers, 1991. Disponível em:< http://books.google.com/books?id=5DHlax4eo8C&pg=PA154&dq=TiO2+band+gap&lr=&hl=pt-BR&cd=17#v=onepage&q=TiO2%20band%20gap&f=false >. Acesso em:15 jan. 2010.

117 NOGUEZ, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 111, n. 10, p. 3806-3819, 2007.

118 BHUMKAR, D. R.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of ph on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *AAPS PharmSciTech*, v. 7, n. 2, p. 1-6, 2006.

119 SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros:* Ciência e Tecnologia, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

Apêndice

Trabalhos resultantes desta Dissertação

Resumos publicados em anais de congressos

BERNI, E.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. Investigation on the bactericidal effects of silver-chitosan nanobiocomposites. In: ICAM - INTERNATIONAL CONFERENCE ON MATERIALS, 11th, 2009, Rio de Janeiro - RJ. *Resumo*... Rio de Janeiro - RJ: [s/l], 2009. p. 75.

BERNI, E.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. Interaction and bactericidal effect study of silver chitosan nanocomposite. In: INTERNACIONAL SOL GEL CONFERENCE, 2009, Porto de Galinhas - PE. *Resumo*... Porto de Galinhas – PE: [s/l], 2009, p. 37.

BERNI, E.; ZUCOLOTTO, V. Study of silver chitosan nanocomposite interaction. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADVENCED MATERIALS AND NANOSTRUCTURES, 2009, Santo André - SP. *Resumo*... Santo André – SP:[s/l], 2009, p. 28.

TSUTAE, F.; BERNI, E.; GUIMARAES, F. Improving optical processes responsible for subcutaneous pigment removal by using noble metal nanoparticles. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADVENCED MATERIALS AND NANOSTRUCTURES, 2009, Santo André - SP. *Resumo*... Santo André - SP:[s/l], 2009, p. 33.

BERNI, E.; ZUCOLOTTO, V. Development of silver chitosan/nanocomposites for bactericidal applications. In: WORKSHOP DO INSTITUTO NACIONAL DE ELETRÔNICA ORGÂNICA, 2009, Atibaia - SP. *Resumo*... Atibaia - SP: [s/l], 2009, p. 14.

Artigos

BERNI, E.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. *Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens*. Comunicado Técnico. Embrapa Instrumentação Agropecuária, v. 99, p. 1-4, 2008.

BERNI, E.; MATTOSO, L. H. C.; RIBEIRO, C. ZUCOLOTTO, V. *Interaction and bactericidal effect of silver-chitosan nanobiocomposite.* (em preparação).