

André Vinícius Andrade Bezerra

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOCIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM
FILMES DE POLIESTIRENO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado

Coorientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cintia Marangoni

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Bezerra, André Vinícius Andrade

Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Biocida de Nanopartículas de Prata em Filmes de Poliestireno / André Vinícius Andrade Bezerra ; orientador, Ricardo Antonio Francisco Machado ; coorientador, Ariovaldo Bolzan ; coorientadora, Cintia Marangoni – Florianópolis, SC, 2015

93 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referência

1. Engenharia Química. 2. Poliestireno. 3. Nanopartículas de prata. 4. Atividade antimicrobiana. I. Machado, Ricardo Antonio Francisco, II. Bolzan, Ariovaldo. III. Marangoni, Cintia. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

André Vinícius Andrade Bezerra

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOCIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM
FILMES DE POLIESTIRENO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Florianópolis, 9 de junho de 2015.

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado
Coordenador

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Coorientador

Prof^a. Dr^a. Cintia Marangoni
Coorientadora

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto

Dr^a. Alexsandra Valério

Prof. Dr. Admir José Giachini

Este trabalho é dedicado a todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado por ter me orientado e aos demais orientadores e colegas, por todo aprendizado e auxílio no laboratório.

Ao Laboratório de Diversidade Microbiana, especialmente ao Professor Admir Giachini, pelo auxílio nos ensaios microbiológicos.

A todos meus amigos do Laboratório de Controle de Processos e Polimerização, especialmente à Estela Mary Fernandes de Sá e ao Thiago Ouriques Machado, pela amizade, ajuda e apoio na realização do trabalho.

A todos meus amigos, pelos momentos de convivência e descontração.

À Emily Marques dos Reis, pelo amor, apoio e confiança.

À toda minha família, especialmente aos meus pais, Juarez Andrade Bezerra e Eloir Pedroso Campos, por tudo que vocês fizeram durante todas as etapas da minha vida. Muito obrigado.

RESUMO

Nanocompósitos são materiais onde ao menos um dos seus compostos apresenta dimensão em escala nanométrica; tanto podem ser formados pela combinação de componentes orgânicos e/ou inorgânicos com o intuito de melhorar as propriedades do material ou mesmo conceder novas características. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova rota de síntese de nanopartículas de prata para posterior obtenção de nanocompósitos de poliestireno para aplicação como embalagem de alimentos. Como primeira etapa foi aplicada uma estratégia de planejamento experimental para definir a melhor rota de síntese das nanopartículas de prata, onde foram avaliadas diferentes temperaturas e concentração do agente redutor. A nucleação das nanopartículas de prata foi monitorada empregando-se análises de UV-Visível. Dois estabilizantes hidrofóbicos, o ácido oleico e o poli(etileno glicol) PEG 400, foram empregados visando o controle da estabilidade do meio reacional. Na segunda etapa do trabalho, filmes poliméricos foram obtidos por polimerização em massa e dissolução em tolueno com posterior evaporação lenta do solvente. A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi realizada com diferentes concentrações de nanopartículas de prata na polimerização em massa do estireno com o objetivo de produzir filmes poliméricos com vários teores de prata. Os resultados permitiram concluir que a síntese das nanopartículas de prata, utilizando oleilamina como agente redutor, é influenciada pela concentração do agente redutor e pela temperatura do processo, sendo que o mecanismo de redução para a formação das nanopartículas ocorre através da redução do radical amino para iminas, e de iminas para nitrila. Poli (etileno glicol) PEG 400 na concentração de 5 mmol/L possibilitou a definição de rota de síntese mais estável. Também observou-se que a presença de nanopartículas de prata na matriz polimérica possibilita um incremento na estabilidade térmica do poliestireno. A concentração mínima inibitória foi de 7,33 mg/Kg para *S. aureus* e de 12,83 mg/Kg para *E. coli* e *S. typhimurium*.

Palavras-chave: Poliestireno. Nanopartículas de prata. Nanocompósitos. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Nanocomposites are materials where at least one of the compounds present is in nanoscale dimension; they can be formed by organic and inorganic components combination in order to improve material properties or even grant new characteristics. The aim of this study was to develop a new synthesis route of silver nanoparticles, with subsequent polymerization, obtaining polystyrene nanocomposites for application as food packaging. As the first step has been applied an experimental design strategy to define the best synthesis of silver nanoparticles, which were evaluated different temperatures and concentrations of the reducing agent. Silver nanoparticles nucleation was monitored employing UV-Visible analysis. Two hydrophobic stabilizers, oleic acid and Polyethylene glycol PEG 400, were employed for stability control of reaction medium. In the second step, polymeric films were obtained by bulk polymerization and dissolution in toluene with subsequent slow evaporation of solvent. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination was conducted through testing different concentrations of silver nanoparticles in the bulk polymerization of styrene in order to produce polymeric films with various silver content. The results showed that the synthesis of silver nanoparticles, using oleylamine as reducing agent, is influenced by concentration of reducing agent and process temperature, and the reduction mechanism for nanoparticles formation occurs through the reduction from amino group to imines and from imines to nitriles. Polyethylene glycol PEG 400 at a concentration of 5 mmol/L allowed more stable definition of synthesis route. Also observed that the presence of silver nanoparticles in polymeric matrix allows an increase in thermal stability of polystyrene. Minimum inhibitory concentration was 7.33 mg/Kg for *S. aureus* and 12.83 mg/Kg for *E. coli* and *S. typhimurium*.

Keywords: Polystyrene. Silver nanoparticles. Nanocomposites. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Polimerização do estireno.....	23
Figura 2 – Representação estrutural dos arranjos táticos do poliestireno.....	24
Figura 3 – Representação esquemática de oscilação plasmônica de superfície sob o efeito de um campo eletromagnético.....	28
Figura 4 – Representação esquemática da estabilização eletrostática e estérica em nanopartículas metálicas.....	30
Figura 5 – Estrutura da oleilamina.....	31
Figura 6 – Mecanismos de interação entre nanopartículas de prata e as células de bactérias.....	33
Figura 7 – Microscopia eletrônica de transmissão da incorporação de nanopartículas de prata em <i>E. coli</i> , conforme setas indicativas.....	34
Figura 8 – Métodos de obtenção dos nanocompósitos: I) mistura simples dos componentes; II) síntese das nanopartículas <i>in situ</i> ; III) polimerização da matriz polimérica <i>in situ</i>	36
Figura 9 – Representação do método de preparação da síntese das nanopartículas de prata.....	40
Figura 10 – Espectros de UV-Visível das amostras de nanopartículas sintetizadas de acordo com o planejamento experimental.....	47
Figura 11 – Diagrama de Pareto para valores de absorbância em 425 nm.....	48
Figura 12 – Diagrama de Pareto para valores de FWHM.....	49
Figura 13 – Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores de absorbância em 425 nm.....	53
Figura 14 – Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores de FWHM.....	54
Figura 15 – Espectros de UV-Visível durante a nucleação das nanopartículas de prata.....	55
Figura 16 – Nucleação das nanopartículas de prata em 420 nm.....	56
Figura 17 – Gráfico de $\ln(\alpha/(1-\alpha))$ em função do tempo; α é razão entre absorção no instante t com a absorção no final da reação. $R^2=0,95505$	57
Figura 18 – Valores obtidos da largura à meia altura em função do tempo.....	58
Figura 19 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) da melhor rota obtida do planejamento experimental, correspondente ao experimento 4 (B).....	59
Figura 20 – Perfil de degradação da solução coloidal das nanopartículas de prata.....	60
Figura 21 – Espectro de FTIR da oleilamina e das nanopartículas de prata.....	61
Figura 22 – Mecanismo de redução da oleilamina na síntese das nanopartículas de prata.....	62
Figura 23 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) utilizando ácido oleico na concentração de 0,01 mol/L.....	63

Figura 24 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) utilizando ácido oleico na concentração de 0,005 mol/L	64
Figura 25 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) utilizando PEG 400 na concentração de 0,01 mol/L.	66
Figura 26 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) utilizando PEG 400 na concentração de 0,005 mol/L	66
Figura 27 – Espectros de UV-Visível utilizando PEG 400 e ácido oleico na concentração de 0,005 mol/L.....	67
Figura 28 – Culturas de <i>S. aureus</i> após 4 horas de exposição em filmes de poliestireno puro (A) e com nanopartículas de prata (B) (7,33 mg/Kg).	70
Figura 29 – Culturas de <i>E. coli</i> após 4 horas de exposição em filmes de poliestireno puro (A) e com nanopartículas de prata (B) (12,83 mg/Kg).	71
Figura 30 – Culturas de <i>S. typhimurium</i> após 4 horas de exposição em filmes de poliestireno puro (A) e com nanopartículas de prata (B) (12,83 mg/Kg).	71
Figura 31 – Cinética de polimerização do poliestireno e do poliestireno.	73
Figura 32 – Perfil de degradação dos filmes de poliestireno.	74
Figura 33 – Espectro de FTIR dos filmes de poliestireno.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições estabelecidas do planejamento central composto.	41
Tabela 2 – Condições experimentais utilizadas na polimerização.	42
Tabela 3 – Análise de variância para a variável absorbância.	50
Tabela 4 – Análise de variância para a variável FWHM.	50
Tabela 5 – Valores observados e preditos obtidos do planejamento experimental referente a densidade óptica. $R^2=0,83497$	51
Tabela 6 – Valores observados e preditos obtidos do planejamento experimental referente a largura à meia altura. $R^2=0,9555$	52
Tabela 7 – Resultados da taxa de reação constante, da absorção no final da reação e do tempo de meia vida ($R^2=0,9564$).	56
Tabela 8 – Atribuição dos espectros de FTIR da oleilamina e da síntese das nanopartículas de prata apresentados na Figura 21.	61
Tabela 9 – Efeito da concentração e tipo de estabilizante nas propriedades das nanopartículas de prata.	64
Tabela 10 – Atribuição dos espectros de FTIR poliestireno (PS) e de poliestireno com nanopartículas de prata (PS-Ag), apresentados na Figura 34.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN - 2,2-Azo-bis-isobutironitrila

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Trifosfato Adenosina

BPO – Peróxido de Benzoila

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EPS – Poliestireno Expansível

FAAS – Espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier

FWHM – Largura a meia altura

GPPS – Poliestireno para uso geral

HEC – Hidroxietilcelulose

HIPS – Poliestireno de Alto Impacto

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose

PBS – Tampão fosfato salino

PDI – Índice de Polidispersão

PEG – Polietilenoglicol

PMMA – Poli (Metacrilato de Metila)

PS – Poliestireno

PVP – Poli(Pirrolidona Vinilíca)

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SPR – Ressonância de Plasmon de Superfície

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

TGA – Análise Termogravimétrica

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 OBJETIVOS.....	21
1.1.1 Objetivo Geral.....	21
1.1.2 Objetivos Específicos.....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 POLIESTIRENO.....	23
2.1.1 Características do Poliestireno.....	25
2.1.2 Poliestireno como material para embalagens.....	26
2.2 NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	27
2.2.1 Estabilidade de nanopartículas metálicas.....	29
2.2.2 Nanopartículas de prata.....	30
2.2.2.1 Rotas de síntese.....	30
2.2.2.2 Atividade biocida.....	31
2.3 NANOCOMPÓSITOS ORGÂNICO/INORGÂNICO.....	35
2.4 APLICAÇÕES.....	36
3 MATERIAL E METODOS.....	39
3.1 MATERIAIS.....	39
3.2 ROTA DE SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	39
3.3 NUCLEAÇÃO.....	41
3.4 ESTABILIDADE.....	41
3.5 PREPARAÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS.....	42
3.6 ATIVIDADE BIOCIDA.....	42
3.7 CINÉTICA DE POLIMERIZAÇÃO.....	43
3.8 CARACTERIZAÇÕES.....	43
3.8.1 Espectroscopia de UV-Visível.....	43
3.8.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	44
3.8.3 Análise termogravimétrica (TGA).....	45
3.8.4 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	45

3.8.5 Espectrômetro de Absorção Atômica com atomização por chama (FAAS).....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 ROTA DE SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	47
4.2 NUCLEAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	55
4.3 CARACTERIZAÇÕES.....	58
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	58
4.3.2 Análise termogravimétrica (TGA).....	60
4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	60
4.4 ESTABILIDADE.....	62
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOCIDA.....	67
4.6 CINÉTICA DE POLIMERIZAÇÃO.....	72
4.7 CARACTERIZAÇÕES.....	74
4.7.1 Análise termogravimétrica (TGA).....	74
4.7.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	74
5 CONCLUSÕES.....	77
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	79
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO A – Formulação dos meios de cultura.....	93

1 INTRODUÇÃO

A produção de embalagens com qualidade e segurança é uma das prioridades nas indústrias de alimentos. Além da aplicação de boas práticas higiênico-sanitárias é necessário também o acondicionamento do produto em embalagens adequadas para proteger e conservar durante toda a cadeia de distribuição, assegurando ao consumidor a aquisição de um produto inócuo.

Embalagens plásticas têm sido amplamente utilizadas na indústria de alimentos, devido às suas características como baixo custo de produção e transporte, baixa densidade e maior resistência. O Poliestireno é um dos principais polímeros sintéticos utilizados como embalagem para o acondicionamento de alimentos, protegendo-o contra danos mecânicos e condições adversas durante as fases de estocagem e comercialização. No entanto, estes materiais são potenciais vetores na proliferação de microrganismos.

A transmissão de doenças de origem alimentar através da ingestão de alimentos é um problema de saúde pública no Brasil e no mundo todo. As enfermidades de origem alimentar também causam sérias consequências econômicas para a sociedade. No Brasil, 792 surtos de origem alimentar foram relatados no ano de 2013, sendo os maiores números de casos causados por *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

A obtenção de nanocompósitos possui relevância na indústria de alimentos, através de combinações de elementos disponíveis com o intuito de melhorar as propriedades do material. Devido à alta resistência de algumas bactérias a antibióticos, a prata é uma alternativa no desenvolvimento de produtos antimicrobianos. As nanopartículas de prata possuem propriedades de ação bactericida contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e alguns vírus. Ademais, a prata é o metal que apresenta menor toxicidade para as células animais.

Portanto, com o auxílio da nanotecnologia, na busca por materiais que minimizam os danos causados a contaminação de alimentos e aumente sua vida útil, a obtenção de embalagens incorporadas com nanopartículas de prata é uma alternativa, a fim de não ocasionar risco ao consumidor. Diante deste contexto, uma nova rota para obtenção de filmes de poliestireno com nanopartículas de prata é proposta, proporcionando uma potencial aplicação na embalagem de alimentos devido a sua ação bactericida.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é a obtenção de nanocompósitos de nanopartículas de prata/poliestireno, realizando-se a

síntese das nanopartículas diretamente no monômero visando à aplicação em embalagem de alimentos.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

1. Definir a melhor rota de síntese das nanopartículas de prata com aplicação de técnicas de planejamento experimental e posterior caracterização do material obtido.
2. Analisar a nucleação das nanopartículas de prata sintetizadas pela melhor rota obtida no planejamento experimental.
3. Avaliar a estabilidade das nanopartículas pela adição de agentes estabilizadores.
4. Obter nanocompósitos por polimerização em massa e proceder sua caracterização.
5. Determinar a cinética de polimerização do estireno puro e na presença de nanopartículas de prata.
6. Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes de poliestireno contendo nanopartículas de prata e determinar a concentração mínima inibitória (CMI).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

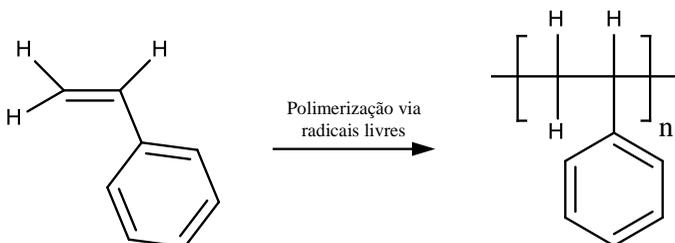
2.1 POLIESTIRENO

Poliestireno (PS) é um polímero formado a partir da polimerização do monômero estireno. Também denominado feniletileno, estírol ou vinilbenzeno, o estireno ($C_6H_5C_2H_3$) é um hidrocarboneto aromático insaturado, precursor do poliestireno. A forma mais utilizada para a produção de estireno é à partir da desidrogenação do etil-benzeno, esta que ocorre através da adição de óxidos metálicos em temperaturas elevadas entre 700 e 1000 °C (BILLMEYER, 1984).

O poliestireno foi descoberto por Eduard Simon em 1839, quando realizou a destilação de uma resina vegetal. No entanto, somente em 1930 começou a ser produzido comercialmente nas indústrias de plásticos (FRY, 1999). Em 2001, a produção mundial de poliestireno foi de 10,5 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável pela produção de 288 mil toneladas do material no mesmo ano, representando mais da metade da produção de PS na América do Sul (MONTENEGRO; SERFATY, 2002).

O processo mais comum de obtenção do poliestireno em escala comercial é empregando-se o processo de polimerização via radicais livres, como mostrado na Figura 1. A reação é iniciada pela decomposição de um inicializador (o qual forma os radicais livres). O Peróxido de Benzoila (BPO) e o 2,2-Azo-bis-isobutironitrila (AIBN) são os principais inicializadores utilizados no processo de polimerização (COIAI et al., 2006).

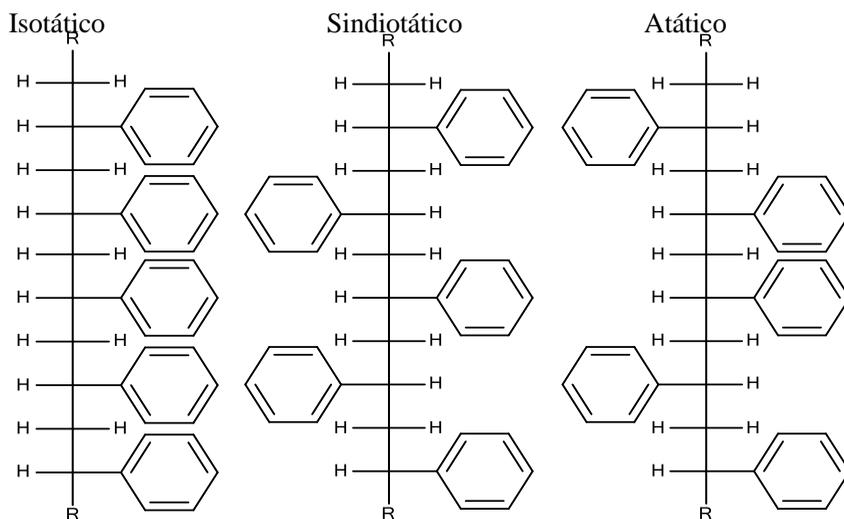
Figura 1 – Polimerização do estireno



Fonte: Adaptado de Billmeyer (1984).

Quanto a sua regularidade espacial, o poliestireno, quando polimerizado via radicais livres, possui configuração atática. Neste tipo de configuração, o grupo fenila está distribuído aleatoriamente ao longo da cadeia polimérica (CANEVAROLO JR., 2006; SCHELLENBERG, 2010). Outras formas de configuração que podem ser obtidas são a sindiotática, na qual o grupo fenila está alternado na cadeia polimérica, e a configuração isotática, onde todos os grupos laterais estão dispostos no mesmo lado da cadeia polimérica. O poliestireno com arranjo sindiotático e isotático pode ser produzido com o emprego de catalisadores estereoespecíficos (CANEVAROLO JR., 2006; SCHELLENBERG, 2010). Na Figura 2 é possível visualizar um esquema dos arranjos táticos do poliestireno.

Figura 2 – Representação estrutural dos arranjos táticos do poliestireno.



Fonte: Adaptado de Canevarolo Jr. (2006).

O poliestireno pode ser obtido em processo de polimerização em massa (KIM; CHOI; HONG, 2007), em solução (VAN HOOK; TOBOLSKY, 1958), em suspensão (KAEWTATIP; TANRATTANAKUL, 2008), em emulsão (HU et al., 2010), em miniemulsão (PAWELZYK; TOLEDO; WILLENBACHER, 2013) ou ainda pela conveniente combinação de tais processos, de acordo com a

finalidade e aplicação final da resina a ser obtida. A polimerização em *bulk* (polimerização em massa) e a polimerização em suspensão são os principais tipos de polimerização utilizados para obtenção de PS e HIPS (MONTENEGRO; SERFATY, 2002).

A polimerização em massa é um dos mais simples processos de polimerização. Neste processo, apenas o monômero, catalisador ou inicializador e os aditivos requeridos compõem o meio reacional. A principal vantagem desta técnica é a obtenção de polímeros livres de qualquer impureza e geralmente já obtidos no formato da aplicação final. No entanto, a principal desvantagem é o difícil controle da temperatura devido a elevada exotermicidade da reação, o que pode acarretar num produto final com propriedades mecânicas heterogêneas (CANEVAROLO JR., 2006; ODIAN, 2004).

Na polimerização em suspensão, um ou mais monômeros insolúveis, contendo o inicializador, são dispersos em água combinando-se agentes de suspensão (estabilizadores) e uma agitação mecânica vigorosa o suficiente para garantir a homogeneidade da temperatura do meio reacional. A agitação dispersa o monômero em forma de pequenas gotículas por todo o volume e o agente de suspensão, envolvido em cada gota, evitando a coalescência das gotas, mantendo-as estáveis. Durante a reação, as gotas de monômero são lentamente convertidas, passando por uma mistura viscosa (estágio “pegajoso”), até que atinjam o ponto de identificação da partícula (PIP). No PIP as partículas já apresentam rigidez o suficiente para não sofrerem quebraimento nem processos de coalescência, podendo ser observado e facilmente identificado pois, é o momento em que a fase dispersa atinge a mesma massa específica da água (meio contínuo). Após as partículas atingirem o PIP, a temperatura do processo é mantida até que a conversão desejada seja atingida, geralmente superior a 99,75%, conforme a legislação em vigor. Neste tipo de processo, o calor gerado é removido pela água, obtendo-se um maior controle da temperatura do sistema (CANEVAROLO JR., 2006; MACHADO; LIMA; PINTO, 2007; ODIAN, 2004).

2.1.1 Características do Poliestireno

Poliestireno é um termoplástico que possui diversas características desejáveis, tais como baixo custo, facilidade de processamento, estabilidade térmica, transparência, elasticidade e boas propriedades elétricas. Além disso, é um sólido amorfo, inodoro, insípido e facilmente moldável. Sua principal desvantagem é a baixa resistência, sendo um sólido quebradiço (BILLMEYER, 1984; FRY,

1999; MONTENEGRO; SERFATY, 2002). Devido as suas características, o poliestireno é vendido comercialmente em três diferentes formas:

1) Poliestireno para uso geral (GPPS) – Também denominado de polímero normal, estireno homopolímero e também cristal. As principais características do material é o brilho e a transparência (MONTENEGRO; SERFATY, 2002; MONTENEGRO et al., 1997).

2) Poliestireno Expansível (EPS) – Trata-se do poliestireno obtido em suspensão o qual sofreu uma impregnação com agente expensor (geralmente butano ou pentano) no decorrer da reação. No final do processo, o polímero obtido na forma de pequenas partículas é separado do meio contínuo (água) em um processo de centrifugação e posteriormente é expandido com vapor em cavidades na forma das peças desejadas. Este material é utilizado principalmente como isolante térmico e para embalagens protetoras (MONTENEGRO; SERFATY, 2002; MONTENEGRO et al., 1997).

3) Poliestireno de Alto Impacto (HIPS) – É o poliestireno que foi modificado pela incorporação de elastômeros butadiênicos na matriz polimérica. Como consequência, obtém-se um material mais resistente e menos quebradiço que o poliestireno normal (MONTENEGRO; SERFATY, 2002).

2.1.2 Poliestireno como material para embalagens

O Poliestireno, por possuir algumas características como barreira a vapor de água e umidade, baixo custo, ser inodoro e inerte, é um dos termoplásticos mais consumido no mundo. É largamente utilizado na fabricação de eletrodomésticos, eletrônicos, utensílios domésticos rígidos, e, principalmente, no acondicionamento de alimentos (MONTENEGRO; SERFATY, 2002; MONTENEGRO et al., 1997). O polímero é utilizado como material de embalagem de sobremesas, iogurtes e demais produtos lácteos. Na forma expansiva, é utilizado principalmente como bandejas para carne, peixe e vegetais (MATHLOUTHI, 1998; ZABANIOTOU; KASSIDI, 2003).

Durante o processo de obtenção do poliestireno, se não houver o esgotamento do monômero, a sua migração para o produto embalado (que foi acondicionado nas embalagens de poliestireno) pode ocorrer, representando um risco à saúde (AZEREDO, 2012; KHAKSAR;

GHAZI-KHANSARI, 2009). Khaksar e Gahzi-Khansari (2009) observaram a migração do estireno em copos de GPPS e HIPS, que ocorre principalmente em alimentos com alto teor de lipídios e em temperaturas elevadas. No Brasil, a resolução nº 105, de 19 de maio de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece um teor mínimo de monômero residual nos materiais plásticos que venham a entrar em contato com alimentos. O conteúdo máximo permitido é de 2500 mg de estireno/kg de poliestireno (2500 ppm). No entanto, esta parte da lei foi revogada pela Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 56, de 16 de novembro de 2012, no qual informa que não há restrições na utilização de estireno.

O setor de embalagens possui um papel fundamental na produção, distribuição e comercialização de produtos alimentícios. A principal função das embalagens é assegurar a qualidade do alimento, protegendo contra danos que possam ser causados por agentes externos (SANTOS; CASTRO, 1998), como por exemplo, agentes (ou fatores) de natureza química, física e microbiológica. Desta forma, pode-se dizer que o principal propósito das embalagens é de proteger o produto contra qualquer tipo de deterioração desde o acondicionamento até o consumo final (SOUSA et al., 2012). Sendo assim, o controle de qualidade microbiológico do material de acondicionamento é fundamental na avaliação dos pontos críticos de contaminação, sendo um problema relacionado diretamente com saúde pública, uma vez que o material contaminado transfere a contaminação para o alimento armazenado. (FIORENTINO et al., 2008). Portanto, com o auxílio da nanotecnologia, estão sendo desenvolvidas novas embalagens com propriedades antimicrobianas, a fim de não ocasionar risco ao consumidor. No Brasil, a Resolução nº 17, de 17 de março de 2008 da ANVISA estabelece a lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens em contato com alimentos.

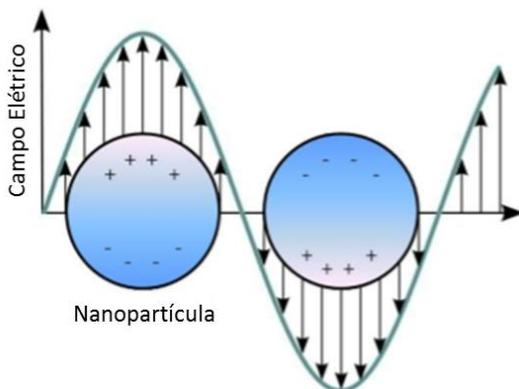
2.2 NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A nanotecnologia é um campo da ciência que estuda átomos, moléculas e macromoléculas com o objetivo de gerar novos materiais em escala nanométrica (10^{-9} m) (ROCO; MIRKIN; HERSAM, 2011). Essa tecnologia multidisciplinar, que pode ser aplicada em praticamente todos os setores industriais (BHATTACHARYYA et al., 2009; SILVA, 2008), também permite a caracterização, produção e aplicação de materiais ou estruturas com tamanhos que variam de 1 a 100 nanômetros (nm) (SOLOMON et al., 2007).

Estudos relatam que a nanotecnologia já era utilizada desde a antiguidade. A famosa taça de *Lycurgus* é um dos principais exemplos da utilização de nanomateriais. A taça foi produzida no ano IV a.C., sendo confeccionada em vidro contendo nanopartículas metálicas de ouro e de prata (FREESTONE et al., 2007). Quando iluminada pelo lado de fora, a luz é refletida e a taça de *Lycurgus* apresenta uma coloração verde, e quando iluminada por dentro, a luz é transmitida, exibindo coloração vermelha. A diferença de cores ocorre devido à presença de nanopartículas de ouro presentes no vidro que possuem propriedades de reflexão e transmissão (SILVA, 2008).

Quando a nanopartícula é submetida a um campo eletromagnético em determinada frequência, uma oscilação coletiva de elétrons da banda de condução do metal é induzida em resposta a excitação óptica promovida. A forma e tamanho da distribuição da carga elétrica, densidade do elétron e a massa de elétron efetiva são os principais fatores determinantes na frequência de oscilação (HAMMOND et al., 2014). Como consequência da radiação eletromagnética incidida na frequência do plasmon ressonante, ocorre um aumento na absorção da radiação. A oscilação coletiva dos elétrons leva a uma separação das cargas elétricas localizadas na superfície da partícula. Assim, em breves períodos, os elétrons acumulam-se mais em uma região do que em outra, conforme ilustrado na Figura 3 (HAMMOND et al., 2014; LERMÉ et al., 2010).

Figura 3 – Representação esquemática de oscilação plasmônica de superfície sob o efeito de um campo eletromagnético.



Fonte: Adaptado de Hammond et al. (2014).

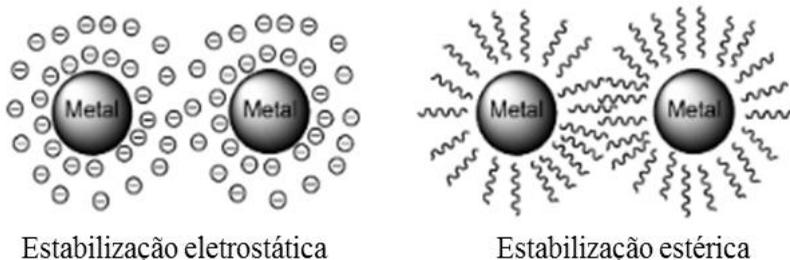
Desta maneira, nanopartículas metálicas possuem propriedades ópticas interessantes, pois estão relacionadas às oscilações de elétrons de condução do metal, sob ressonância de luz incidente, denominada ressonância dos plasmons de superfície (SPR). A SPR confere regiões de absorção na região do UV-Visível, designada bandas de plasmon. Segundo a teoria de Mie, qualquer alteração do índice de refração ocasionará em alterações na intensidade ou pico de absorção do SPR. Estas variações podem surgir a partir da mudança do meio de dispersão, ou na utilização de diferentes estabilizantes que possam interferir no índice de refração (SUN; XIA, 2002).

2.2.1 Estabilidade de nanopartículas metálicas

Devido ao seu tamanho reduzido e elevada área superficial, as nanopartículas podem apresentar instabilidade em função da energia superficial disponível. Durante a síntese, as nanopartículas podem se agregar através da formação da ligação metal-metal (MELO et al., 2012).

Para que tal fenômeno não ocorra é comum o emprego de agentes estabilizantes, os quais podem impedir a coalescência das nanopartículas. Resumidamente, dependendo da natureza dos agentes estabilizantes, existem dois tipos de estabilização de nanomaterias, a saber: a estabilização eletrostática e a estabilização estérica (BALANTA; GODARD; CLAVER, 2011). A estabilização eletrostática é determinada pela adição de uma carga, que fica adsorvida na superfície das nanopartículas, proporcionando uma proteção eletrostática, impedindo que a agregação ocorra (MURCIA; NAUMANN, 2005). As nanopartículas metálicas também podem ser estabilizadas por via estérica, onde as moléculas grandes (polímeros, dendrímeros, dentre outros) ficam adsorvidas na superfície, impedindo a aproximação de outras partículas (MURCIA; NAUMANN, 2005). Na Figura 4 pode ser observada uma representação esquemática dos estabilizantes eletrostáticos e estéricos adsorvidos na superfície da nanopartícula metálica.

Figura 4 – Representação esquemática da estabilização eletrostática e estérica em nanopartículas metálicas.



Fonte: Adaptado de Balanta, Godard e Claver (2011).

2.2.2 Nanopartículas de prata

A prata é um exemplo de metal de transição muito utilizado na produção de nanomateriais. Na forma de nanopartículas, com tamanho entre 1-100 nm, possui suas propriedades interessantes, tais como boa condutividade, propriedades catalíticas, efeito antimicrobiano e elevada área superficial. Essas propriedades têm possibilitado sua ampla utilização na indústria, principalmente na área de alimentos, biomédica, catálise e têxtil. Recentemente, estudos sobre as nanopartículas de prata têm aumentado o número de artigos publicados, atraindo cada vez mais atenção para a vasta gama de aplicações em vários campos da indústria (ABOU EL-NOUR et al., 2010; HAIDER; KANG, 2015; TOLAYMAT et al., 2010).

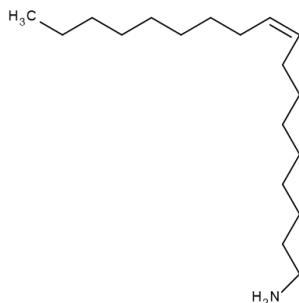
2.2.2.1 Rotas de síntese

Diferentes tipos de rotas de síntese para a obtenção de nanopartículas de prata estão descritos na literatura, com ou sem a adição de estabilizantes, tais como radiações gama, métodos sonoquímicos, eletroquímicos, sínteses solvotermiais, reduções químicas e bioquímicas, dentre outros (BISWAL et al., 2013; KOTAKADI et al., 2013; ROLDÁN; PELLEGRINI; SANCTIS, 2013; WANI et al., 2010, 2011). O preparo e condição da síntese possuem influência significativa nas características das nanopartículas como o tamanho, forma, estabilidade, dentre outras (ANDHARIYA; PANDEY; CHUDASAMA, 2013). O método de redução química é o mais comum utilizado na

produção de nanopartículas de prata, sendo o boroidreto de sódio (NaBH_4), o citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e o ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) os agentes redutores mais empregados (ABOU EL-NOUR et al., 2010). Atualmente, com o intuito de minimizar os danos ambientais causados por alguns agentes de redução, existe uma crescente demanda na utilização de produtos químicos mais amigáveis na síntese das nanopartículas (IRAVANI et al., 2014)

A oleilamina é uma alquilamina de cadeia longa que apresenta elevada temperatura de ebulição ($350\text{ }^\circ\text{C}$) e possui afinidade com metais através do grupamento NH_2 em sua estrutura (Figura 5). A oleilamina tem sido descrita na literatura como agente precursor na síntese de nanopartículas magnéticas (XU et al., 2009) e de nanoestruturas plasmônicas de ouro (LIU et al., 2007), cobre (SALAVATI-NIASARI; DAVAR; MIR, 2008) e prata (ANDHARIYA; PANDEY; CHUDASAMA, 2013). Além disso, é utilizada como agente estabilizante e solvente na síntese de nanopartículas (MOURDIKOU DIS; LIZ-MARZÁN, 2013).

Figura 5 – Estrutura da oleilamina.



Fonte: Autor (2015).

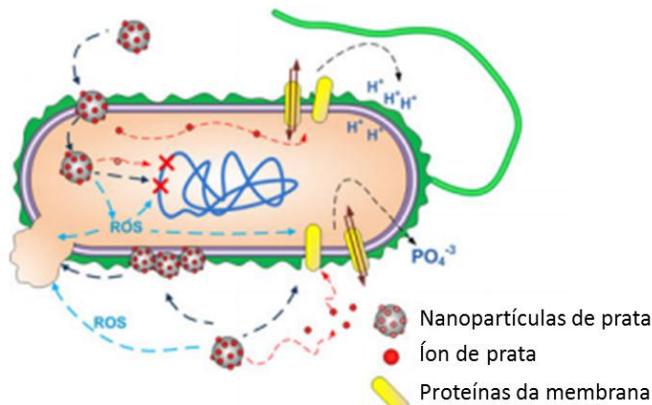
2.2.2.2 Atividade biocida

As nanopartículas de prata são utilizadas amplamente em diversos setores industriais, devido principalmente a sua atividade biocida, pois a prata, dentre os metais, é o que apresenta maior toxicidade contra microrganismos, como mostrado na escala: $\text{Ag} > \text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Pb} > \text{Co} > \text{Au} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Mo} > \text{Sn}$ (NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTO, 2008). Além disso, entre os metais citados, a

prata é o que possui menor toxicidade às células animais (NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTO, 2008).

O efeito biocida da prata em forma iônica foi observado pela primeira vez em células de algas pelo cientista Karl Wilhelm Von Naegelis em 1893 (GUGGENBICHLER et al., 1999). Embora as interações das nanopartículas de prata subjacente à atividade antimicrobiana sobre as bactérias ainda não foram completamente esclarecidos, alguns mecanismos foram sugeridos (Figura 6) (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010). As nanopartículas liberam íons de prata monovalente (Ag^+) que interagem com proteínas que possuem grupos tióis e sulfidríla (-SH), formando AgH e liberando enxofre, podendo causar inativação da proteína bacteriana (FENG et al., 2000). Os íons de prata também levam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) conforme se movimentam para dentro da célula, ocasionando danos ao DNA (HWANG et al., 2008). Outra via da morte celular é através da ligação das nanopartículas sob a superfície da membrana, interferindo na permeabilidade da mesma e na respiração celular (MATSUMURA et al., 2003; MORONES et al., 2005). Segundo o mecanismo proposto por Sondi e Salopek-Sondi (2004), as nanopartículas de prata formam poros irregulares na membrana celular, aumentando a permeabilidade, ocasionando na liberação de moléculas de lipopolissacarídeo e proteínas da membrana. A migração das nanopartículas para o interior da célula também pode ocorrer, causando danos devido à interação com compostos contendo enxofre e fósforo (MORONES et al., 2005). Desta forma, a replicação do DNA é inativada, pois possui fósforos presentes em sua composição, podendo levar à morte celular (FENG et al., 2000).

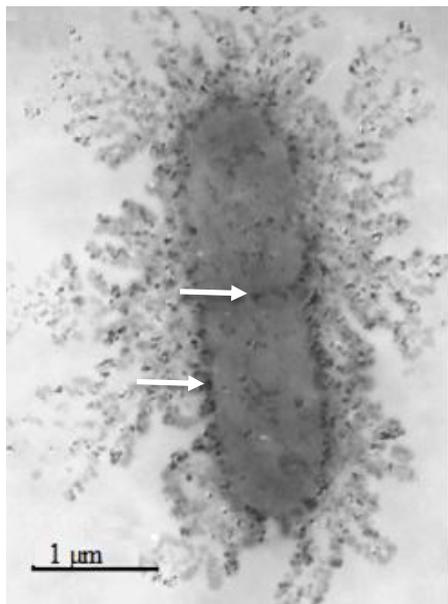
Figura 6 – Mecanismos de interação entre nanopartículas de prata e as células de bactérias.



Fonte: Adaptado de Marambio-Jone e Hoek (2010).

As nanopartículas de prata apresentam atividade antimicrobiana para diversos tipos de bactérias, tais como *Escherichia coli* (gram-negativa), *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa não fermentativa) (PATIL et al., 2011). No entanto, o efeito da atividade é diferente para cada tipo de bactéria. Bactérias gram-positivas possuem a parede celular mais espessa, protegendo a célula contra a infiltração de íons de prata no citoplasma, tornando o processo de morte celular mais lento (FENG et al., 2000). Na Figura 7 é possível observar uma micrografia de uma célula de *E. coli* com nanopartículas de prata localizadas em torno da membrana e incorporadas no interior da célula (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004).

Figura 7 – Microscopia eletrônica de transmissão da incorporação de nanopartículas de prata em *E. coli*, conforme setas indicativas.



Fonte: Sondi e Salopek-Sondi (2004).

Nanopartículas de prata também possuem atividade biocida contra alguns vírus, sendo o mecanismo de inativação semelhante ao processo observado em bactérias, podendo ser pela interação com proteínas presentes na superfície do vírus ou através da interação com o genoma viral (DNA ou RNA). Outra via de inativação é através do envolvimento com fatores diretamente relacionados à replicação viral (GALDIERO et al., 2011).

Algumas características das nanopartículas, tais como o tamanho, forma, superfície química, cristalinidade e estabilidade interferem na atividade biocida e na toxicidade das células (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010; MORONES et al., 2005). Quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior será sua área superficial que entrará em contato com os microrganismos. Desta maneira ocorrerá uma interação mais elevada e uma maior atividade biocida pois, as nanopartículas impregnam-se no interior das células mais facilmente (LU et al., 2013; PANACEK et al., 2006).

Em relação à forma, nanopartículas que possuem plano cristalino {111}, como por exemplo, nanopartículas triangulares, decaédricas e icosaédricas, possuem maior atividade biocida devido às suas estruturas geométricas, já que estas contêm maior número de átomos de alta densidade do que de outras formas (MORONES et al., 2005; VAN DONG et al., 2012). Pal e colaboradores (2007) mostraram que nanopartículas com formatos diferentes reagem diferentemente com a célula bacteriana. A inibição do crescimento de *E. coli* (10^7 UFC/ml) em placas de ágar nutriente na concentração de 1 µg de nanopartículas triangulares foi quase completa, enquanto que, para formas esféricas, foi necessário a utilização de 12,5 µg. Para as formas de bastonete precisouse de 50-100 µg de nanopartículas para obter tal efeito (PAL; TAK; SONG, 2007).

A estabilidade também é outro fator que pode interferir na atividade biocida. Kvítek e outros avaliaram o efeito de três estabilizantes (SDS, Tween 80 e PVP 360) na atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata. A utilização de SDS foi considerada mais eficaz, tanto na estabilidade quanto na atividade antibacteriana (KVÍTEK et al., 2008). Segundo os autores, o aumento da estabilidade por SDS está associado com a presença de camada dupla do tensoativo na superfície da nanopartículas, que por sua vez auxilia na permeabilidade da parede celular, corroborando na atividade antibacteriana (CHEN; YEH, 2002; KVÍTEK et al., 2008).

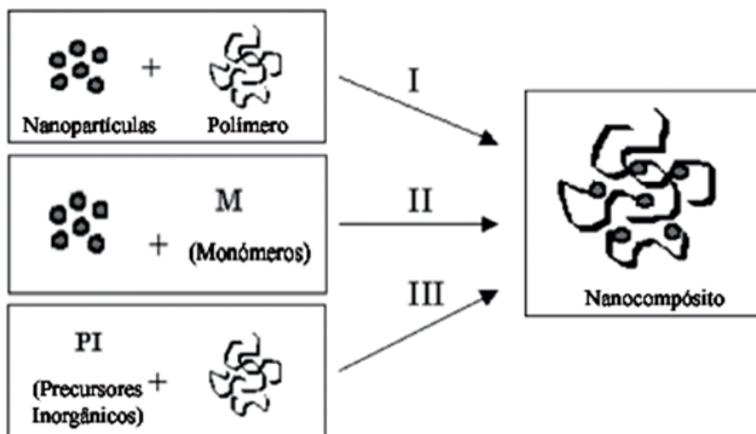
2.3 NANOCOMPÓSITOS ORGÂNICO/INORGÂNICO

Nanocompósitos são materiais onde ao menos um dos seus compostos apresenta dimensão em escala nanométrica. Os materiais são formados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos, podendo ser ligados por ligações fracas como pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e van der Waals, ou por ligações mais fortes como ligações covalentes ou iônico-covalentes (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004). Possuem uma ampla variedade de combinações de elementos disponíveis com o intuito de melhorar as propriedades do material. Geralmente, o componente orgânico é usado como matriz e o composto inorgânico se encontra disperso no meio. Devido à variedade de combinações, estes materiais possuem uma potencial aplicação em quase todos os setores industriais (JOSÉ; PRADO, 2005).

Os nanocompósitos podem ser obtidos na matriz polimérica através da inserção do composto inorgânico na estrutura do polímero (I),

ou na inserção no monômero e posterior polimerização *in situ* (II). Os nanocompósitos também podem ser obtidos através da síntese das nanopartículas *in situ* (III) (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004). Na Figura 8 podem ser observadas as rotas de preparação dos nanocompósitos.

Figura 8 – Métodos de obtenção dos nanocompósitos: I) mistura simples dos componentes; II) síntese das nanopartículas *in situ*; III) polimerização da matriz polimérica *in situ*.



Fonte: Adaptado de Esteves, Barros-Timmons e Trindade (2004).

2.4 APLICAÇÕES

Nanopartículas de prata possuem diversas aplicações na área biomédica, na indústria de alimentos, revestimento de tecidos, dentre outros (ABOU EL-NOUR et al., 2010; ANTUNES, 2013; DE MOURA; MATTOSO; ZUCOLOTTO, 2012; DUNCAN, 2011; HU et al., 2012; PRABHU; POULOSE, 2012; PROKOPOVICH et al., 2015; SALEHI-KHOJIN et al., 2013; TANKHIWALE; BAJPAI, 2009; YEO; LEE; JEONG, 2003; ZHOU et al., 2011). Devido a sua atividade biocida, nanopartículas de prata têm sido aplicadas na indústria têxtil. Yeo, Lee e Jeong (2003) incorporaram nanopartículas de prata em fibras de propileno, adquirindo uma elevada resistência bacteriana contra *E. coli*. Na área de revestimentos, Antunes (2013) avaliou a atividade biocida de nanopartículas de prata em tintas e vernizes acrílicos a base d'água, observando eficiência contra *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 100

ppm de nanopartículas de prata. O autor também realizou testes na concentração de 3,6 e 30 ppm, onde nenhum efeito antibacteriano satisfatório foi observado (ANTUNES, 2013).

Outra possível aplicação de nanopartículas de prata é na área de catálise. Hu e outros (2012) prepararam nanocompósitos de poliestireno com nanopartículas de prata e observaram elevada atividade catalítica do nanocompósito através da variação óptica na presença de uma solução de azul de metileno e boroidreto de sódio. As nanopartículas de prata atuam como um transmissor de elétrons, auxiliando na redução catalítica do azul de metileno pelo boroidreto de sódio (HU et al., 2012). Outro estudo realizado por Salehi-Khojin e colegas (2013) demonstrou que a utilização de nanopartículas de prata auxilia na conversão de CO₂ em líquidos iônicos. Os autores também observaram que a atividade catalítica aumenta com a diminuição do tamanho da nanopartícula até 5 nm (SALEHI-KHOJIN et al., 2013).

Aplicações biomédicas indicam a utilização das nanopartículas de prata como agentes anti-inflamatórios, biomateriais, implantes ósseos, nanosensores, dentre outros (PRABHU; POULOSE, 2012). Shin et al. (2007) relataram que nanopartículas de prata podem inibir a ativação de interferon-gamma e fator de necrose tumoral, envolvidos na inflamação. Nanopartículas de prata, devido a suas propriedades plasmônicas no meio dielétrico, possuem a capacidade de ser utilizadas em biosensoriamento, na detecção de anomalias e doenças do corpo humano (ZHOU et al., 2011). Zhou e colaboradores (2011) desenvolveram um nanobiosensor com nanopartículas de prata para detecção da proteína p53 a partir de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço. Na área de implantes ósseos, nanopartículas de prata, estabilizadas com ácido oleico, foram encapsuladas em PMMA para produzir um biomaterial com propriedades antimicrobianas para evitar a proliferação de bactérias multirresistentes (PROKOPOVICH et al., 2015).

No setor de embalagens de alimentos as nanopartículas de prata têm sido utilizadas como aditivo antimicrobiano e no aumento da estabilidade dos alimentos (AN et al., 2008; DUNCAN, 2011; TANKHIWALE; BAJPAI, 2009). Tankhiwale e Bajpai (2009) incorporaram nanopartículas de prata em filtros de papel com acrilamida. O biomaterial apresentou atividade biocida contra *E. coli*, podendo ser utilizado como embalagem antibacteriana de alimentos, prevenindo produtos alimentares da contaminação por microrganismos (TANKHIWALE; BAJPAI, 2009). Moura, Mattoso e Zucolotto (2012) incorporaram nanopartículas de prata em uma matriz de

hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) para aplicações em embalagem de alimentos. Os autores observaram que o nanocompósito apresentou boas propriedades mecânicas e de barreira. Além disso, os filmes de HPMC/AgNPs demonstraram atividade biocida contra *E. coli* e *S. aureus*, podendo ser utilizado como revestimento antimicrobiano interno (DE MOURA; MATTOSO; ZUCOLOTTO, 2012). An e colaboradores (2008) registraram o efeito de nanopartículas de prata em PVP, observando a redução do crescimento bacteriano na presença destes e aumentando a vida útil de aspargos, mantendo a qualidade de armazenamento.

A obtenção de nanocompósitos de poliestireno com nanopartículas de prata é bem descrita na literatura (AN et al., 2009; KAI et al., 2005; KUMBHAR; CHUMANOV, 2009; VODNIK et al., 2012; YOUSSEF; ABDEL-AZIZ, 2013; ZHANG et al., 2013). No entanto, alguns destes métodos de obtenção requerem a utilização de elevadas temperaturas, longos tempos de reação e/ou elevadas pressões (ZHANG et al., 2013). Neste contexto, o presente trabalho visa realizar a síntese das nanopartículas de prata diretamente no monômero e posterior polimerização em massa, visando a aplicação em embalagem de alimentos.

3 MATERIAL E METODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos empregados no desenvolvimento do presente trabalho.

3.1 MATERIAIS

No processo de síntese das nanopartículas de prata utilizou-se nitrato de prata (AgNO_3) (pureza: $\geq 99\%$) como agente precursor do metal e oleilamina 70% como agente redutor (Sigma-Aldrich, $>98\%$). O estireno foi fornecido pela empresa Innova S. A. (pureza $\geq 99,6\%$). Como co-estabilizantes da síntese foram utilizados ácido oléico p. a. (LabSynth) e poli(etilenoglicol) p.a. , com massa molar de 400 g/mol (PEG 400, Sigma Aldrich). Nas reações de polimerização o inicializador utilizado foi o Peróxido de Benzoila (BPO), fornecido pela Sigma-Aldrich, com pureza mínima de 97%. Como inibidor da polimerização foi utilizado p-benzoquinona (Sigma-Aldrich S. A. com 98% de pureza).

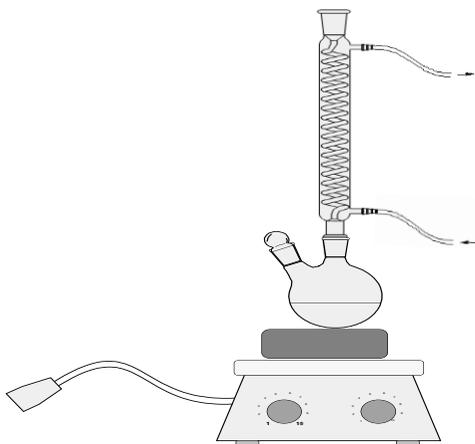
Com a finalidade de manter a atmosfera inerte no preparo dos filmes poliméricos, foi utilizado Nitrogênio, fornecido pela empresa AGA. O solvente Tolueno foi fornecido pela Vetec Ltda, pureza de 98%. Na avaliação da atividade biocida, foi utilizado caldo Mueller-Hinton *broth* (Himedia) para o crescimento das bactérias. Meio Ágar MacConkey (Himedia) e Ágar Mueller-Hinton (Himedia) foram utilizados para o crescimento das bactérias em contato com os filmes. Os filmes poliméricos foram submetidos ao contato com culturas contendo *E. coli* (ATCC 25922), *S. typhimurium* (ATCC 14028) e *S. aureus* (ATCC 25923). Tampão de fosfato salino (PBS) 10% (Dist) foi utilizado nas diluições das bactérias durante o ensaio.

3.2 ROTA DE SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese das nanopartículas de prata foi realizada utilizando nitrato de prata como agente precursor, oleilamina como agente redutor e estireno como solvente. Um planejamento experimental central composto com superfície de resposta foi realizado com o objetivo de desenvolver e otimizar a rota de síntese, além de observar o efeito das variáveis no processo de síntese das nanopartículas. Duas variáveis que interferem na formação das nanopartículas foram avaliadas como resposta, sendo estas a temperatura de síntese ($^{\circ}\text{C}$) e a concentração do agente redutor (mol/L). Nesta rota de síntese, a quantidade do agente

precursor (200 mg) e a quantidade de solvente (50 mL) foram os parâmetros que permaneceram fixos em todos os experimentos do planejamento experimental proposto. As sínteses foram realizadas em um balão de 250 mL, acoplado com um condensador (Figura 9).

Figura 9 – Representação do método de preparação da síntese das nanopartículas de prata.



Fonte: Autor (2015).

Os dados experimentais foram obtidos com o auxílio do software Statistics, versão 7.0. A largura da banda plasmônica e absorvância máxima foram as variáveis selecionadas como resposta. As variáveis independentes e seus níveis foram codificados em $-\alpha$, -1 , 0 , 1 , $+\alpha$, totalizando 10 experimentos, incluindo 4 pontos de cubo, 2 pontos centrais e 4 pontos axiais (Tabela 1). Em cada resposta estudada, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada a um nível de confiança de 95%. Para a visualização dos efeitos de cada resposta, diagramas de Pareto foram construídos e analisados, sendo estatisticamente diferentes os valores absolutos que fossem superiores ao efeito crítico.

Tabela 1 – Condições estabelecidas do planejamento central composto.

Experimentos	Concentração de oleilamina (mol/L)	Temperatura de síntese (°C)
1	0,15 (-1)	110 (-1)
2	0,15 (-1)	130 (1)
3	0,30 (1)	110 (-1)
4	0,30 (1)	130 (1)
5	0,33 (- α)	120 (0)
6	0,12 (α)	120 (0)
7	0,22 (0)	106 (- α)
8	0,22 (0)	134 (α)
9	0,22 (0)	120 (0)
10	0,22 (0)	120 (0)

3.3 NUCLEAÇÃO

A formação das nanopartículas de prata foi monitorada pela técnica de UV-Visível. Alíquotas foram retiradas durante a síntese para monitorar a nucleação das nanopartículas. Os espectros foram registrados a cada 2 minutos no intervalo de 350-700 nm. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, em um espectrofotômetro Hitachi, modelo UV-Vis 1900.

3.4 ESTABILIDADE

O tipo e concentração do co-estabilizador, fatores que interferem na polidispersidade das amostras, foram os parâmetros avaliados na estabilidade das nanopartículas. Os tipos de estabilizantes hidrofóbicos avaliados foram o ácido oleico e o PEG 400. As concentrações de agente estabilizante utilizadas neste estudo foram de 0,01 e 0,005 mol/L. Os estabilizantes (PEG 400 e Ácido oleico) foram adicionados no início da síntese, junto com o solvente e o agente redutor. Em seguida, a síntese foi conduzida de acordo com a melhor rota obtida no planejamento experimental. Os fatores avaliados foram analisados empregando-se a da técnica de UV-Visível e de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).

3.5 PREPARAÇÃO DOS FILMES POLIMÉRICOS

A polimerização do estireno foi realizada em sistema *bulk*, a 90 °C, utilizando BPO como inicializador. A solução coloidal das nanopartículas de prata, obtidas na síntese, foram diluídas no monômero e adicionadas no meio reacional para determinar a atividade biocida. Na Tabela 2 podem ser observadas as condições utilizadas na polimerização em massa. Ao final da reação de polimerização, as amostras foram dissolvidas em tolueno para posterior confecção dos filmes de poliestireno com nanopartículas de prata.

Os filmes poliméricos foram obtidos pela técnica de espalhamento da solução em uma placa plana e evaporação lenta do solvente, também denominada técnica de *Casting*. Aproximadamente 80 % em massa do solvente foram adicionados no material polimérico. Para obter a dissolução completa do polímero, as amostras ficaram estocadas durante 48 horas. Após este período, as mesmas foram espalhadas em uma superfície plana de vidro para evaporação do solvente, mantendo o sistema em uma atmosfera inerte com Nitrogênio, evitando a formação de bolhas.

Tabela 2 – Condições experimentais utilizadas na polimerização.

Parâmetros	Condições experimentais
Estireno	5 mL (43,64 mmol)
BPO	0,187 g (0,772 mmol)
Solução AgNP	Diluições $\frac{1}{100}; \frac{1}{50}; \frac{1}{20}; \frac{1}{18}; \frac{1}{16}; \frac{1}{14}; \frac{1}{12}; \frac{1}{10}; \frac{1}{5}$ mL

3.6 ATIVIDADE BIOCIDA

A atividade biocida foi realizada pelo método de contagem de colônias. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* foram as bactérias utilizadas para avaliar a atividade biocida dos filmes de poliestireno incorporados com nanopartículas de prata. As cepas bacterianas foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton a 37 ± 2 °C por 24 horas. Após este período, centrifugou-se 1,5 mL da cepa bacteriana por 2 minutos a 13.400 rpm, e em seguida, descartou-se o sobrenadante. As bactérias que ficaram no fundo do *ependorf* foram ressuspendidas em 1 mL de uma solução salina tamponada (PBS) 0,01 M. A determinação da concentração das bactérias foi feita por medidas de densidade óptica em 580 nm.

Foram adicionados 50 μL da bactéria, em uma concentração de 10^5 UFC/mL, nos filmes e estes foram deixados em contato por 4 horas. Durante este período, as amostras ficaram estocadas em uma câmara com controle de umidade. Após o tempo de contato, diluições seriadas (10^0 até 10^{-3}) na razão de 1:10 foram realizadas. *Spots* de 10 μL foram adicionados nos meios de cultura e incubados a 37 ± 2 °C para o crescimento das bactérias. A avaliação da atividade biocida foi realizada pela contagem de colônias após 24 horas.

Ágar MacConkey foi utilizado para o crescimento de *E. coli* e *S. typhimurium* e Ágar Mueller-Hinton foi empregado para se observar o crescimento de *S. aureus*. Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, esterilizados a 121 °C por 15 minutos. As formulações dos meios de cultura são apresentadas no Anexo A. O teste da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi realizado em triplicata. A análise da atividade biocida foi realizada no Laboratório de Diversidade Microbiana do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.7 CINÉTICA DE POLIMERIZAÇÃO

A cinética da polimerização foi realizada em *bulk*, utilizando ampolas de 5 mL submersas em um banho termostático a 90 °C. Amostras foram removidas a cada 15 minutos para monitorar a cinética da reação de polimerização e submersas em solução alcoólica a -10 °C para interromper a polimerização (*quench*). Posteriormente, as amostras foram retiradas das ampolas e pesadas em placas de Petri. Uma pequena quantidade de p-benzoquinona (1 ppm) foi adicionada como inibidor, evitando que a reação continuasse. Em seguida, as amostras foram diluídas em tolueno e colocadas em estufa a 60 °C, até completa evaporação do solvente e do monômero residual. O cálculo da conversão foi determinado por gravimetria através da diferença da massa da amostra analisada.

3.8 CARACTERIZAÇÕES

3.8.1 Espectroscopia de UV-Visível

As medidas de absorvância permitiram a caracterização das nanopartículas, devido as suas características ópticas. A espectroscopia de UV-Visível foi utilizada no planejamento experimental, nucleação e

estabilidade das nanopartículas. Aproximadamente 3 mL da amostra foram adicionados em uma cubeta de quartzo. As varreduras foram executadas entre 350 e 700 nm, com intervalo de 1 nm e velocidade de 400 nm/min, utilizando o software Hitachi Spectrophotometer UV Solutions. As análises de UV-Visível foram realizadas no espectrofotômetro do Laboratório de Controle de Processos e Polimerização do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, modelo U-1900, marca Hitachi.

3.8.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) foi realizada com o intuito de obter a morfologia das nanopartículas de prata e os diâmetros médios das partículas. As amostras foram diluídas no monômero (1:10) e gotejadas sobre um grid de cobre, revestido com filme de parlódio. Após, deixou-se secar em temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente. As análises de TEM foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, usando um microscópio modelo JEM-1011. A tensão utilizada na visualização das amostras foi de 100 kV.

As micrografias foram analisadas empregando-se o software *Size meter*, versão 1.1. Na determinação dos diâmetros das nanopartículas, realizou-se a calibração da imagem com a barra de referência do tamanho da imagem. O cálculo dos diâmetros das nanopartículas foi baseado no padrão de referência, realizado na calibração. Após a obtenção do diâmetro das nanopartículas de prata, foram calculados o diâmetro médio (Dp_n), o diâmetro volumétrico (Dp_w) e o índice de polidispersão (PDI), conforme equações 1-3.

$$Dp_n = \frac{\sum n_i Dp_i}{\sum n_i} \quad \text{Equação 1}$$

$$Dp_w = \frac{\sum n_i Dp_i^4}{\sum n_i Dp_i^3} \quad \text{Equação 2}$$

$$PDI = \frac{Dp_w}{Dp_n} \quad \text{Equação 3}$$

3.8.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é uma técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa da amostra em função da temperatura, na qual pode ser resfriada ou aquecida. Normalmente, a análise é realizada em velocidades entre 5 e 10 °C/min (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Foram analisadas nanopartículas de prata estabilizadas com oleilamina, dispersas no estireno e filmes de poliestireno incorporados com nanopartículas de prata. Aproximadamente 10 mg da amostra foram pesadas em um cadinho de cerâmica (Al_2O_3) e conduzidas a uma faixa de aquecimento de 50 °C a 700 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. A análise de TGA foi realizada no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, no equipamento STA modelo 443 F3 Jupiter, marca Netsh.

3.8.4 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi realizada para determinar os grupos funcionais presentes na síntese das nanopartículas de prata e nos filmes de poliestireno. Dependendo das ligações interatômicas, diferentes tipos de vibrações entre átomos podem ser observadas. A análise de FTIR foi realizada no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, modelo IRPrestige 2, marca Shimadzu.

Na análise da síntese e do filme de poliestireno, foram utilizadas pastilhas de KBr para análise, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , 40 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . A medida de referência foi realizada com KBr puro. Após a medição, a solução coloidal das nanopartículas de prata foi adicionada na pastilha e secada em seguida. Na análise dos filmes poliméricos, as amostras foram maceradas e misturadas com KBr para posterior análise.

3.8.5 Espectrômetro de Absorção Atômica com atomização por chama (FAAS)

A determinação da concentração mínima inibitória de prata nos filmes de poliestireno foi determinada pela análise de FAAS. Nesta

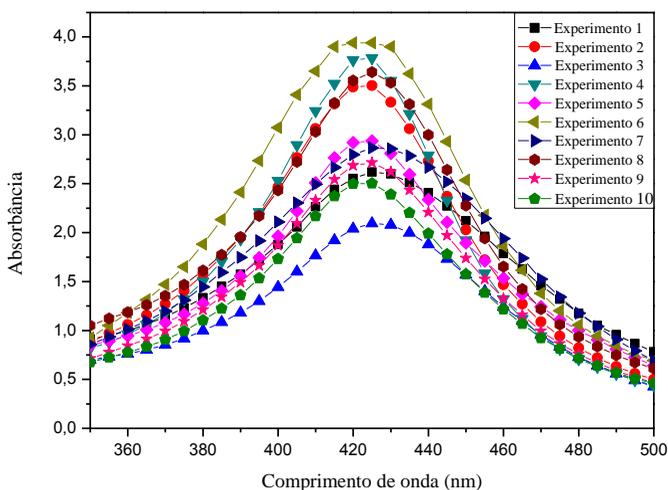
análise, pesou-se 0,5 gramas do material em uma balança analítica e levou-se a amostra para mufla para ser calcinada a 550 °C. Após a calcinação, as cinzas foram dissolvidas com ácido nítrico, avolumando a solução para 25 mL com concentração final de ácido a 1%. A quantificação da prata foi realizada num espectrômetro de absorção atômica da Perkin Elmer, modelo pinAAcle 990T. As análises foram desenvolvidas na Central de Análises, no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ROTA DE SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O planejamento central composto foi realizado com o objetivo de obter as melhores condições de síntese das nanopartículas e observar os principais efeitos das variáveis independentes pela variável resposta. O planejamento e análise dos experimentos foram realizados segundo a metodologia de superfície de resposta. Diagramas de Pareto foram obtidos para determinar a relação entre a variável de resposta e as variáveis significativas. A resposta óptica das nanopartículas de prata sintetizadas e estabilizadas com oleilamina e dissolvidas no estireno apresenta, em todos os experimentos do planejamento experimental (Tabela 1), superfície plasmônica bem definida, por volta de 420 nm, característica esta das nanopartículas de Ag^0 (Figura 10).

Figura 10 – Espectros de UV-Visível das amostras de nanopartículas sintetizadas de acordo com o planejamento experimental.



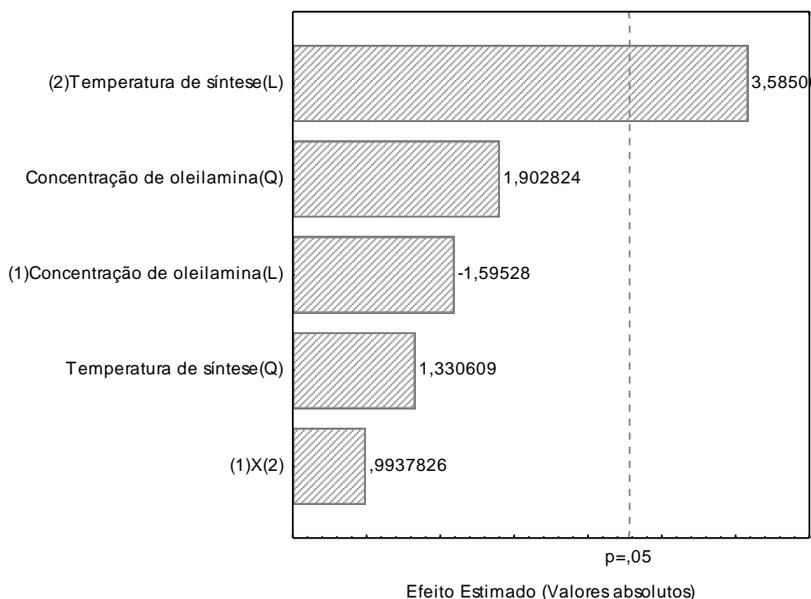
Fonte: Autor (2015).

A temperatura de síntese variou de 105,9 °C até 134,1 °C no planejamento experimental. A utilização de temperaturas mais elevadas é inviável devido à temperatura de ebulição do estireno (145 °C).

Embora a iniciação térmica torne-se significativa à temperaturas de polimerização acima de 100 °C, a quantidade de nanopartículas de prata presentes inibem tal reação. Isso ocorre pois a prata, na forma em que se encontra, possui atividade antioxidante, neutralizando os radicais livres (CHEN, 2000; MITTAL; KALER; BANERJEE, 2012). Em relação à outra variável independente estudada, em todas as concentrações de oleilamina utilizadas (0,12 até 0,33 mol/L) foi possível sintetizar as nanopartículas de prata.

Os diagramas de Pareto foram obtidos para se determinar a relação entre a variável de resposta com as variáveis significativas. Em um nível de significância de 95%, os resultados mostram que apenas a temperatura de síntese em escala linear é estatisticamente significativa (Figura 11). Este efeito (3,585) foi sinérgico, ou seja, quanto maior a temperatura de síntese, maiores os valores de absorbância.

Figura 11 – Diagrama de Pareto para valores de absorbância em 425 nm.

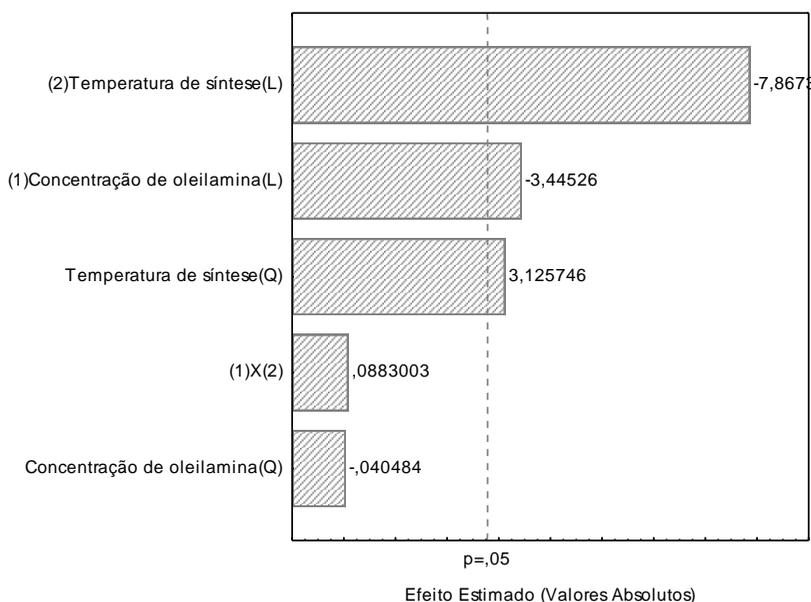


Fonte: Autor (2015).

Considerando a largura à meia altura (FWHM) como variável resposta, é possível observar no Diagrama de Pareto que a concentração de oleilamina em escala linear e a temperatura de síntese em escala

linear e quadrática foram as variáveis estatisticamente significativas no intervalo de confiança de 95%. Analisando-se a Figura 12 é possível concluir que, em valores absolutos, a variável *temperatura de síntese* foi o efeito mais significativo (-7,8673), seguido pela concentração de oleilamina (-3,44526), ambas em escala linear. O efeito em ambas as variáveis é negativo, indicando que o aumento da temperatura de síntese e da concentração de oleilamina corroboram com o estreitamento da FWHM. Não houve efeito significativo na interação entre as variáveis independentes em ambas as variáveis respostas.

Figura 12 – Diagrama de Pareto para valores de FWHM.



Fonte: Autor (2015).

A análise de variância por regressão múltipla comprovou correlação significativa entre as variáveis independentes e a variável resposta através do teste de significância (Tabela 3 e Tabela 4), já que o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} (BARROS; SCARMÍNIO; BRUNS, 2001). Modelos quadráticos foram descritos para avaliar a relação entre as variáveis independentes e a resposta. As Equações $y = 40,9611 - 56,9266x_1 + 6,4109x_1^2 - 0,569x_2 + 0,023x_2^2 + 0,2492x_1x_2$ Equação 4 e 5 representam os modelos quadráticos

obtidos para determinação da absorvância e da FWHM, respectivamente.

A análise de variância indicou que o modelo apresentado na equação $4y = 40,9611 - 56,9266x_1 + 6,4109x_1^2 - 0,569x_2 + 0,023x_2^2 + 0,2492x_1x_2$ Equação possui um coeficiente de regressão positivo ($R^2=0,83497$). Em relação ao modelo da Equação 5, o coeficiente de regressão também foi positivo ($R^2=0,9555$). Em ambas as respostas, os valores preditos se aproximaram dos valores experimentais, sendo assim os modelos quadráticos obtidos foram aplicáveis neste estudo. As Tabelas 5 e 6 apresentam os valores observados e preditos referente as variáveis absorvância e FWHM, respectivamente.

Tabela 3 – Análise de variância para a variável absorvância.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	P
Regressão	2,16353	2	1,081765	5,98681	0,030501
Resíduo	1,264839	7	0,180691		
Total	3,428369				

F_{tabelado} (2,7) = 4,737

Tabela 4 – Análise de variância para a variável FWHM.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	P
Regressão	209,4245	2	104,7122	16,0922	0,00241
Resíduo	45,5491	7	6,507		
Total	254,5491				

F_{tabelado} (2,7) = 4,737

$$y = 40,9611 - 56,9266x_1 + 6,4109x_1^2 - 0,569x_2 + 0,023x_2^2 + 0,2492x_1x_2 \quad \text{Equação 4}$$

$$y = 478,6914 - 36,7992x_1 - 5,7559x_1^2 - 6,3889x_2 + 0,0246x_2^2 + 0,0991x_1x_2 \quad \text{Equação 5}$$

Onde x1 e x2 representam os valores da concentração de oleilamina e temperatura de síntese, respectivamente.

Tabela 5 – Valores observados e preditos obtidos do planejamento experimental referente a densidade óptica. $R^2=0,83497$.

Experimentos	Fatores			Absorbância			
	Concentração do agente redutor (mol/L)	Temperatura de síntese (°C)	Valores observados	CV** (%)	Valores preditos	CV** (%)	Erro (%)
1	0,15	110	2,66387 ± 0,05288	1,9851443	3,11509 ± 0,04322	1,38748775	16,93850938
2	0,15	130	3,5886 ± 0,08696	2,423115097	3,69485 ± 0,08555	2,315349394	2,960830698
3	0,3	110	2,14753 ± 0,15295	7,122310445	2,31496 ± 0,1429	6,172745703	7,796442972
4	0,3	130	3,81067 ± 0,06737	1,768069701	3,64221 ± 0,02314	0,635288313	4,420687
5	0,33	120	2,9297 ± 0,10872	3,711081288	2,98593 ± 0,10521	3,523469282	1,9192230852
6	0,12	120	3,92297 ± 0,0276	0,703481452	3,58286 ± 0,02545	0,710367483	8,669551532
7	0,224	105,9	2,79763 ± 0,12006	4,291567791	2,41772 ± 0,06308	2,609196939	13,57964108
8	0,224	134,1	3,65733 ± 0,15035	4,110935145	3,75894 ± 0,10256	2,728347928	2,778032156
9	0,224	120	2,72083 ± 0,0493	1,81193493	2,62127 ± 0,03342	1,274833194	3,65934447
10	0,224	120	2,51597 ± 0,0372	1,478649545	2,62127 ± 0,03343	1,274833194	4,185349669

* Cálculo do coeficiente de variação: $CV = \frac{\sigma}{\mu} * 100$

** Cálculo do erro percentual: $Erro = \left(\frac{experimental - predito}{experimental} \right) * 100$

Tabela 6 – Valores observados e preditos obtidos do planejamento experimental referente à largura à meia altura. $R^2=0,9555$.

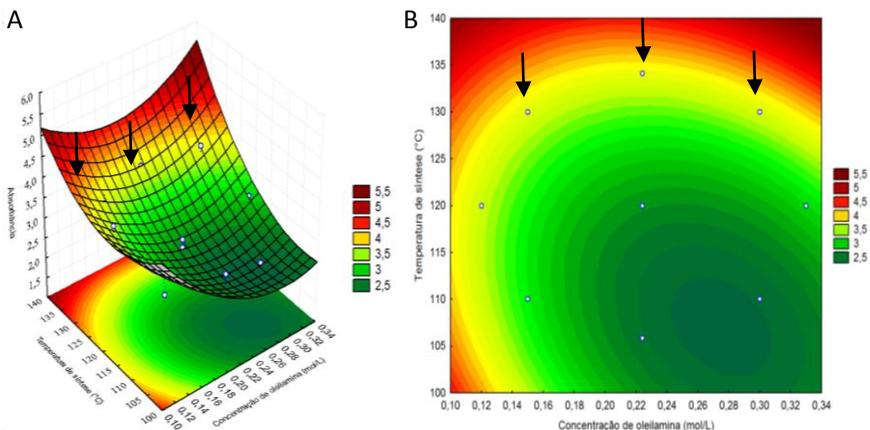
Experimentos	Fatores			FWHM			
	Concentração do agente reductor (mol/L)	Temperatura de síntese (°C)	Valores observados	CV** (%)	Valores preditos	CV** (%)	Erro (%)
1	0,15	110	67,8944 ± 1,723277	2,538172755	68,92123 ± 0,963616	1,398141509	1,512391304
2	0,15	130	60,14232 ± 0,322772	0,536680998	59,85947 ± 1,24837	2,085501609	0,470306187
3	0,3	110	63,24104 ± 0,39406	0,62310791	65,06208 ± 0,21198	0,325811372	2,879518681
4	0,3	130	55,73988 ± 1,921997	3,448154107	56,25736 ± 0,939862	1,670647155	0,928385762
5	0,33	120	58,05834 ± 0,812988	1,400295761	56,99226 ± 0,325576	0,571264088	1,83622711
6	0,12	120	63,24164 ± 3,00277	4,748090175	62,50464 ± 2,015874	3,225159103	1,165378916
7	0,224	105,9	73,50092 ± 0,343892	0,467874402	71,60757 ± 0,741596	1,03563881	2,575944925
8	0,224	134,1	57,78058 ± 0,275443	0,476705968	58,65851 ± 0,674407	1,14971681	1,519419439
9	0,224	120	60,77902 ± 0,143267	0,235718524	59,97469 ± 0,126737	0,211317349	1,323374423
10	0,224	120	59,27651 ± 0,160935	0,271497987	59,97469 ± 0,126737	0,211317349	1,177840356

* Cálculo do coeficiente de variação: $CV = \frac{\sigma}{\mu} * 100$

** Cálculo do erro percentual: $Erro = \left(\frac{experimental - predito}{experimental} \right) * 100$

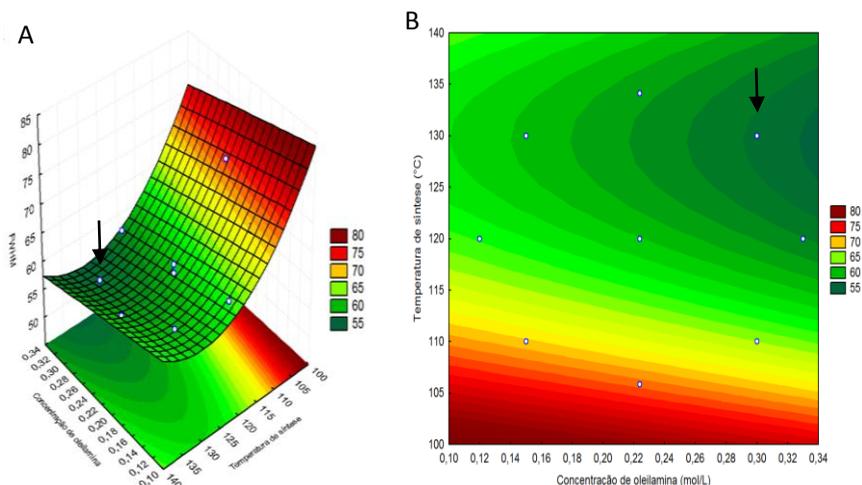
Na Figura 13 podem ser observados a superfície de resposta (A) e os contornos (B), mostrando a influência da temperatura de síntese e concentração de oleilamina em função da absorbância a 425 nm. Nota-se que com o aumento da temperatura de síntese ocorre também o aumento da densidade óptica. Os melhores valores de absorbância foram observados nos níveis (-1, 1), (+1, +1) e (α , 0). Considerando os valores de FWHM, é possível observar que o aumento da concentração de oleilamina e da temperatura de síntese, ocorre a diminuição da largura à meia altura. Verifica-se que a melhor região foi observada no nível (+1, +1) referente a largura à meia altura (Figura 14).

Figura 13 – Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores de absorbância em 425 nm.



Fonte: Autor (2015).

Figura 14 – Superfície de resposta (A) e curva de nível (B) referente aos valores de FWHM.



Fonte: Autor (2015).

Logo, segundo planejamento experimental, observou-se que a variável *concentração de oleilamina* estava relacionada com o estreitamento de FWHM. Conforme aumenta a quantidade de oleilamina, maior será a quantidade que ficará adsorvida na superfície da nanopartícula, causando o estreitamento de FWHM, aumentando a estabilidade da mesma. A variável *temperatura de síntese* estava relacionada com o aumento da densidade óptica e do estreitamento de FWHM. Provavelmente, com o aumento da temperatura, mais núcleos são formados, aumentando a formação de Ag^0 . Além disso, a redução do agente redutor estabelece ligações mais fortes, auxiliando na estabilidade das nanopartículas.

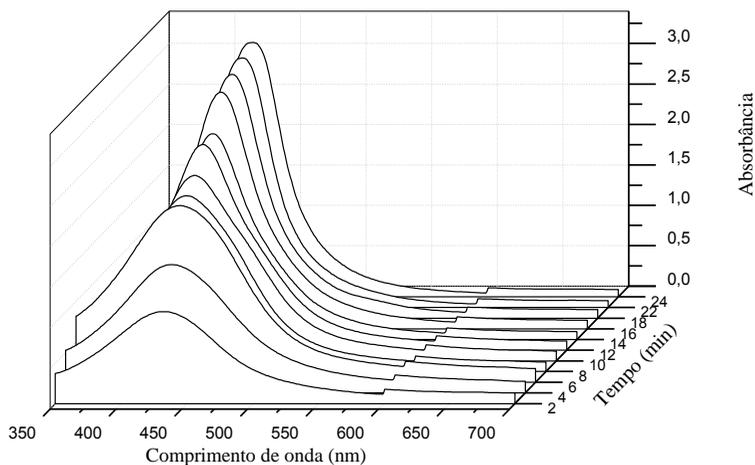
Analisando-se os gráficos de superfície de resposta foi possível obter as melhores condições de síntese das nanopartículas. Assim, de acordo com o planejamento central composto realizado, o experimento 4, indicado pelo nível (+1, +1), em ambos as variáveis de resposta, foi a melhor rota de síntese. Deste modo, o mesmo foi utilizado para a caracterização, nucleação, estabilidade e posterior formação de filmes de poliestireno para avaliação da atividade biocida.

4.2 NUCLEAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O método de monitoramento da nucleação das nanopartículas empregado foi o da análise do espectro de UV-Visível. Analisando o espectro das amostras é possível observar se houve ou não nucleação devido ao deslocamento dos picos de absorção plasmônica. O experimento 4, obtida do planejamento experimental, foi a rota utilizada para avaliar a nucleação das nanopartículas. Durante a nucleação, os picos de absorção plasmônica variaram de 433 a 420 nm. Os valores de FWHM sofreram alteração de de 101,50 a 66,14.

Na Figura 15 é possível observar os espectros de UV-Visível com o decorrer do tempo da síntese de nanopartículas de prata a 130 °C. Observa-se que no início da reação a absorbância é baixa e a banda plasmônica é mais larga. Conforme o tempo aumenta, os valores de absorbância aumentam e a largura à meia altura da banda plasmônica fica mais estreita, obtendo nanopartículas mais monodispersas. Após 24 minutos de reação, o pico máximo de absorbância é atingido.

Figura 15 – Espectros de UV-Visível durante a nucleação das nanopartículas de prata.



Fonte: Autor (2015).

A cinética da nucleação das nanopartículas foi ajustada à uma equação de primeira ordem. A partir dos valores de absorção em 420 nm pelo tempo (

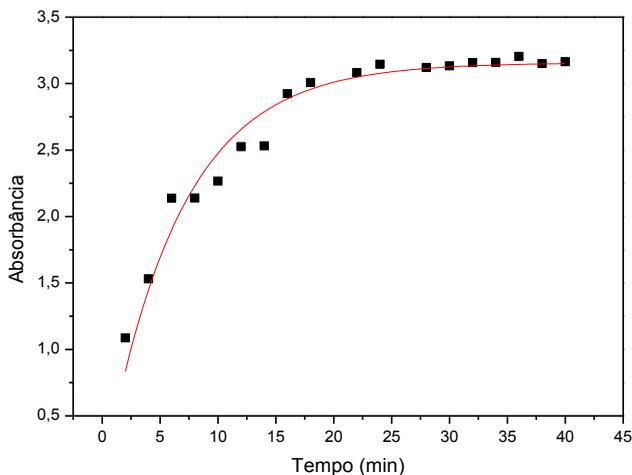
Figura 16), o modelo da reação foi obtido e o tempo de meia vida determinado conforme as Equações 6 e 7. Na Tabela 7 é possível observar os resultados da constante cinética obtida, da absorção no final da reação e do tempo de meia vida.

$$A_t = A_\infty(1 - e^{-k_{obs}t}) \quad \text{Equação 4}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad \text{Equação 5}$$

onde A_t é a absorção no tempo t , A_∞ é a absorção no final da reação, t é o tempo, k_{obs} é a constante cinética observada e da ordem da reação e $t_{1/2}$ é o tempo de meia vida (CAI; CHEN; ZHOU, 2004).

Figura 16 – Nucleação das nanopartículas de prata em 420 nm.



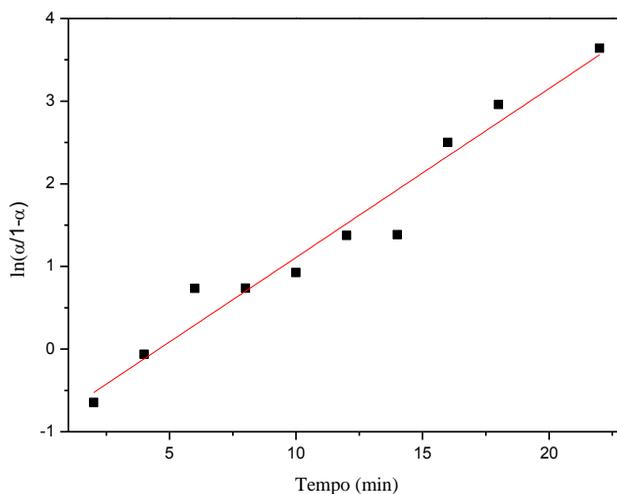
Fonte: Autor (2015).

Tabela 7 – Resultados da taxa de reação constante, da absorção no final da reação e do tempo de meia vida ($R^2=0,9564$).

A_∞	$k_{obs} (\text{min}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{min}^{-1})$
$3,15692 \pm 0,04765$	$0,15328 \pm 0,00969$	$4,5221$

A síntese de nanopartículas via redução química pode estar envolvida com vias autocatalíticas durante a reação (BÖNNEMANN; RICHARDS, 2001). Uma vez que o núcleo de prata é formado, este atua como catalisador, auxiliando na redução de íons Ag^+ a Ag^0 em solução, que por sua vez forma novos núcleos (ZAHEER, 2012). Em reações de autocatálise, um gráfico de $\ln(\alpha/(1-\alpha))$ em função do tempo se comporta de forma linear (HUANG; MILLS; HAJEK, 1993). De acordo com os resultados obtidos, nas condições de síntese realizada, a nucleação das nanopartículas segue uma via de reação autocatalítica até o tempo de 22 minutos, atingindo uma conversão de 96 % da absorção máxima neste tempo (Figura 17).

Figura 17 – Gráfico de $\ln(\alpha/(1-\alpha))$ em função do tempo; α é razão entre absorção no instante t com a absorção no final da reação. $R^2=0,95505$.



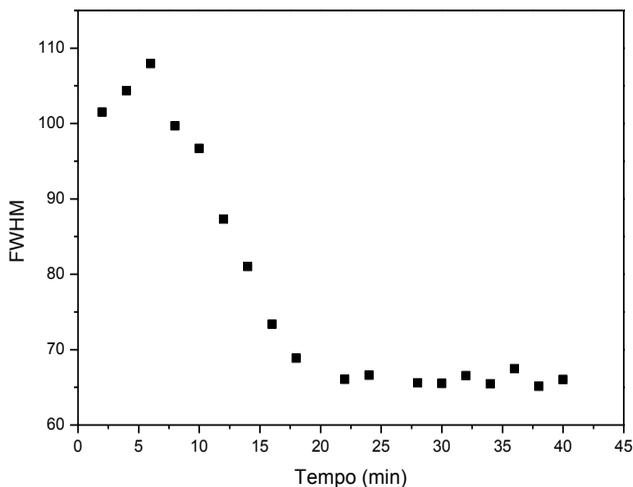
Fonte: Autor (2015).

Outra forma de avaliar a nucleação das nanopartículas é analisando-se os valores de FWHM (Figura 18). Os valores foram obtidos através dos espectros de UV-Vis da Figura 15. Observou-se que no início da síntese os valores de FWHM são elevados e aumentam até o tempo de aproximadamente 6 minutos. Após este período, as nanopartículas começam a ficar mais monodispersas através do

estreitamento de FWHM. Os valores de FWHM ficam estáveis após o término da etapa de nucleação.

A nucleação realizada neste estudo, utilizando oleilamina como agente redutor, ocorreu durante 22 minutos, seguida de uma fase constante. Após este período ocorre o crescimento das nanopartículas. Resultado semelhante foi obtido por Andhariya e colaboradores (2013), que obtiveram tempo de nucleação ótimo de 30 minutos, utilizando oleilamina como agente redutor e difeniléter como solvente da reação. No entanto, quando a temperatura de nucleação é superior a 30 minutos ocorre uma elevada queda do rendimento devido à agregação das nanopartículas de prata (ANDHARIYA; PANDEY; CHUDASAMA, 2013).

Figura 18 – Valores obtidos da largura à meia altura em função do tempo.



Fonte: Autor (2015).

4.3 CARACTERIZAÇÕES

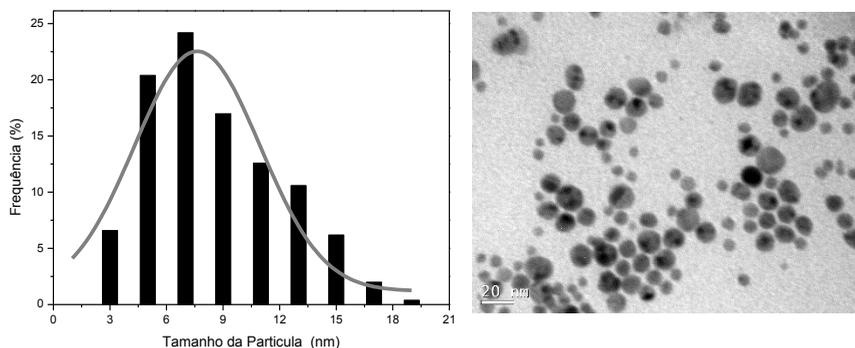
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A melhor condição do planejamento experimental foi submetida à análise de microscopia eletrônica de transmissão. A nova rota de

síntese possibilitou a obtenção de nanopartículas esféricas com tamanho reduzido (~8 nm) (Figura 19). Neste estudo, nanopartículas monodispersas sintetizadas com oleilamina em temperaturas abaixo de 135 °C foram obtidas. Este fator diverge do estudo abordado por Andhariya e colaboradores (2013), onde relatam que para obter nanopartículas de prata monodispersas utilizando oleilamina como agente redutor, é necessário que a temperatura de nucleação esteja entre 160-240 °C. Segundo os autores, em temperaturas mais baixas, a redução de AgNO_3 pela oleilamina é fraca (ANDHARIYA; PANDEY; CHUDASAMA, 2013).

Neste trabalho, a oleilamina mostrou ser um agente redutor apropriado, possibilitando a síntese de nanopartículas de prata com tamanhos entre 1 e 20 nm, sem a necessidade de elevadas temperaturas ou elevados períodos de síntese. A média das nanopartículas sintetizadas foi de 8,5 nm, com desvio padrão de 3,5 nm e Índice de Polidispersão (PDI) de 1,541, indicando uma distribuição estreita e unimodal de tamanhos. A obtenção de nanopartículas com tamanho reduzido contribui na ação contra microrganismos. Quanto menores as nanopartículas, mais facilmente elas irão ser transportadas para o interior da célula, levando à morte celular (LU et al., 2013).

Figura 19 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) da melhor rota obtida do planejamento experimental, correspondente ao experimento 4 (B).

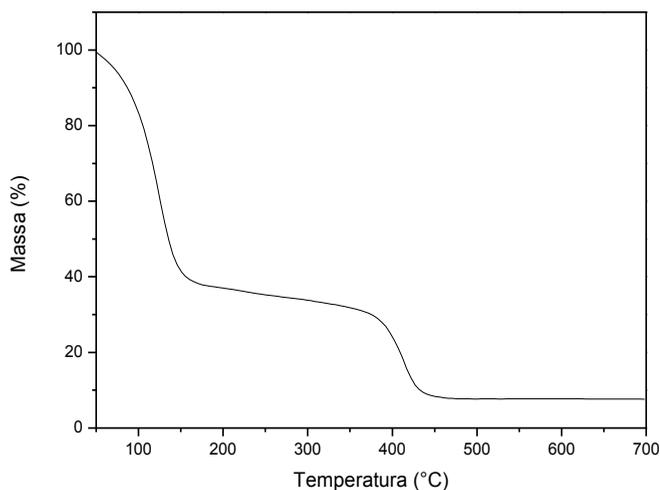


Fonte: Autor (2015).

4.3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A degradação térmica da dispersão de nanopartículas de prata em estireno ocorre em dois estágios. No primeiro estágio ocorre a degradação do monômero entre uma temperatura inicial de 50 °C até 160 °C. Na segunda etapa ocorre uma perda de massa representada pela degradação da oleilamina entre 350 e 450 °C. Não há perda de massa após 450 °C (Figura 20). Devido ao fato do estireno ser bastante volátil e a análise ser iniciada a 50 °C, não foi possível determinar a quantidade degradada em cada estágio, nem a massa residual de prata no final da amostra.

Figura 20 – Perfil de degradação da solução coloidal das nanopartículas de prata.



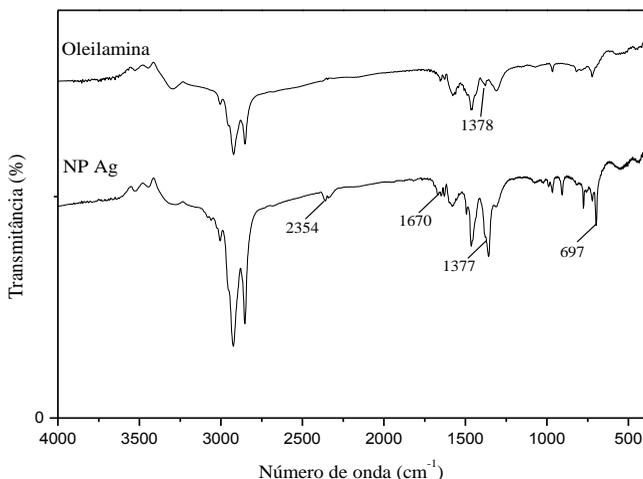
Fonte: Autor (2015).

4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier foi realizada para verificar as ligações e grupos funcionais após a síntese das nanopartículas. Pode-se observar que os espectros da oleilamina e das nanopartículas sintetizadas apresentaram similaridade (Figura 21).

As atribuições dos picos de absorção dos espectros de FTIR estão apresentadas na Tabela 8.

Figura 21 – Espectro de FTIR da oleilamina e das nanopartículas de prata.



Fonte: Autor (2015).

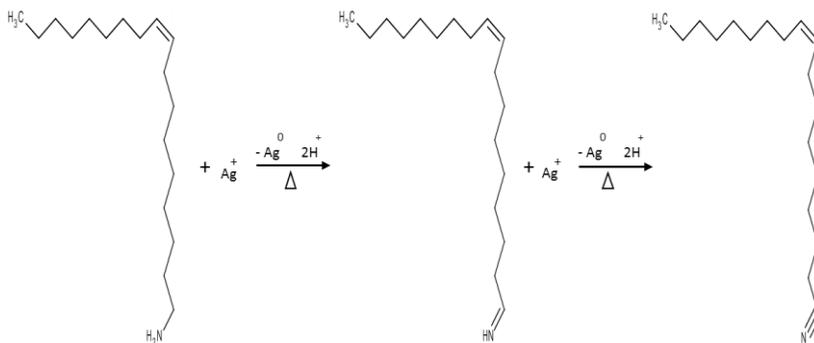
Tabela 8 – Atribuição dos espectros de FTIR da oleilamina e da síntese das nanopartículas de prata apresentados na Figura 21.

Modos de vibração	Região de absorção (cm ⁻¹)	
	Oleilamina	NP Ag
v _s (NH ₂)	3296	3290
v(=C-H)	3004	3010
v _{as} (C-H) e v _s (C-H)	2921, 2852	2925, 2852
v(C≡N)	-	2356
v(C=N)	-	1670
v(C=C)	1652	1648
δ(NH)	1627	1629
δ(NH ₂)	1578	1585, 775
δ(CH ₃)	1462	1464
v(C-N)	1378	1377
v(C-C)	722	722
δ(C-C-C≡N)	-	697

v_s = vibração de alongamento simétrico; v_{as} = vibração de alongamento assimétrico; δ = vibração de deformação.

Comparando os espectros de oleilamina e das nanopartículas de prata percebe-se o surgimento do pico de absorção em 1670 cm^{-1} , confirmando a redução da amina (C-NH_2) em iminas (C=NH). Além disso, pode-se observar que ocorre um aumento considerável do pico de absorção em 1350 cm^{-1} , faixa da ligação C-N. Como a oleilamina atua como agente estabilizante e agente redutor, conclui-se que é possível que o aumento do pico de absorção é devido a estabilização da oleilamina na superfície das nanopartículas de prata (CHEN et al., 2007). É importante ressaltar também o surgimento da banda de absorção em 2354 cm^{-1} . Sugere-se que, além da redução da amida em imina, também ocorre a redução em nitrilas ($\text{C}\equiv\text{N}$). O surgimento de um pico de absorção em 697 cm^{-1} também corrobora com este fato, indicando uma vibração de deformação C-C-C \equiv N. Embora o aparecimento da ligação C \equiv N e da deformação C-C-C \equiv N ocorra normalmente entre a região $2260\text{-}2240\text{ cm}^{-1}$ e $580\text{-}530\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, a presença destes grupos na superfície das nanopartículas de prata pode alterar a frequência de absorção (CHEN et al., 2007; MOJAHED et al., 2012). Conforme os espectros de FTIR, a redução da oleilamina ocorre através da redução do radical amino para iminas, e de iminas para nitrila (Figura 22).

Figura 22 – Mecanismo de redução da oleilamina na síntese das nanopartículas de prata.



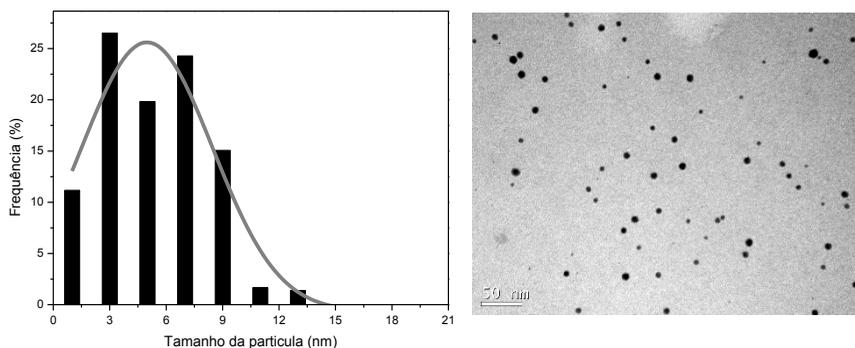
Fonte: Adaptado de Chen et al. (2007).

4.4 ESTABILIDADE

Ainda que a utilização somente da oleilamina como agente redutor e estabilizante resultou em nanopartículas com tamanho

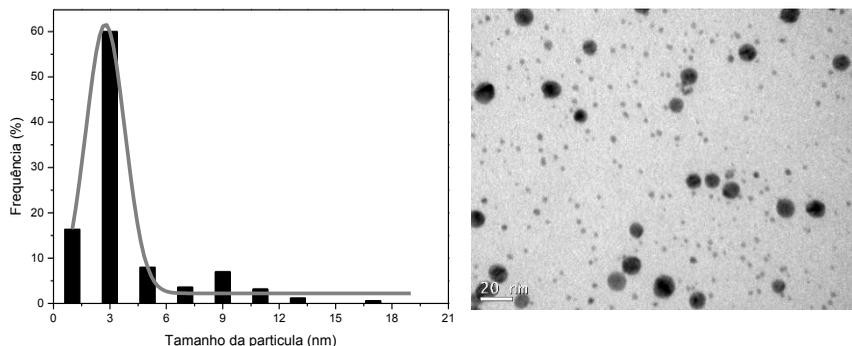
reduzido com uma distribuição unimodal, dois outros estabilizantes foram avaliados para se otimizar o tamanho de partícula. O ácido oleico, por possuir propriedades químicas similares à oleilamina foi utilizado como co-estabilizante durante o processo de síntese (CINAR et al., 2011). Azócar et al. (2014) estudaram a estabilidade de três diferentes ácidos graxos (oleico, linoleico e palmítico). Os autores observaram que a utilização de ácido oleico apresentou melhores resultados na estabilidade e no efeito citotóxico das nanopartículas (AZÓCAR et al., 2014). Na Figura 23 e Figura 24 é possível avaliar a distribuição de tamanho das nanopartículas de prata utilizando ácido oleico como agente estabilizante nas concentrações 0,01 mol/L e 0,005 mol/L, respectivamente.

Figura 23 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) utilizando ácido oleico na concentração de 0,01 mol/L.



Fonte: Autor (2015).

Figura 24 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) utilizando ácido oleico na concentração de 0,005 mol/L.



Fonte: Autor (2015).

A adição de ácido oleico como agente estabilizante resultou em nanopartículas com D_p médio de 5,3 e 3,8 nm nas concentrações de 0,01 e 0,005 mol/L, respectivamente. Estes valores foram menores quando comparadas ao processo de síntese utilizando-se somente oleilamina ($D_p=8,5$ nm) (Figura 19). Embora tenha-se obtido partículas menores, os valores de PDI foram mais elevados nas concentrações de 0,005 mol/L (2,697) e 0,01 mol/L (1,594) (Tabela 9).

Tabela 9 – Efeito da concentração e tipo de estabilizante nas propriedades das nanopartículas de prata.

Estabilizante	Concentração do estabilizante(mol/L)	D_p (nm)	PDI
AgNP (somente oleilamina)	-	$8,5\pm 3,5$	1,451
Ácido oleico	0,01	$5,3\pm 2,7$	1,594
Ácido oleico	0,005	$3,8\pm 2,7$	2,697
PEG 400	0,01	$5,9\pm 1,7$	1,317
PEG 400	0,005	$4,5\pm 1,1$	1,175

A adição de polímeros durante a síntese das nanopartículas pode interferir no tamanho e na forma das nanopartículas (KIM; YEUM; CHOI, 2014). Suchomel e colaboradores (2015) estudaram a estabilização de nanopartículas de prata e brometo de prata (AgBr) por quatro estabilizantes poliméricos (PEG 10000, PVA 85000-146000, PVP 360 e HEC 90000)., Para ambos os tipos de nanopartículas, os autores observaram partículas menores utilizando PEG e HEC, devido a fraca interação destes polímeros com íons de prata, resultando na formação de mais núcleos (SUCHOMEL et al., 2015).

Na literatura, alguns autores relataram que o PEG também pode ser utilizado como agente redutor (LUO et al., 2005; ROLDÁN; PELLEGRINI; SANCTIS, 2013). Popa e colaboradores (2007) estudaram a síntese de nanopartículas de prata usando PEG como agente redutor em diferentes temperaturas, obtendo formatos e tamanhos distintos. Os autores observaram que nanopartículas com tamanhos maiores e diferentes formatos (poliédricas, triangulares e esféricas) são formadas em elevadas temperaturas (90-120 °C). Quando a síntese foi realizada a temperatura ambiente (30 °C), nanopartículas esféricas com tamanhos menores (~10 nm) foram obtidas, observando que com o aumento da temperatura ocorre o aumento no tamanho das nanopartículas de prata e também que as mesmas são obtidas com diferentes formatos (POPA et al., 2007).

Como alternativa, foi empregado PEG 400 (em concentrações 0,01 mol/L e 0,005 mol/L) como agente estabilizante, sendo que nas

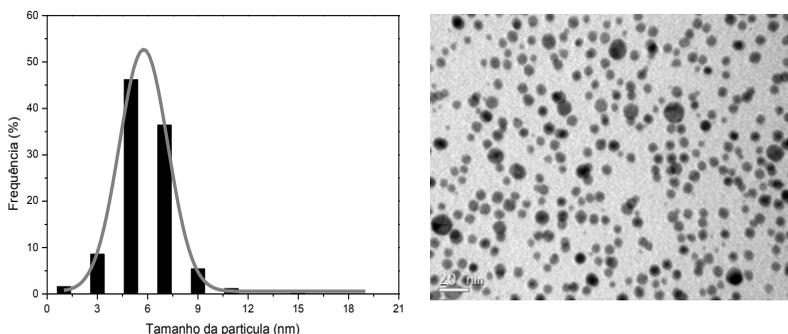
Figura 25 e

Figura 26 é possível observar a distribuição das nanopartículas obtidas. Segundo Luo e colegas (2005), a presença do polímero em solução impede a formação de agregados. Os autores mostraram que o aumento da massa molar do PEG aumenta a capacidade de redução de Ag^+ , facilitando a formação de Ag^0 . Os autores relataram que em massas molares baixas, não ocorreu a formação das nanopartículas de prata (LUO et al., 2005). Logo, devido à baixa massa molar utilizada neste estudo (400 g/mol), PEG atuou somente como agente estabilizante. Este efeito foi confirmado quando a síntese foi realizada sem a presença de oleilamina, não ocorrendo a formação das nanopartículas de prata.

Ghosh e colaboradores (2011) estudaram a utilização de PEG 6000 e ácido oleico como estabilizantes de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 para aplicações biomédicas. Os autores observaram que as adições de ambos estabilizantes reduziram a aglomeração das partículas de Fe_3O_4 . Além disso, a adição dos estabilizantes resultou em

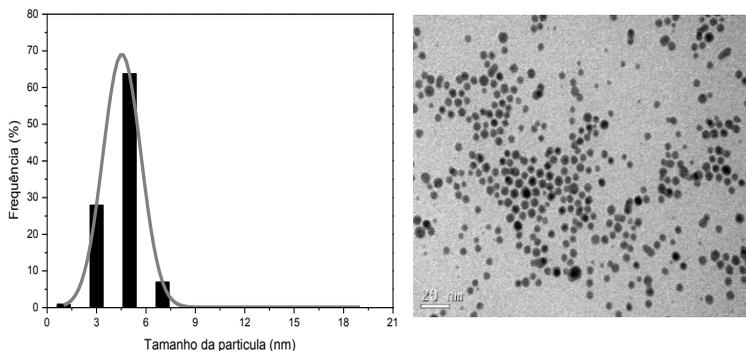
nanopartículas menores, provocada pelo aumento da tensão na superfície das nanopartículas (GHOSH et al., 2011).

Figura 25 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) utilizando PEG 400 na concentração de 0,01 mol/L. Fonte: Autor (2015).



Fonte: Autor (2015).

Figura 26 – Distribuição de nanopartículas de prata (esquerda) e imagem obtida por TEM (100 kV) (direita) utilizando PEG 400 na concentração de 0,005 mol/L.

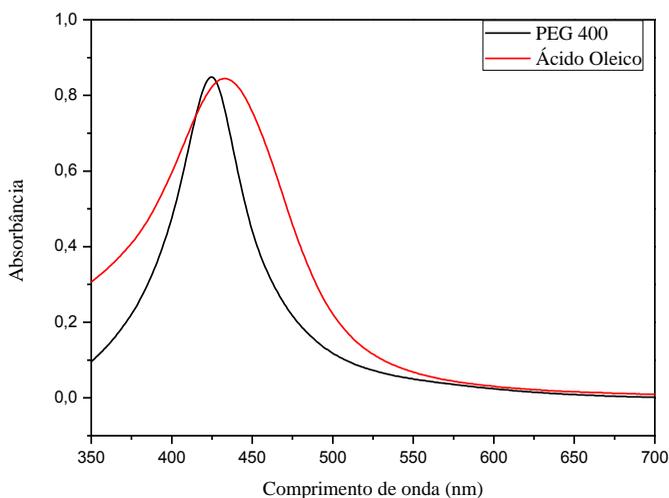


Fonte: Autor (2015).

Os resultados mostram que a utilização de PEG 400 resultou em partículas menores e monodispersas (5,9 e 4,5 nm nas concentrações de 0,01 e 0,005 mol/L, respectivamente) com uma distribuição mais estreita

em ambas concentrações, quando comparadas com a síntese utilizando somente com oleilamina, podendo ser empregado como co-estabilizador durante o processo de síntese (Tabela 9). Em relação à adição do ácido oleico, nanopartículas menores foram obtidas, contudo, apresentaram um PDI mais elevado que na síntese sem adição de co-estabilizante. Portanto, observa-se, para ambos os estabilizantes, que a concentração de 0,005 mol/L é mais adequada. Comparando os co-estabilizadores, o PEG 400 resultou em uma distribuição mais estreita em relação ao ácido oleico. Os espectros de UV-Vis corroboram com os resultados obtidos pela análise de TEM, mostrando uma superfície plasmônica mais estreita utilizando o PEG 400 como co-estabilizador (Figura 27). Assim, diante dos resultados obtidos, PEG 400 na concentração de 0,005 mol/L apresentou-se a condição mais adequada.

Figura 27 – Espectros de UV-Visível utilizando PEG 400 e ácido oleico na concentração de 0,005 mol/L.



Fonte: Autor (2015).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOCIDA

Visto que a síntese das nanopartículas foi realizada diretamente no monômero, e o mesmo é tóxico e resultaria em resultados falso-positivo na avaliação da atividade biocida, as amostras foram diluídas e

polimerizadas para posterior obtenção dos filmes poliméricos. O tolueno, utilizado como solvente após a polimerização se mostrou adequado no preparo dos filmes, resultando em soluções homogêneas.

Diferentes métodos de obtenção de nanocompósitos de poliestireno com nanopartículas de prata são descritos na literatura (AN et al., 2009; KAI et al., 2005; KUMBHAR; CHUMANOV, 2009; VODNIK et al., 2012; YOUSSEF; ABDEL-AZIZ, 2013; ZHANG et al., 2013). Alguns destes métodos requerem a utilização de elevadas temperaturas, longos tempos de reação ou elevadas pressões (ZHANG et al., 2013). Vodnik e colaboradores (2012) realizaram a síntese de nanopartículas de prata utilizando boroidreto de sódio como agente redutor, em meio hidrofílico, sendo necessária uma transferência de fase para um solvente hidrofóbico. Os autores avaliaram as propriedades ópticas e térmicas dos filmes à partir de uma mistura direta de uma solução de poliestireno com clorofórmio a diferentes concentrações de nanopartículas de prata (VODNIK et al., 2012). Kumbhar e Chumanov (2009) sintetizaram e encapsularam nanopartículas de prata em uma matriz de poliestireno através da redução com hidrogênio de uma solução de óxido de prata a elevadas temperaturas (KUMBHAR; CHUMANOV, 2009). Kai e colaboradores (2005) obtiveram nanocompósitos de poliestireno com nanopartículas de prata por duas etapas por polimerização em dispersão por 24 horas, utilizando estireno, ácido itacônico e acrilonitrilo em meio com etanol e água. Este é o primeiro estudo onde a síntese por redução química das nanopartículas da prata no monômero estireno é realizada, mostrando uma forma diferente e mais rápida de obter nanocompósitos de poliestireno com nanopartículas de prata.

A determinação de prata nos filmes poliméricos foi obtida por FAAS. O limite de detecção e quantificação para prata foram de 0,02 mg/Kg e 0,07 mg/Kg, respectivamente. As nanopartículas de prata incorporadas no poliestireno apresentaram efeito antimicrobiano sobre as bactérias avaliadas, sendo a concentração mínima inibitória de 7,33 mg/Kg para *S. aureus* e de 12,83 mg/Kg para *E. coli* e *S. typhimurium* nas condições utilizadas. Vale ressaltar que essa quantidade de prata está dentro dos padrões exigidos pela ANVISA. A Resolução nº 17 da ANVISA, de 17 de março de 2008 estabelece os aditivos para materiais plásticos destinados a elaboração de embalagens e/ou equipamentos que entram em contato com alimentos. No caso da prata, utilizada como aditivo antimicrobiano, a quantidade máxima é de 3 % m/m do material plástico. Ademais, deve possuir um limite de migração específica de 0,05 mg/kg de plástico.

Em relação à parede celular das bactérias, a CMI foi maior nas bactérias gram-negativas (*E. coli* e *S. typhimurium*) do que bactérias gram-positivas (*S. aureus*). Na literatura, estudos sugerem que o efeito das nanopartículas de prata é mais intenso em bactérias gram-negativas (CHEN et al., 2011; FAYAZ et al., 2010; TAGLIETTI et al., 2012; TAMBOLI; LEE, 2013). A diferença de sensibilidade das bactérias gram-positivas e gram-negativas é atribuída à estrutura da parede celular destes microrganismos. A parede celular de bactérias gram-negativas é composta de uma camada fina de peptídeoglicano (entre 2 e 3 nm), localizada entre a membrana citoplasmática e da membrana externa, e de uma camada de lipopolissacarídeo. As bactérias gram-positivas não possuem membrana externa. No entanto, a parede celular é composta de uma camada de peptídeoglicano mais espessa (~30 nm), ligado a peptídeos curtos, formando uma estrutura rígida, dificultando a impregnação das nanopartículas de prata para dentro da célula (CHEN et al., 2011; TAMBOLI; LEE, 2013).

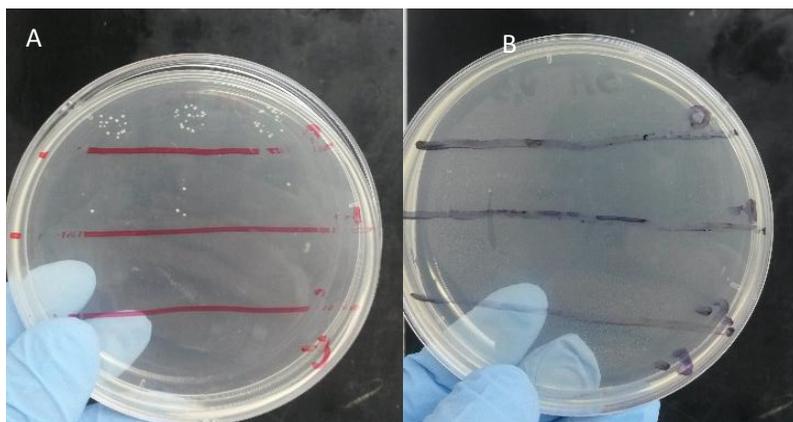
O tamanho das nanopartículas também está relacionado com a atividade antimicrobiana. Quanto menor o tamanho das partículas, melhor o efeito antimicrobiano (GUZMAN; DILLE; GODET, 2012; MARTINEZ-CASTANON et al., 2008). Martinez-Castanon e colaboradores (2008) determinaram a concentração mínima inibitória para *E. coli* e *S. aureus* empregando nanopartículas de prata com diferentes tamanhos (7, 29 e 89 nm). Os valores de CMI obtidos para *E. coli* e *S. aureus* foram estatisticamente iguais com nanopartículas de 7 nm, indicando que a parede celular de bactérias gram-positivas não possui interferência quando se empregam nanopartículas com tamanhos entre 1-10 nm. Em relação às nanopartículas com 29 e 89 nm, os valores de CMI foram menores para *E. coli*. Ressalta-se que os autores utilizaram as mesmas cepas bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* que no presente estudo (MARTINEZ-CASTANON et al., 2008). Neste estudo, nanopartículas de prata com tamanho reduzido foram produzidas, apresentando uma maior área superficial, obtendo um percentual de interação mais elevado com a bactéria.

Os inicializadores utilizados na reação de polimerização podem interferir na avaliação da atividade biocida. Uma possível explicação para a maior sensibilidade em *S. aureus* é a presença de BPO nos filmes poliméricos. BPO, além de inicializador, tem sido relatado como agente antimicrobiano no tratamento de acnes (THAKUR et al., 2012). É provável que *S. aureus* apresente maior sensibilidade que *E. coli* e *S. typhimurium*, na presença de BPO. O crescimento mais reduzido de colônias de *S. aureus* em filmes de poliestireno puro corrobora essa

hipótese (Figura 28). Contudo, novos estudos variando a concentração e utilização de diferentes inicializadores devem ser realizados para confirmar esses resultados. Deste modo, BPO pode contribuir no aumento da atividade biocida das nanopartículas de prata, aumentando a permeabilidade da célula, principalmente em bactérias gram-positivas.

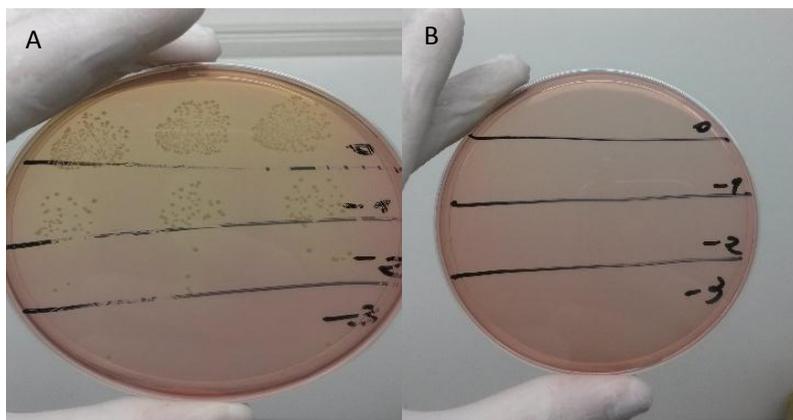
Nas Figuras 28, 29 e 30 é possível observar a evolução do crescimento das culturas de *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium* após 4 horas de contato com filme de poliestireno puro e com nanopartículas de prata. Embora acredite-se que o BPO também tenha atuado como agente antimicrobiano na avaliação da atividade biocida das nanopartículas de prata, a adição das mesmas resultou em uma ação biocida superior, apresentando inibição total para todas as bactérias avaliadas (Figuras 28, 29 e 30).

Figura 28 – Culturas de *S. aureus* após 4 horas de exposição em filmes de poliestireno puro (A) e com nanopartículas de prata (B) (7,33 mg/Kg).



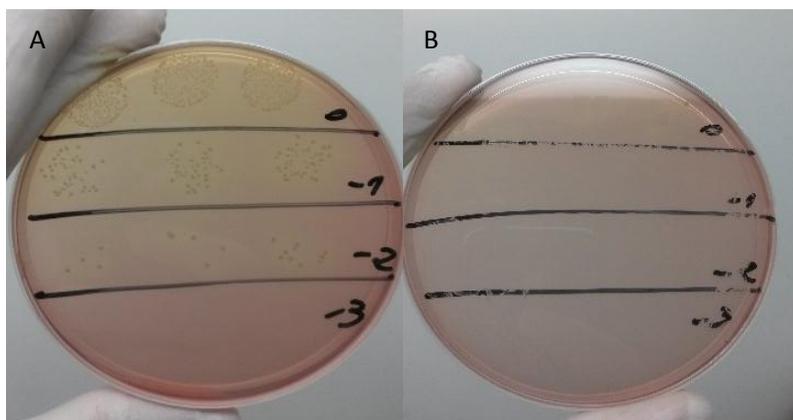
Fonte: Autor (2015).

Figura 29 – Culturas de *E. coli* após 4 horas de exposição em filmes de poliestireno puro (A) e com nanopartículas de prata (B) (12,83 mg/Kg).



Fonte: Autor (2015).

Figura 30 – Culturas de *S. typhimurium* após 4 horas de exposição em filmes de poliestireno puro (A) e com nanopartículas de prata (B) (12,83 mg/Kg).



Fonte: Autor (2015).

Como o número de doenças relacionadas à contaminação de alimentos por microrganismos patogênicos tem aumentado nos últimos anos, a produção de embalagens que visam melhorar a segurança alimentar é de extrema importância para a saúde (DE MOURA;

MATTOSO; ZUCOLOTTO, 2012). A obtenção de poliestireno com nanopartículas de prata é uma alternativa na redução de contaminação biológica, principalmente na utilização deste material como embalagem de alimentos. A presença das nanopartículas de prata na matriz polimérica evita o crescimento bacteriano e a formação de biofilmes indesejáveis (GURUNATHAN et al., 2014).

Até o momento poucos estudos foram realizados para se determinar a capacidade das nanopartículas migrarem das embalagens dos polímeros rígidos e promoverem a contaminação do produto embalado (DUNCAN, 2011). Echegoyen e Nerín (2013) estudaram a migração de nanopartículas de prata em três diferentes embalagens alimentícias. Os autores observaram que a migração de prata, em todos os recipientes, foi abaixo dos limites exigidos pela legislação europeia, contendo maiores níveis de migração em alimentos ácidos (ECHEGOYEN; NERÍN, 2013). Cushen e colaboradores (2014) desenvolveram um modelo indicador do nível de migração de nanopartículas de prata em nanocompósitos de polietileno, podendo ser um benefício para a indústria de alimentos.

Além disso, para a utilização deste material na indústria de alimentos, o material não pode apresentar ação tóxica contra células humanas. Os nanocompósitos obtidos nesse estudo apresentaram resultados promissores, sendo obtida atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. aureus*. Contudo, estudos observando a migração da prata na matriz polimérica e a avaliação da citotoxicidade devem ser realizados, a fim de garantir um produto seguro que possua atividade antimicrobiana, podendo ser utilizado na indústria de embalagens de alimentos (DUNCAN, 2011).

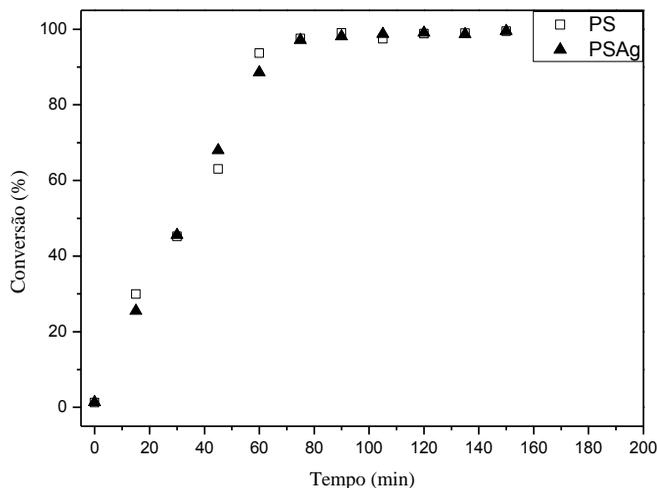
Na avaliação da atividade biocida, os nanocompósitos apresentaram efeito antimicrobiano sobre as bactérias avaliadas, sendo a CMI de 7,33 mg/Kg para *S. aureus* e de 12,83 mg/Kg para *E. coli* e *S. typhimurium*, valores estes dentro dos padrões exigidos pela ANVISA. Portanto, o filme de poliestireno com 12,83 mg/Kg de prata, por apresentar quantidade de prata inibitória para todas as bactérias avaliadas, foi utilizado para posterior estudos da cinética de polimerização e caracterização por TGA e FTIR do nanocompósito.

4.6 CINÉTICA DE POLIMERIZAÇÃO

A conversão da polimerização em massa do estireno foi determinada por análise gravimétrica em intervalos de 15 minutos. A polimerização do estireno com nanopartículas de prata apresentou uma

cinética rápida, devido à quantidade de inicializador utilizada. Após 75 minutos de reação, o máximo de conversão foi atingido. Observa-se que, nas condições utilizadas, a quantidade de prata não retarda a reação de polimerização (Figura 31).

Figura 31 – Cinética de polimerização do poliestireno e do poliestireno.



Fonte: Autor (2015).

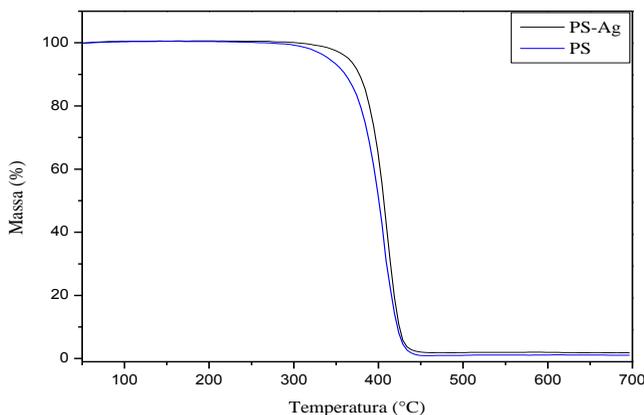
Quando utilizado pequenas quantidades de BPO, a polimerização com prata não ocorreu, pois a prata possui propriedades antioxidantes, neutralizando os radicais livres (MITTAL; KALER; BANERJEE, 2012). Desta maneira, quando aumenta-se a concentração de BPO, a taxa de polimerização também aumenta, devido à maior quantidade de radicais do inicializador no meio reacional, acelerando a reação. Por outro lado, elevadas concentrações de BPO levam à produção de poliestireno com baixa massa molar, o que compromete suas propriedades mecânicas. Entretanto, no presente estudo o objetivo foi apenas avaliar a possibilidade de incorporar as nanopartículas de prata *in situ* durante a reação de polimerização sem que haja uma preocupação com os efeitos na massa molar do polímero final nem na avaliação de suas propriedades mecânicas. Tais efeitos são sugestões de estudos a serem realizados em pesquisas futuras.

4.7 CARACTERIZAÇÕES

4.7.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A degradação térmica dos filmes de poliestireno ocorre em um estágio entre 300 e 450 °C. Nesta faixa, a perda do polímero puro e com prata foi de 98,05% e 96,4%, respectivamente. Após a temperatura de 450 °C, não há nenhuma perda de massa observada. A presença de prata na amostra observada foi de 1,65%, calculado pela diferença da massa residual que permanece na amostra do poliestireno puro e com prata. Pode-se observar que a presença de prata na matriz polimérica produziu um aumento na estabilidade térmica do material (Figura 32). Entretanto são necessários mais estudos para se avaliar quais são os mecanismos envolvidos e que levaram ao acréscimo da estabilidade térmica.

Figura 32 – Perfil de degradação dos filmes de poliestireno.



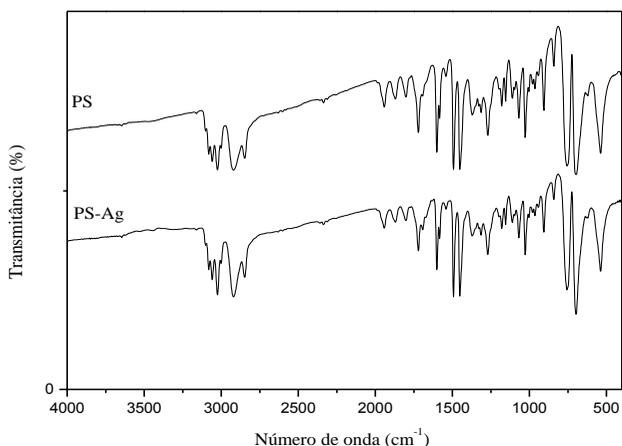
Fonte: Autor (2015).

4.7.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier foi realizada para se verificar as ligações e grupamentos funcionais dos filmes de poliestireno sem e com nanopartículas de prata. Os resultados dos espectros apresentaram elevada similaridade (Figura 33). As atribuições dos picos de absorção dos espectros de FTIR estão apresentadas na Tabela 10. Não foi possível observar picos relativos à

adição das nanopartículas de prata. Provavelmente, a ausência dos mesmos está relacionada com o limite de detecção, já que a quantidade de prata presente no filme é pequena.

Figura 33 – Espectro de FTIR dos filmes de poliestireno.



Fonte: Autor (2015).

Tabela 10 – Atribuição dos espectros de FTIR poliestireno (PS) e de poliestireno com nanopartículas de prata (PS-Ag), apresentados na Figura 34.

Modos de vibração	Região de absorção (cm ⁻¹)	
	PS	PS-Ag
v(C-H)	3102, 3081, 3059, 3024	3101, 3081, 3024, 2999
v _{as} (C-H) e v _s (C-H)	2921, 2847	2921, 2848
Anel aromático monossubstituído	1941, 1870, 1800	1941, 1869, 1801
v(C=C)	1600, 1451	1599, 1452
v(C-C)	1581	1581
δ(CH ₃)	1491, 1372	1491, 1370
δ _{ip} (C-H)	1269, 1066, 1026	1270, 1069, 1025
δ _{op} (C-H)	905, 755, 697	906, 754, 697

v_s = vibração de alongamento simétrico; v_{as} = vibração de alongamento assimétrico; δ = vibração de deformação; δ_{ip} = vibração de deformação angular no plano C-H; δ_{op} = vibração de deformação angular fora do plano C-H.

5 CONCLUSÕES

Uma nova rota de síntese de nanopartículas de prata foi elaborada e otimizada, indicando os melhores valores de temperatura de síntese e concentração do agente redutor. Todas as rotas de síntese obtidas no planejamento experimental mostraram a formação de nanopartículas de prata. A utilização da oleilamina como agente redutor mostrou-se eficiente, possibilitando a obtenção de nanopartículas com tamanho médio de 8 nm. A análise de FTIR sugere que o mecanismo da redução da oleilamina ocorre pela redução do radical amina para iminas, e de iminas para nitrilas. A nucleação é evidenciada após 22 minutos, seguindo um modelo cinético de primeira ordem. Além disso, os dados cinéticos indicam que a reação segue uma via autocatalítica. Foi possível a obtenção de tamanho de partículas PDI reduzidos com o emprego de PEG 400 como co-estabilizante.

A presença das nanopartículas de prata no filme de poliestireno leva a um pequeno incremento da estabilidade térmica do material. A concentração mínima inibitória foi de prata foi de 7,33 mg/Kg para *S. aureus* e de 12,83 mg/Kg para *E. coli* e *S. typhimurium*, valores estes permitidos pela ANVISA conforme estabelecido pela Resolução nº 17, de 17 de março de 2008. Deste modo, os nanocompósitos de poliestireno/nanopartículas de prata apresentaram atividade antimicrobiana, possuindo uma potencial aplicação na indústria de embalagens.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, visando o complemento do estudo realizado, temos:

1. Realizar análises de microscopia eletrônica de transmissão para verificação da homogeneidade da dispersão das partículas de prata no filme de poliestireno;
2. Avaliar a concentração e utilização de diferentes inicializadores da reação de polimerização com o objetivo de observar se os mesmos interferem na atividade biocida;
3. Avaliar a citotoxicidade dos filmes poliméricos em células humanas. Além disso, realizar análises de migração das nanopartículas de prata no filme polimérico, conforme estabelecido pela Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999 da ANVISA;
4. Determinar a massa molar e avaliar as propriedades mecânicas dos filmes de poliestireno, para posterior aplicação como embalagem de alimentos;
5. Obter nanocompósitos via polimerização em suspensão e síntese de Poliestireno Expansível;
6. Avaliar a rota de síntese proposta na obtenção de Poliestireno de Alto Impacto com propriedades antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

- ABOU EL-NOUR, K. M. M. et al. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 3, n. 3, p. 135–140, 2010.
- AN, J. et al. Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. *LWT - Food Science and Technology*, v. 41, n. 6, p. 1100–1107, 2008.
- AN, J. et al. Antimicrobial active silver nanoparticles and silver/polystyrene core-shell nanoparticles prepared in room-temperature ionic liquid. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, n. 6, p. 1984–1989, 2009.
- ANDHARIYA, N.; PANDEY, O.; CHUDASAMA, B. A growth kinetic study of ultrafine monodispersed silver nanoparticles. *RSC Advances*, v. 3, n. 4, p. 1127–1136, 2013.
- ANTUNES, F. S. Síntese, caracterização e avaliação do potencial antimicrobiano de nanopartículas de prata em tintas e vernizes acrílicos à base d'água. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- AZEREDO, H. M. C. DE. Fundamentos de estabilidade de alimentos. 2. ed. EMBRAPA, 2012.
- AZÓCAR, M. I. et al. A systematic study of antibacterial silver nanoparticles: efficiency, enhanced permeability, and cytotoxic effects. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 16, p. 1–9, 2014.
- BALANTA, A.; GODARD, C.; CLAVER, C. Pd nanoparticles for C–C coupling reactions. *Chemical Society Reviews*, v. 40, n. 10, p. 4973–4985, 2011.
- BARROS, N. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 1. ed. Campinas: Coleção Livros-Textos, UNICAMP, 2001.

BHATTACHARYYA, D. et al. Nanotechnology , Big things from a Tiny World : a Review. International Journal of u- and e- Service, Science and Technology, v. 2, n. 3, p. 29–38, 2009.

BILLMEYER, F. W. Textbook of Polymer Science. 3 rd. ed. New York: John Wiley & Sons, 1984.

BISWAL, J. et al. Synthesis of silver nanoparticles in methacrylic acid solution by gamma radiolysis and their application for estimation of dopamine at low concentrations. Radiation Physics and Chemistry, v. 83, p. 67–73, 2013.

BÖNNEMANN, H.; RICHARDS, R. M. Nanoscopic Metal Particles - Synthetic Methods and Potential Applications. European Journal of Inorganic Chemistry, p. 2455–2480, 2001.

CAI, M.; CHEN, J.; ZHOU, J. Reduction and morphology of silver nanoparticles via liquid–liquid method. Applied Surface Science, v. 226, n. 4, p. 422–426, mar. 2004.

CANEVAROLO JR., S. V. Ciência dos polímeros. 2 ed ed. São Paulo: Artliber, 2006.

CHEN, C. C. Continuous production of solid polystyrene in back-mixed and linear-flow reactors. Polymer Engineering and Science, v. 40, n. 2, p. 441–464, 2000.

CHEN, M. et al. Silver nanoparticles capped by oleylamine: Formation, growth, and self-organization. Langmuir, v. 23, n. 10, p. 5296–5304, 2007.

CHEN, M. et al. Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. International journal of nanomedicine, v. 6, p. 2873–2877, 2011.

CHEN, Y. H.; YEH, C. S. Laser ablation method: Use of surfactants to form the dispersed Ag nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 197, n. 1-3, p. 133–139, 2002.

CINAR, S. et al. Synthesis of silver nanoparticles by oleylamine-oleic acid reduction and its use in making nanocable by coaxial electrospinning.

Journal of nanoscience and nanotechnology, v. 11, n. 4, p. 3669–3679, 2011.

COIAI, S. et al. Modification of cross-linked rubber particles by free radical polymerization. Macromolecular Symposia, v. 234, p. 193–202, 2006.

CUSHEN, M. et al. Evaluation and simulation of silver and copper nanoparticle migration from polyethylene nanocomposites to food and an associated exposure assessment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 62, n. 6, p. 1403–1411, 2014.

DE MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C.; ZUCOLOTTI, V. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. Journal of Food Engineering, v. 109, n. 3, p. 520–524, 2012.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. Journal of Colloid and Interface Science, v. 363, n. 1, p. 1–24, 2011.

ECHEGOYEN, Y.; NERÍN, C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. Food and Chemical Toxicology, v. 62, p. 16–22, 2013.

ESTEVEZ, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: Estratégias de síntese de materiais híbridos. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 798–806, 2004.

FAYAZ, A. M. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 6, n. 1, p. 103–109, 2010.

FENG, Q. L. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Materials Research, v. 52, n. 4, p. 663–668, 2000.

FIORENTINO, F. A. M. et al. Análise microbiológica de embalagens para o acondicionamento de medicamentos e cosméticos. Latin American Journal of Pharmacy, v. 27, n. 5, p. 757–761, 2008.

FREESTONE, I. et al. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bulletin*, v. 40, n. 4, p. 270–277, 2007.

FRY, B. *Working With Polystyrene*. Michigan: Society of Manufacturing Engineers, 1999.

GALDIERO, S. et al. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules*, v. 16, n. 10, p. 8894–8918, 2011.

GHOSH, R. et al. Induction heating studies of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles capped with oleic acid and polyethylene glycol for hyperthermia. *Journal of Materials Chemistry*, v. 21, n. 35, p. 13388–13398, 2011.

GUGGENBICHLER, J. P. et al. A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. *Infection*, v. 27, p. 16–23, 1999.

GURUNATHAN, S. et al. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale research letters*, v. 9, n. 373, p. 1–17, 2014.

GUZMAN, M.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 8, n. 1, p. 37–45, 2012.

HAIDER, A.; KANG, I.-K. Preparation of Silver Nanoparticles and Their Industrial and Biomedical Applications: A Comprehensive Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, v. 2015, p. 1–16, 2015.

HAMMOND, J. et al. Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries. *Biosensors*, v. 4, n. 2, p. 172–188, 2014.

HU, H. et al. Preparation and properties of graphene nanosheets-polystyrene nanocomposites via in situ emulsion polymerization. *Chemical Physics Letters*, v. 484, n. 4-6, p. 247–253, 2010.

HU, Y. et al. Preparation of monodisperse polystyrene/silver composite microspheres and their catalytic properties. *Colloid and Polymer Science*, v. 290, n. 5, p. 401–409, 2012.

HUANG, Z. Y.; MILLS, G.; HAJEK, B. Spontaneous formation of silver particles in basic 2-propanol. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 97, n. 44, p. 11542–11550, 1993.

HWANG, E. T. et al. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small*, v. 4, n. 6, p. 746–750, 2008.

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

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais Híbridos Orgânicos-Inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. *Quimica Nova Nova*, v. 28, n. 2, p. 281–288, 2005.

KAEWATIP, K.; TANRATTANAKUL, V. Preparation of cassava starch grafted with polystyrene by suspension polymerization. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, n. 4, p. 647–655, 2008.

KAI, Z. et al. Preparation of Ag/PS composite particles by dispersion polymerization under ultrasonic irradiation. *Materials Letters*, v. 59, n. 28, p. 3682–3686, 2005.

KHAKSAR, M.-R.; GHAZI-KHANSARI, M. Determination of migration monomer styrene from GPPS (general purpose polystyrene) and HIPS (high impact polystyrene) cups to hot drinks. *Toxicology mechanisms and methods*, v. 19, n. 3, p. 257–261, 2009.

KIM, E. J.; YEUM, J. H.; CHOI, J. H. Effects of Polymeric Stabilizers on the Synthesis of Gold Nanoparticles. *Journal of Materials Science and Technology*, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2014.

KIM, S. T.; CHOI, H. J.; HONG, S. M. Bulk polymerized polystyrene in the presence of multiwalled carbon nanotubes. *Colloid and Polymer Science*, v. 285, n. 5, p. 593–598, 2007.

KOTAKADI, V. S. et al. Simple and rapid biosynthesis of stable silver nanoparticles using dried leaves of *Catharanthus roseus*. Linn. G. Donn and its anti microbial activity. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 105, p. 194–198, 2013.

KUMBHAR, A. S.; CHUMANOV, G. Encapsulation of silver nanoparticles into polystyrene microspheres. *Chemistry of Materials*, v. 21, n. 13, p. 2835–2839, 2009.

KVÍTEK, L. et al. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 5, p. 5825–5834, 2008.

LERMÉ, J. et al. Size dependence of the surface plasmon resonance damping in metal nanospheres. *Journal of Physical Chemistry Letters*, v. 1, n. 19, p. 2922–2928, 2010.

LIU, X. et al. A study on gold nanoparticle synthesis using oleylamine as both reducing agent and protecting ligand. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 7, n. 9, p. 3126–3133, 2007.

LU, Z. et al. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v. 24, n. 6, p. 1465–1471, 2013.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

LUO, C. et al. The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, v. 288, n. 2, p. 444–448, 2005.

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. *Polímeros*, v. 17, n. 2, p. 166–179, 2007.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, n. 5, p. 1531–1551, 2010.

MARTINEZ-CASTANON, G. A. et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, n. 8, p. 1343–1348, 2008.

MATHLOUTHI, M. *Food Packaging and Preservation*. Wiltshire: Chapman & Hall, 1998.

MATSUMURA, Y. et al. Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 7, p. 4278–4281, 2003.

MELO, M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MITTAL, A.; KALER, A.; BANERJEE, U. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from Flower Extract of *Rhododendron dauricum*. *Nano Biomedicine and Engineering*, v. 4, n. 3, p. 118–124, 2012.

MOJAHED, F. et al. Wet Chemical Synthesis of Oleylamine-Capped Silver Nanoparticles by a Fast and Facile Reproducible Method. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, v. 41, p. 664–670, 2012.

MONTENEGRO, R. S. P. et al. Poliestireno. *Complexo Químico, BNDES*, p. 1–20, 1997.

MONTENEGRO, R. S. P.; SERFATY, M. E. Aspectos gerais do Poliestireno. *BNDES Setorial*, n. 16, p. 123–126, 2002.

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

MOURDIKOUDIS, S.; LIZ-MARZÁN, L. M. Oleylamine in nanoparticle synthesis. *Chemistry of Materials*, v. 25, n. 9, p. 1465–1476, 2013.

MURCIA, M.; NAUMANN, C. Biofunctionalization of fluorescent nanoparticles. *Nanotechnologies for the Life Science*, v.1., 2005.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. Comunicado Técnico Embrapa Instrumentação, v. 99, p. 1–4, 2008.

ODIAN, G. Principles of Polymerization. 4 rd. ed. New York: John Wiley & Sons, 2004.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology, v. 73, n. 6, p. 1712–1720, 2007.

PANACEK, A. et al. Silver Colloid Nanoparticles : Synthesis , Characterization , and Their Antibacterial Activity. The Journal of Physical Chemistry B, v. 110, n. 33, p. 16248–16253, 2006.

PATIL, R. S. et al. A novel one step synthesis of silver nanoparticles using room temperature ionic liquid and their biocidal activity. Comptes Rendus Chimie, v. 14, n. 12, p. 1122–1127, 2011.

PAWELZYK, P.; TOLEDO, M. L.; WILLENBACHER, N. Ultrasonic in-line monitoring of styrene miniemulsion polymerization. Chemical Engineering Journal, v. 219, p. 303–310, 2013.

POPA, M. et al. Stable silver colloidal dispersions using short chain polyethylene glycol. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 303, n. 3, p. 184–190, 2007.

PRABHU, S.; POULOSE, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. International Nano Letters, v. 2, p. 1–10, 2012.

PROKOPOVICH, P. et al. Potent antimicrobial activity of bone cement encapsulating silver nanoparticles capped with oleic acid. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v. 103, n. 2, p. 273–281, 2015.

ROCO, M. C.; MIRKIN, C. A.; HERSAM, M. C. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: Summary of international study. Journal of Nanoparticle Research, v. 13, n. 3, p. 897–919, 2011.

ROLDÁN, M. V.; PELLEGRINI, N.; SANCTIS, O. DE. Electrochemical Method for Ag-PEG Nanoparticles Synthesis. *Journal of Nanoparticles*, p. 1–7, 2013.

SALAVATI-NIASARI, M.; DAVAR, F.; MIR, N. Synthesis and characterization of metallic copper nanoparticles via thermal decomposition. *Polyhedron*, v. 27, n. 17, p. 3514–3518, 2008.

SALEHI-KHOJIN, A. et al. Nanoparticle Silver Catalysts That Show Enhanced Activity for Carbon Dioxide Electrolysis. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 117, n. 4, p. 1627–1632, 2013.

SANTOS, R. C.; CASTRO, V. M. F. Uma proposição sistêmica para o desenvolvimento de embalagens. *Revista de Administração de Empresas*, v. 38, n. 2, p. 26–35, 1998.

SCHELLENBERG, J. *Syndiotactic Polystyrene*. Schkopau: John Wiley & Sons, 2010.

SHIN, S.-H. et al. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International immunopharmacology*, v. 7, n. 13, p. 1813–1818, 2007.

SILVA, E. DA. Nanociência: a próxima grande idéia? *Revista USP*, n. 76, p. 78–87, 2008.

SOLOMON, S. D. et al. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, v. 84, n. 2, p. 322–325, 2007.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, v. 275, n. 1, p. 177–182, 2004.

SOUSA, L. C. F. S. et al. Tecnologia de embalagens e conservação de alimentos quanto aos aspectos físico, químico e microbiológico. *Agropecuária Científica no Semi-Árido*, v. 8, n. 1, p. 19–27, 2012.

SUCHOMEL, P. et al. Comparative Study of Antimicrobial Activity of AgBr and Ag Nanoparticles (NPs). *Plos One*, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

SUN, Y.; XIA, Y. Increased sensitivity of surface plasmon resonance of gold nanoshells compared to that of gold solid colloids in response to environmental changes. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 20, p. 5297–5305, 2002.

TAGLIETTI, A. et al. Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, v. 28, n. 21, p. 8140–8148, 2012.

TAMBOLI, D. P.; LEE, D. S. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, v. 260, p. 878–884, 2013.

TANKHIWALE, R.; BAJPAI, S. K. Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 69, n. 2, p. 164–168, 2009.

THAKUR, N. K. et al. Formulation and characterization of benzoyl peroxide gellified emulsions. *Scientia Pharmaceutica*, v. 80, n. 4, p. 1045–1060, 2012.

TOLAYMAT, T. M. et al. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment*, v. 408, n. 5, p. 999–1006, 2010.

VAN DONG, P. et al. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. *International Nano Letters*, v. 2, n. 1, p. 9, 2012.

VAN HOOK, J. P.; TOBOLSKY, A. V. The Solution Polymerization of Styrene and Methyl Methacrylate. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 62, n. 3, p. 257–260, 1958.

VODNIK, V. et al. Silver/Polystyrene Nanocomposites: Optical and Thermal Properties. *Polymers and Polymer Composites*, p. 782–788, 2012.

WANI, I. A. et al. Silver nanoparticles: Large scale solvothermal synthesis and optical properties. *Materials Research Bulletin*, v. 45, n. 8, p. 1033–1038, 2010.

WANI, I. A. et al. Silver nanoparticles: Ultrasonic wave assisted synthesis, optical characterization and surface area studies. *Materials Letters*, v. 65, n. 3, p. 520–522, 2011.

XU, Z. et al. Oleylamine as Both Reducing Agent and Stabilizer in a Facile Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, v. 21, n. 9, p. 1778–1780, 2009.

YEO, S. Y.; LEE, H. J. O. O.; JEONG, S. H. Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect. *Journal of materials science*, v. 38, p. 2143–2147, 2003.

YOUSSEF, A. M.; ABDEL-AZIZ, M. S. Preparation of Polystyrene Nanocomposites Based on Silver Nanoparticles Using Marine Bacterial for Packaging. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, v. 52, p. 607–613, 2013.

ZABANIOTOU, A.; KASSIDI, E. Life cycle assessment applied to egg packaging made from polystyrene and recycled paper. *Journal of Cleaner Production*, v. 11, n. 5, p. 549–559, 2003.

ZAHEER, Z. Nucleation and growth kinetics of silver nanoparticles prepared by glutamic acid in micellar media. *International Journal of Chemical Kinetics*, v. 44, n. 10, p. 680–691, 2012.

ZHANG, N. et al. Synthesis of silver nanoparticle-coated poly(styrene-co-sulfonic acid) hybrid materials and their application in surface-enhanced Raman scattering (SERS) tags. *RSC Advances*, v. 3, n. 33, p. 13740–13747, 2013.

ZHOU, W. et al. A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of nanomedicine*, v. 6, p. 381–386, 2011.

ANEXO A – Formulação dos meios de cultura

A.1. Mueller-Hinton *broth*

Infusão de sólidos bovino.....	3 g
Caseína Hidrolisada.....	17,5 g
Amido.....	1,5 g
Água destilada.....	1000 ml

A.2. Ágar MacConkey Base

Digestão Péptica de Tecido Animal.....	17 g
Peptona proteose.....	3 g
Sais biliares.....	1,5 g
Cloreto de sódio.....	5 g
Cristal violeta.....	0,001 g
Vermelho neutro.....	0,03 g
Ágar.....	13,5 g
Água destilada.....	1000 ml

A.3. Ágar Mueller-Hinton

Infusão de sólidos bovino.....	2 g
Caseína Hidrolisada.....	17,5 g
Amido.....	1,5 g
Ágar.....	17 g
Água destilada.....	1000 ml