

Estela Mary Fernandes de Sá

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA  
OBTENÇÃO DE NANOCOMPÓSITO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE BACTERICIDA EM POLIESTIRENO  
EXPANSÍVEL**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado

Coorientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

Florianópolis  
2015

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

Sá; Estela Mary Fernandes de

Síntese de Nanopartículas de Prata para Obtenção de Nanocompósito e Avaliação da Atividade Bactericida em Poliestireno Expansível / Estela Mary Fernandes de Sá; orientador, Ariovaldo Bolzan ; coorientador, Ricardo Antonio Francisco Machado. – Florianópolis, SC, 2015.

190 p.

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

Inclui referência

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

Estela Mary Fernandes de Sá

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA  
OBTENÇÃO DE NANOCOMPÓSITO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE BACTERICIDA EM POLIESTIRENO  
EXPANSÍVEL**

Esta Tese foi julgada e adequada para obtenção do Título de “Doutor em Engenharia Química” área de concentração em Controle de Processos e Polimerização e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina. De Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 26 de outubro de 2015.

---

Prof. Dr. Ricardo A. F. Machado  
(UFSC)

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Nunes Lopes  
(UFSC)

---

Prof. Dr. Raphael Hirata Junior  
(UERJ)

---

Prof. Dr. Rodrigo Reis  
(UERJ)

---

Prof. Dr. Admir Giachini  
(UFSC)

---

Dr<sup>a</sup>. Camila Azevedo Antunes  
(UERJ)



Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Maria Eunice e Volney.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

Aos Departamentos de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, Departamento de Química da UFSC e Departamento de Ciências Biológicas da UFSC.

Ao Laboratório de Controle de Processos (LCP), Grupo de Microbiologia (UERJ), Grupo de Engenharia Química e Materiais (UERJ) e Grupo de Microbiologia Prof. Admir (MIP UFSC) pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

Ao professor Ricardo A. F. Machado pela orientação.

Aos professores Admir Giachini e Raphael Hirata Junior e à doutoranda Marílio Miotto pelo suporte e orientação durante os ensaios de microbiologia.

Aos integrantes dos Grupos de Pesquisa do LCP da UFSC, da UERJ, nas pessoas do prof. Rodrigo Reis e Antoniel Campos, que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Eunice de Sá e Volney Fernandes de Sá, pelo apoio, paciência e amor, ao exemplo de caráter e espírito de luta que permitiu que eu nunca desistisse dos meus objetivos ao longo da minha vida.

Ao meu noivo, Eduardo Valentim da Silva, pelo apoio, amor e por compreender os momentos de ausência.

Aos amigos, Rômulo Couto Alves, Nilva Regina Uliana, Iaçanã Parisotto e Viviane Silva, pelo companheirismo e ombro amigo nesses anos de doutorado.

À equipe da Educação do SESI – Serviço Social da Indústria de Santa Catarina pelo incentivo profissional e por acreditar e confiar na minha capacidade como colaboradora.



“Porque eu, o Senhor teu Deus, te seguro pela tua  
mão direita e te digo: Não temas; Eu te ajudarei.”  
(Isaias 41:13)



## RESUMO

A nanotecnologia é vista como um campo emergente que envolve a produção, processamento e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas pelo controle da forma e tamanho em escala nanométrica. As nanopartículas de prata (AgNPs) têm tido grande atenção e emergido como principal produto do campo na nanotecnologia. Essas nanopartículas apresentam propriedades antimicrobianas mais eficientes que outros sais de prata, devido a maior área de superfície e a baixa solubilidade, o que permite melhor contato com os microorganismos. Neste contexto, esta tese visa a obtenção de uma rota de síntese de nanopartículas de prata, com posterior desenvolvimento de nanocompósitos via polimerização em suspensão do estireno para obtenção de poliestireno expansível (EPS) com propriedades antimicrobianas. E, portanto, o estudo visa a aplicação do EPS/AgNP como embalagens para acondicionamento de pescados, com o intuito de garantia de qualidade e segurança alimentar, tendo em vista o grupo de bactérias estudado (*E.coli*, *S.aureus* e *S.TYPHIMURIUM*). As nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas por rotas de sínteses tradicionais em meio aquoso, com condições otimizadas através de delineamento experimental. Tais nanopartículas sofreram hidrofobização usando ácido oleico e ácido fosfórico como agentes de transferência de fase. Após hidrofobizadas as nanopartículas foram transferidas para o monômero estireno, o qual foi polimerizado via reação de polimerização em suspensão. Os polímeros antimicrobianos desenvolvidos foram caracterizados para avaliar a influência da adição das AgNPs nas propriedades finais desses materiais em relação ao poliestireno puro. A partir dos resultados, as AgNPs foram incorporadas no polímero a partir da concentração bacteriostática, obtendo-se sistema estável e polímero com características adequadas de aplicação industrial, em termos de concentração de prata, distribuição de tamanho de partícula polimérica, massa molecular polimérica e monômero residual. E, apesar, da baixa concentração de AgNP na matriz polimérica (~ 0,51%) foi possível obter poliestireno expansível com características antimicrobianas, frente *E. coli*, *S.aureus* e *S. TYPHIMURIUM*, bactérias que entram no grupo de controle de qualidade para pescados, de acordo com a legislação brasileira e europeia.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de prata. Poliestireno expansível. Embalagem Antimicrobiana.



## ABSTRACT

Nanotechnology is seen as an emerging field that involves the production, processing and application of structures, devices, and systems by controlling shape and nanometer size scale. The silver nanoparticles (AGNPs) have had great attention and emerged as the main product of the field in nanotechnology. These nanoparticles show more effective antimicrobial properties than other silver salts due to the greater surface area and low solubility, which allows better contact with the microorganisms. In this context, this Ph.D. dissertation aims at obtaining a route for the synthesis of silver nanoparticles with subsequent development of nanocomposites via the styrene suspension polymerization to obtain expandable polystyrene (EPS) with antimicrobial properties. And therefore, the study aims to apply the EPS / AgNP as package for fish packaging, with the quality assurance of development and food security, taking into account the group studied bacteria (*E. coli*, *S. aureus* and *S. TYPHIMURIUM*). The silver nanoparticles (AGNPs) were synthesized by traditional synthesis routes in an aqueous medium with optimal conditions by experimental design. Such nanoparticles have undergone hydrophobic oleic acid and used phosphoric acid as phase transfer agents. After the nanoparticles have been hydrophobized, they were transferred to the styrene monomer, which was polymerized via suspension polymerization reaction. The developed antimicrobial polymers were characterized to assess the influence of the addition of AGNPs in the final properties of these materials compared to pure polystyrene. From the results, AGNPs were embedded in the the polymer from the bacteriostatic concentration, obtaining stable polymer system and adequate characteristics of industrial application in terms of the silver concentration distribution of polymer particle size, polymer molecular weight and monomer residual. And, in spite of the low concentration of AgNP in the polymer matrix (~ 0.51%), it was possible to achieve expandable polystyrene with microbial characteristics, against *E. coli*, *S. aureus* and *S. TYPHIMURIUM* bacteria, which enter the quality control group to fish, according to the Brazilian and European legislation.

**Keywords:** Silver nanoparticles. Polystyrene expandable. Antimicrobial packaging.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Típico regime de tempo-temperatura para dois estágios de polimerização.....	34
Figura 2 -	Representação esquemática de oscilação plasmônica de superfície (nuvem eletrônica) sob o efeito de um campo eletromagnético.....	37
Figura 3 -	Dispersões coloidais de nanopartículas de prata. (a) espectros com diferentes densidades ópticas e (b) aspecto visual correspondente aos espectros.....	40
Figura 4 -	Nanopartículas de prata separadas por forças repulsivas com borohidreto adsorvido.....	42
Figura 5 -	Esquema ilustrativo do mecanismo de atuação das nanopartículas de prata e íons de prata no combate aos microorganismos.....	45
Figura 6 -	Microscopia eletrônica de células nativas de <i>E. coli</i> . (a) células tratadas com $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de nanopartículas de prata em meio líquido por 4h (b) indicando a presença de nanopartículas de prata no interior das células.....	47
Figura 7 -	Estruturas internas de (a) <i>Staphilococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i> observadas por TEM.....	47
Figura 8 -	Fluxograma da metodologia experimental.....	57
Figura 9 -	Procedimento experimental do processo de hidrofobização das AgNPs.....	63
Figura 10 -	Unidade experimental de aumento de escala da síntese das AgNPs.....	65
Figura 11 -	Unidade experimental para polimerização em suspensão e impregnação.....	68
Figura 12 -	Experimento de viscosimetria e desenho esquemático do viscosímetro de Ubbelohde.....	75
Figura 13 -	Gráfico de superfície de resposta (A) e contorno (B) para o tamanho de partícula (nm) em função da concentração de citrato (mM) e do tempo de aquecimento após síntese (s)....	82
Figura 14 -	Espectro de absorção UV-visível e microestruturas TEM das AgNP.....	84
Figura 15 -	Distribuições de tamanho de partículas da solução coloidal de AgNP sintetizadas por citrato de sódio.....	85
Figura 16 -	Relação entre concentração de redutor (mM) e agitação (rpm) referente ao ponto +1 para o tamanho de partícula (nm).....	86
Figura 17 -	Relação entre temperatura (°C) e concentração de redutor (mM) referente ao ponto central para tamanho de partícula (nm).....	87
Figura 18 -	Relação entre temperatura (°C) e concentração de redutor (mM) referente ao ponto +1 para tamanho de partícula	

	(nm).....	87
Figura 19 -	Espectro de absorção UV-Visível das AgNP sintetizadas com NaBH <sub>4</sub> .....	89
Figura 20 -	Distribuições de tamanho de partículas e microestruturas (TEM) da solução coloidal de AgNP sintetizadas por borohidreto de sódio.....	90
Figura 21 -	Microestruturas por SEM-FEG das soluções coloidais de AgNP sintetizadas por borohidreto de sódio.....	91
Figura 22 -	Espectros de absorção e distribuição de tamanho de partículas das AgNP em diferentes quantidades de AgNO <sub>3</sub> .....	94
Figura 23 -	Variações do comprimento de onda no pico de <i>plasmon</i> com a quantidade de nitrato de prata a 35°C.....	95
Figura 24 -	Espectros UV-Vis durante a síntese das AgNP a partir da redução do AgNO <sub>3</sub> com NaBH <sub>4</sub> à 35 °C.....	95
Figura 25 -	Nucleação de AgNP à 35 °C.....	96
Figura 26 -	Relação entre concentração de estabilizantes e relação molar NaBH <sub>4</sub> :AgNO <sub>3</sub> em função da polidispersidade.....	98
Figura 27 -	Espectro de absorção UV-Visível das AgNP estabilizadas...	101
Figura 28 -	Potencial zeta das soluções das AgNPs recobertas por NaCit.....	102
Figura 29 -	Potencial Zeta das AgNPs recobertas por NaCit depois da interação por 30 dias em pH 9,6±0,4.....	104
Figura 30 -	Relação entre os volumes de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M e ácido oléico em função da densidade óptica.....	105
Figura 31 -	Espectros e fases do processo de hidrofobização das AgNP.....	106
Figura 32 -	Espectro de FT-IR de (a) estireno, (b) nanopartículas de prata recobertas por ácido oleico e (c) ácido oleico puro.....	107
Figura 33 -	Espectro de FT-IR de (a) ácido oleico puro e (b) nanopartículas de prata recobertas por ácido oleico.....	108
Figura 34 -	Espectros de UV-Vis referente à cinética de nucleação dos experimentos de aumento de escala para síntese de AgNPs..	112
Figura 35 -	Comparação dos halos de inibição entre as bactérias <i>E.coli</i> e <i>S.aureus</i> para as AgNPs em diferentes concentrações de AgNO <sub>3</sub> .....	114
Figura 36 -	Ensaio de Concentrações Mínima Inibitória e Bactericida.....	118
Figura 37 -	Células bacterianas de <i>E.coli</i> .....	123
Figura 38 -	Células bacterianas de <i>S. TYPHIMURIUM</i> .....	124
Figura 39 -	Células bacterianas de <i>S. aureus</i> .....	125
Figura 40 -	Conversão e Viscosidade do sistema de polimerização em massa (polimerização térmica).....	127
Figura 41 -	Cinética da polimerização em massa do PS puro e aditivado	

	com AgNP.....	127
Figura 42 -	Decomposição térmica dos filmes de PS e PS/Ag.....	129
Figura 43 -	Termograma de DSC dos filmes de PS e PS/Ag.....	129
Figura 44 -	Espectros de Infravermelho dos filmes de PS e PS/AgNP....	130
Figura 45 -	Comportamento cinético experimental da polimerização do estireno com AgNP nas concentrações bacteriostática e bactericida.....	133
Figura 46 -	EPS e EPS/AgNP obtidos via polimerização em suspensão..	134
Figura 47 -	Histogramas de distribuição do tamanho de partículas do PS puro e aditivado com AgNP.....	136
Figura 48 -	Micrografias das pérolas de PS, PS/AgNP, EPS e EPS/AgNP.....	139
Figura 49 -	Resultados de TGA.....	141
Figura 50 -	Termogramas obtidos por DSC.....	142
Figura 51 -	Cinética da atividade bacteriana em contato com o PS puro e PS/AgNP.....	143
Figura 52 -	Contagem de colônias de <i>S. aureus</i> do teste de contato entre cepas bacterianas e material polimérico.....	144
Figura 53 -	Contagem de colônias de <i>E. coli</i> do teste de contato entre cepas bacterianas e material polimérico.....	145
Figura 54 -	Contagem de colônias de <i>S. TYPHIMURIUM</i> do teste de contato entre cepas bacterianas e material polimérico.....	146



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características de absorção plasmônica de superfície e aplicações das nanopartículas metálicas.....	38
Tabela 2 -	Medidas das zonas de inibição das AgNP segundo estudo de Mathew e Kuriakose (2013).....	49
Tabela 3 -	Formulação usada na reação de polimerização em massa....	67
Tabela 4 -	Formulação usada na reação de polimerização de suspensão do estireno.....	69
Tabela 5 -	Formulação usada na cinética da reação de polimerização....	73
Tabela 6 -	Características de tamanho de partícula com as respectivas condições otimizadas na síntese de AgNP com NaBH <sub>4</sub> .....	88
Tabela 7 -	Experimentos de aumento de escala da síntese de AgNPs....	109
Tabela 8 -	Concentração de AgNP determinada por espectrometria de absorção atômica.....	113
Tabela 9 -	Valores médios dos halos de inibição e desvio padrão das AgNP sintetizadas por aumento de escala.....	114
Tabela 10 -	Comparação da atividade antimicrobiana (CMI e CMB) das AgNPs.....	117
Tabela 11 -	Bandas de absorção identificados na Figura 44.....	131
Tabela 12 -	Atividade antimicrobiana dos filmes de PS e PS/AgNP.....	131
Tabela 13 -	Diâmetro médio de Sautner e dispersão das partículas de PS puro e aditivado com AgNP.....	136
Tabela 14 -	Teores de monômero residual no PS e PS/AgNP.....	137
Tabela 15 -	Massas molares viscosimétricas para os materiais poliméricos obtidos.....	137



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAS – Espectroscopia de Absorção Atômica
- AgNP – Nanopartículas de prata
- AIBN - 2,2-azobisobutironitrila
- ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- BPO – Peróxido de benzoíla
- CMB – Concentração Mínima Bactericida
- CMI – Concentração Mínima Inibitória
- DLS – Espalhamento dinâmico de luz
- DSC - Calorimetria diferencial de varredura
- DTP – Distribuição de Tamanho de Partícula
- EPS - Poliestireno Expansível/Expandido
- FDA - *Food and Drug Administration*
- FT-IR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- PIP – Ponto de Identificação de Partícula
- PS – Poliestireno
- PVA – Poli(vinil álcool)
- PVP – Poli(vinil pirrolidona)
- TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- TGA - Análise termogravimétrica



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
2.1 POLIMERIZAÇÃO EM SUSPENSÃO DO ESTIRENO .....	29
2.2 POLIESTIRENO (PS) E POLIESTIRENO EXPANSÍVEL (EPS) COMO MATERIAL PARA EMBALAGENS .....	33
2.3 NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	37
2.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs).....	39
2.4.1 Rotas de síntese .....	40
2.4.2 Estudos de estabilidade .....	42
2.4.3 Propriedade bactericida e mecanismo de ação.....	44
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
3.1 REAGENTES UTILIZADOS .....	58
3.2 OBTENÇÃO DA ROTA DE SÍNTESE DAS AgNPs .....	59
3.2.1 Redução química por citrato de sódio .....	59
<b>3.2.2 Redução química por borohidreto de sódio</b> .....	<b>60</b>
<b>3.2.3 Nucleação das nanopartículas de prata</b> .....	<b>60</b>
<b>3.2.4 Avaliação da estabilidade das nanopartículas de prata</b> .....	<b>61</b>
3.2.4.1 Estabilidade óptica sob refrigeração .....	62
3.2.4.2 Estabilidade em diferentes pHs.....	62
3.3 HIDROFOBIZAÇÃO DAS AgNPs .....	62
3.4 UNIDADE EXPERIMENTAL DE AUMENTO DE ESCALA.....	64
3.5 UNIDADE EXPERIMENTAL DA POLIMERIZAÇÃO EM MASSA... 65	
<b>3.5.1 Polimerização térmica do estireno em presença de ácido oleico e AgNP</b> .....	<b>66</b>
<b>3.5.2 Filmes de PS e PS/AgNP</b> .....	<b>66</b>
3.6 UNIDADE EXPERIMENTAL: POLIMERIZAÇÃO EM SUSPENSÃO E IMPREGNAÇÃO .....	67
3.7 SÍNTESE DO MATERIAL POLIMÉRICO (PS E PS/AgNP) .....	68
3.8 ADITIVAÇÃO E EXPANSÃO DO EPS E EPS/AgNP .....	69
3.9 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO .....	69
3.9.1 Espectroscopia no UV-Visível .....	68
3.9.2 Espalhamento dinâmico da luz (DLS).....	70
3.9.3 Potencial Zeta.....	70
3.9.4 pH.....	70
3.9.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	71
3.9.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	72
3.9.7 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	72
3.9.8 Cinética de polimerização (método gravimétrico).....	73
3.9.9 Análise granulométrica: Tamanho de partícula PS/AgNP .....	73
3.9.10 Avaliação da massa molecular por viscosimetria .....	74
3.9.11 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC). 75	
3.9.12 Análise de monômero residual .....	75
3.9.13 Espectrometria de Absorção Atômica (AAS).....	76

3.9.14 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	76
3.9.14.1 Teste d difusão .....	77
3.9.14.2 Concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) .....	77
3.9.14.3 Teste de contato aplicado ao EPS e EPS/Ag .....	78
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
4.1 ROTAS DE SÍNTESE DAS AgNPs .....	81
4.1.1 Rota de síntese com citrato de sódio .....	81
4.1.2 Rota de síntese com borohidreto de sódio .....	85
4.1.3 Nucleação das nanopartículas de prata .....	92
4.1.4 Estabilização das nanopartículas de prata .....	96
4.2 HIDROFOBIZAÇÃO DAS AgNPs .....	104
4.3 AUMENTO DE ESCALA DAS AgNPs .....	108
4.4 QUANTIFICAÇÃO DAS AgNPs POR AAS .....	113
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES DE AgNP .....	113
4.5.1 Teste de difusão .....	113
4.5.2 Concentrações mínimas inibitória (CMI) e bactericida (CMB) .....	116
4.6 OBTENÇÃO NANOCOMPÓSITO AgNPs/POLIESTIRENO .....	126
4.6.1 Polimerização em massa - Filmes .....	126
4.6.2 Polimerização em suspensão - PS E EPS .....	132
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>149</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>153</b>
<b>APÊNDICE A – Síntese AgNP com Na<sub>3</sub>Cit .....</b>	<b>169</b>
<b>APÊNDICE B - Síntese AgNP com NaBH<sub>4</sub> .....</b>	<b>173</b>
<b>APÊNDICE C - Estudo da estabilidade das AgNPs .....</b>	<b>177</b>
<b>APÊNDICE D - Estudo da hidrofobização das AgNPs .....</b>	<b>183</b>
<b>APÊNDICE E - Cinética de polimerização em massa do PS puro e aditivado com AgNP .....</b>	<b>185</b>
<b>APÊNDICE F - Cinética de polimerização em massa do PS puro e aditivado com AgNP nas concentrações bacteriostática e bactericida .....</b>	<b>187</b>
<b>APÊNDICE G - Curvas de calibração .....</b>	<b>189</b>

## INTRODUÇÃO

O mercado atual apresenta exigências que fazem com que a indústria e agroindústria brasileira estejam sempre na busca da melhoria dos processos tendo em vista maior produtividade, qualidade e competitividade. Paralelo à este cenário, o foco em procedimentos industriais visando a higiene sanitária e redução de contaminação biológica, principalmente em processos na indústria alimentícia, vem ganhando destaque (VANER, 2010; DUNCAN, 2011; ECHEGOYEN; NERÍN, 2013). Na indústria de polímeros esta é uma preocupação pertinente, tanto pelo uso destes materiais, como embalagens de alimentos, como também pelo fato de serem potenciais vetores de proliferação de microorganismos quando contaminados (tanto pelo processo quanto pelo uso) e descartados.

Neste contexto, a pesquisa sobre nanocompósitos de prata/polímeros torna-se promissora, tanto no meio acadêmico quanto no meio industrial. Isto ocorre porque esses nanocompósitos frequentemente apresentam melhoras significativas nas propriedades dos novos materiais obtidos, quando comparados com polímeros virgens ou compósitos convencionais (ECHEGOYEN; NERÍN, 2013; METAK; AJAAL, 2013). Essa característica, aliada à demanda criada pela necessidade de se agregar valor ao poliestireno, configura um cenário promissor para estudos com o objetivo de realçar as propriedades que não apresentam desempenhos nos polímeros virgens, ou para a obtenção de materiais para aplicações específicas de alto valor agregado.

Todavia, cientistas e industriais têm identificado usos potenciais da nanotecnologia em muitos segmentos da indústria, no ramo da agricultura, processamento de alimentos, embalagens de alimentos e suplementos nutricionais. Inegavelmente, a área mais ativa das pesquisas e desenvolvimento em nanociência em alimentos é o setor de embalagens. O mercado de embalagens de bebidas e alimentos nanoestruturadas foi de 4,13 bilhões de dólares nos Estados Unidos em 2008 e foi projetado para crescer a 7,3 bilhões antes de 2014, representando uma taxa de crescimento anual de 11,65% (DUNCAN, 2011). Quando alimentos não serão consumidos imediatamente, depois da produção, eles devem ser armazenados em uma embalagem que sirva de proteção contra microrganismos patogênicos, umidade, etc., dentre outras funções. E, de maneira geral, os trabalhos encontrados apontam que de fato diversas propriedades foram realçadas nos novos compósitos obtidos a partir de características específicas da nanocarga, mas nada especificamente no que tange a formação de um nanocompósito de

matriz polimérica de poliestireno expansível com propriedades antimicrobianas. Portanto, para que tal nanocompósito seja produzido é necessário que umas das fases tenham propriedades antimicrobianas, e neste cenário, cabe-se apresentar as nanopartículas de prata, as quais podem ser incorporadas em uma matriz de poliestireno.

O segmento alimentar é o mais representativo na economia industrial do estado de Santa Catarina sendo destaque na pesca, ocupando nacionalmente liderança na produção de pescados. Tais produtos, costumeiramente, são estocados em caixas de Poliestireno Expansível (EPS) para exportação. Neste caso o desenvolvimento de uma embalagem antimicrobiana para este tipo de produto é promissor e por isso, o presente trabalho tem como objetivo principal a síntese de poliestireno expansível antimicrobiano para aplicação como embalagem primária para alimentos, no caso pescados, e embalagem secundária para medicamentos e vacinas.

Além disso, os objetivos específicos deste trabalho compreendem:

1. Sintetizar nanopartículas de prata através do método de redução química utilizando dois diferentes redutores inorgânicos (citrato de sódio e borohidreto de sódio);
2. Selecionar a rota de síntese de nanopartículas de prata a ser empregada, através de planejamento experimentais e análises laboratoriais;
3. Avaliar o mecanismo de nucleação das nanopartículas de prata sintetizadas pela rota selecionada anteriormente, além de escolha do estabilizante ideal para o sistema.
4. Realizar da hidrofobização das nanopartículas diretamente para o monômero estireno.
5. Obter os nanocompósitos via polimerização em massa, visando primeiramente se o nanocompósito foi de fato obtido, e posteriormente caracterizá-lo, selecionar as propriedades de interesse e compará-las com o poliestireno sem nanocarga;
6. Obter e caracterizar os nanocompósitos via polimerização em suspensão, visando obter nanocompósito de nanopartículas de prata/poliestireno expansível por meio de adição de pentano para a expansão física.
7. Avaliar a influência das nanopartículas de prata incorporadas no poliestireno expansível para a aplicação industrial.

A obtenção de poliestireno expansível antimicrobiano, justifica a proposta inédita deste trabalho. Tal ineditismo consiste na incorporação

de nanopartículas de prata *in situ* na polimerização em suspensão do estireno.

Com o intuito de facilitar a apresentação, este documento foi dividido em quatro partes para facilitar a apresentação. O Capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica necessária ao desenvolvimento deste trabalho, no que se refere a uma revisão bibliográfica sobre os componentes orgânico (poliestireno) e inorgânico (nanopartículas de prata). Além disso, esse capítulo aborda aspectos teóricos pertinentes sobre a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata. No Capítulo 3 são descritos as metodologias adotadas, os procedimentos experimentais, bem como, as caracterizações realizadas ao longo do trabalho. Os resultados e as discussões estão apresentados no Capítulo 4 e as conclusões e sugestões para trabalhos futuros constam no Capítulo 5. Por fim, os apêndices A e B apresentam os resultados obtidos no delineamento experimental para as diferentes rotas de sínteses das nanopartículas de prata, assim como suas caracterizações preliminares. Os resultados de aplicação do delineamento experimental para o estudo e aplicação de estabilizantes das nanopartículas de prata sintetizadas em meio aquoso, são apresentados no apêndice C. Em seguida, o apêndice D apresenta os resultados dos experimentos de hidrofobização das nanopartículas de prata para a transferência do meio aquoso para o estireno. Os resultados das cinéticas de polimerização são apresentados nos apêndices E e F. E, no apêndice G são apresentadas as curvas de calibração das caracterizações realizadas ao longo esse trabalho.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados aspectos referentes ao contexto do trabalho disponíveis na literatura. Esta revisão bibliográfica apresenta-se dividida em diferentes partes, a fim de sistematizar as informações, as quais estão relacionadas aos trabalhos relevantes sobre poliestireno expansível, nanotecnologia, nanopartículas de prata e nanocompósitos, que foram utilizados como base para esta pesquisa.

### 2.1 POLIMERIZAÇÃO EM SUSPENSÃO DO ESTIRENO

Polímeros sintéticos, como o poliestireno, podem ser obtidos pela combinação do monômero estireno através de um grande número de mecanismos de reação (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007). O estireno, matéria prima do polímero poliestireno, é um hidrocarboneto aromático insaturado de fórmula  $C_6H_5C_2H_3$ , também é chamado de feniletileno, vinil-benzeno, etinil-benzeno ou estírol. O estireno apresenta-se na forma líquida, com ponto de ebulição  $146\text{ }^\circ\text{C}$  e ponto de fusão  $-30,6\text{ }^\circ\text{C}$  (INNOVA, 1997). Como um material plástico convencional possui ampla gama de aplicações tais como em materiais de embalagens e utensílios domésticos, indústria de varejo, para proteger instrumentos eletrônicos, eletrodomésticos, partes de automóveis (ZAN et al., 2004).

A polimerização do estireno é geralmente reconhecida como sendo uma reação de poliadicação com crescimento em cadeia, através do mecanismo via radicais livres (CHANDA, 2006). Em se tratando da fabricação do poliestireno expansível (EPS), o processo de polimerização é em suspensão do tipo pérola. Neste sistema são adicionados compostos iniciadores, moléculas que, em condições reacionais determinadas formam radicais, sendo esses radicais responsáveis pelo início da polimerização. O iniciador e o monômero estireno forma a fase orgânica da reação e são dispersos numa fase aquosa, onde todos são insolúveis ou possuem baixa solubilidade, sob forte agitação em presença de agentes de suspensão (estabilizantes) (ODIAN, 2004; CHANDA, 2006). A forte agitação do sistema permite que o monômero seja mantido na forma de gotas, que durante o processo reacional são convertidas de um estado líquido de alta mobilidade, passando por um estado de alta viscosidade (conversão em torno de 20 a 60%) e, finalmente, para partículas sólidas do polímero (conversão  $> 70\%$ ) (ODIAN, 2004; MACHADO; LIMA; PINTO, 2007).

As interações no sistema são responsáveis pela construção do mecanismo cinético típico de cada reação. Assim, este mecanismo exerce um papel fundamental na evolução do tamanho e distribuição do tamanho de partículas na polimerização em suspensão. A viscosidade das gotas e sua variação com o tempo é reflexo da conversão, (JAHANZAD; SAJJADI; BROOKS, 2005). Neste caso, cada gota de monômero em polimerização é considerada uma mini reação em massa, e, portanto, assume-se que o comportamento cinético da polimerização em suspensão é muito semelhante ao da polimerização em massa (DOWDING e VINCENT, 2000).

O processo de polimerização em uma suspensão convencional pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação, o monômero e o iniciador são dispersos na fase aquosa contínua pela combinação de forte agitação e adição de agentes de suspensão ou estabilizantes (YUAN et al., 1991; BISHOP, 1971; ODIAN, 1991). Nesta etapa ocorre a iniciação química, na qual há a formação dos radicais livres, pela decomposição térmica do iniciador, e a formação da cadeia polimérica primária. Ocorre também a iniciação térmica onde as reações ocorrem abaixo de 100°C (ODIAN, 1991). À medida que a reação avança, as gotas de monômero são convertidas de um estado líquido de alta mobilidade até alcançarem o estágio em que atingem a forma de partículas sólidas de polímero. Este ponto é conhecido como Ponto de Identificação da Partícula (PIP), onde não ocorre mais quebraimento nem coalescência e o diâmetro das mesmas permanece constante (YUAN et al., 1991; BISHOP, 1971; ODIAN, 1991). Na etapa de propagação uma cadeia polimérica intermediária ativa é formada e é neste estágio que acontece o crescimento da cadeia polimérica E, finalmente, a etapa de terminação é responsável pela desativação de uma molécula em crescimento para a formação de um produto estável (ODIAN, 1991; JAHANZAD; SAJJADI; BROOKS, 2005).

Diversos fatores podem causar mudanças consideráveis em uma reação de polimerização em suspensão, além da influência no produto final, o que passa a ser de extrema importância o controle dessas variáveis para a obtenção de um produto com aplicação industrial. Dentre esses fatores temos (BISHOP, 1971; ODIAN, 1991, MASCIOLI, 2001; MACHADO; LIMA; PINTO, 2007):

a) Estabilizante: influencia diretamente em um dos pontos mais críticos, que é o controle da distribuição de tamanho de partícula (DTP). Este controle é importante já que determina a aplicação final do material produzido. O polímero é obtido na forma de partículas esféricas com

larga faixa de distribuição de tamanhos (50 - 2000  $\mu\text{m}$ ), estas devem ser classificadas em frações com dimensões específicas, conforme sua aplicação final.

b) Agitação: influencia a manutenção da suspensão durante a reação, permitindo a formação das gotas quando se tem dois líquidos imiscíveis. A frequência de agitação afeta diretamente as características de tamanhos das gotas. Quanto maior for esta frequência, maior é o quebramento das gotas e consequentemente a formação de gotas de menor tamanho. Entretanto, altas frequências de agitação permitem o aumento da taxa de coalescência, o que pode aumentar o tamanho da gota, pelo maior choque entre as partículas. Pode ocorrer também a dessorção do estabilizante alterando sua eficiência para a manutenção da DTP.

c) Iniciador: possuem grande influência na massa molar e distribuição do tamanho de partícula do polímero. São as espécies químicas responsáveis pela iniciação da reação de polimerização e geralmente os iniciadores mais utilizados são peróxidos e azocompostos. Estas moléculas possuem ligações covalentes de baixa energia, que sob condições energéticas brandas sofrem quebra homolítica liberando radicais livres altamente reativos, que iniciam a cadeia.

d) Temperatura: está diretamente ligada ao iniciador utilizado. Possuem influência no tamanho das partículas, pois com o aumento da temperatura, o tamanho das partículas também aumenta, já que a taxa de polimerização é maior. E, portanto, a taxa de auto-aceleração da reação conduz a uma taxa de coalescência maior ao quebramento, favorecendo a formação de partículas maiores, pois isto contribui para o aumento da viscosidade do meio e o fenômeno de coalescência fique acentuado.

As cinéticas de coalescência e quebramento, no processo de polimerização, são constantemente alteradas ao longo da reação, conforme são modificadas as características reológicas das partículas a medida que a conversão avança, e portanto, é requerida a adição de estabilizante para impedir, justamente os fenômenos de coalescência e quebramento de gotas durante a polimerização. O estabilizante polimérico, quando dissolvido na fase aquosa, pode atuar de duas formas. Em primeiro lugar, ele diminui a tensão interfacial entre as gotas de monômero e a água, promovendo a dispersão das gotas. Em segundo lugar, as moléculas estabilizantes são adsorvidas sobre a superfície das gotas de monômero, produzindo uma fina camada que evita a coalescência das gotas quando ocorre a colisão entre elas. A tendência da aglomeração das gotas pode ficar crítica, quando a polimerização avança para o ponto onde a gota de polímero torna-se

pegajosa (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007). O quebramento das gotas de monômero ocorre devido à exposição das gotas às forças inerciais devido às flutuações da velocidade turbulenta e às forças viscosas de cisalhamento. Se a deformação pela frequência de agitação do sistema é grande, as gotas se tornam instáveis e rompem-se em dois ou mais fragmentos (NARSIMHAN; GUPTA; RAMKRISHNA, 1979). A variação no tamanho das gotas está relacionada aos diferentes níveis de turbulência existentes no reator (KUMAR et al., 1998). Segundo Yang et al. (2000) na região perto do impelidor predomina o quebramento e na região de recirculação predomina a coalescência.

Vale ressaltar que a difusão das espécies químicas no meio afetam os fenômenos cinéticos que ocorrem na reação de polimerização do poliestireno em suspensão. Dentre esses fenômenos tem-se três principais:

1) Efeito gaiola (*Cage effects*): este efeito está relacionado diretamente à eficiência do iniciador utilizado em uma reação de polimerização. Quando comparada a quantidade de iniciador que efetivamente deu início a formação das cadeias poliméricas frente à quantidade de iniciador que se decompõe ao longo de uma polimerização, verifica-se um desempenho ineficiente. Este desperdício ocorre devido a reações paralelas no sistema, antes mesmo da formação da cadeia polimérica (ODIAN, 1991). Costuma-se associar a reação de decomposição do iniciador a um fator de eficiência,  $f_i$ , que pode variar no transcorrer da reação (BIESENBERGER; SEBASTIAN, 1983). Na etapa de iniciação química, o iniciador é decomposto em radicais ativos, antes desses se difundirem separadamente, eles encontram-se presos em uma espécie de gaiola, formada pelas moléculas que os envolvem. Neste ambiente, os radicais pode se recombinar, formando novamente a molécula do iniciador original, ou se decompor em radicais secundários e reagir entre si, formando uma cadeia estável, incapaz de iniciar uma nova cadeia polimérica. Ainda dentro da gaiola, os radicais primários podem reagir com moléculas de monômero ou simplesmente se difundirem para fora da gaiola. Uma vez fora da gaiola, os radicais podem reagir com moléculas de monômero, iniciando uma nova cadeia polimérica, ou ainda reagir com um radical secundário, desativando ambos. Após ter difundido para fora da gaiola, a probabilidade do radical formar uma nova cadeia polimérica é maior que a probabilidade da ocorrência de reações laterais que o desativem, devido a enorme quantidade de moléculas de monômero frente a qualquer outra espécie (GONÇALVES, 2003).

2) Efeito Gel (Gel Effects): surge tipicamente quando as conversões do monômero atingem a faixa de 20 a 40% e está relacionado ao aumento de viscosidade no meio reacional (MACHADO; LIMA; PITO, 2003). Provoca, assim, a redução da mobilidade das macromoléculas ativas, diminuindo a taxa de terminação dos radicais livres intermediários e tornando essa etapa controlada pela difusão molecular (BIESENBERGER; SEBASTIAN, 1983). Alguns parâmetros finais de reação podem ser afetados pelo efeito gel tal como a massa molar polimérica. O efeito gel ainda pode resultar na formação de cadeias não lineares, as quais são bastante significativas quando se deseja seguir um modelo de polimerização via radicais livres (KIPARISSIDES, 1996). Portanto, a diminuição no coeficiente de transferência de calor pode resultar no descontrole da temperatura da reação o que ocasionará produtos poliméricos indesejados.

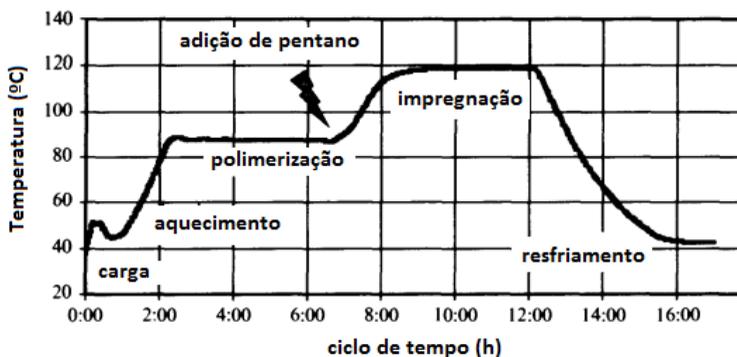
3) Efeito vítreo (glass effect): ocorre em polimerizações onde a temperatura de reação se encontra abaixo da temperatura de transição vítrea do polímero ( $T_g$ ), tendo como consequência o “congelamento” do meio reacional (KIPARISSIDES, 1996). A constante cinética de propagação diminui pelo fato da diminuição da mobilidade das moléculas de monômero num meio altamente viscoso, causando a redução das velocidades de reação e das massas molares médias das cadeias formadas (MACHADO; LIMA; PITO, 2003).

## 2.2 POLIESTIRENO (PS) E POLIESTIRENO EXPANSÍVEL (EPS) COMO MATERIAL PARA EMBALAGENS

No início dos anos 40 iniciou-se a produção em escala comercial de espumas de poliestireno expansível extrusado e do poliestireno expansível produzido em suspensão (GAETH, 1954; STASTNY; BUCHOLTZ, 1956; STASTNY, 1957). O processo de incorporação do agente expensor, frequentemente chamado de impregnação, pode ser conduzido após ou durante a polimerização em suspensão, ou ainda em pérolas que foram suspensas novamente em água. Uma grande variedade de líquidos de baixo ponto de ebulição pode atuar como agente de expansão, podendo ser hidrocarbonetos alifáticos como o etano, etileno, propano, propeno, buteno, isobuteno, isômeros de pentano, acetileno, hexano, heptano ou ainda misturas desses (KLODT; GOUGEON, 2003). Devido à solubilidade desses hidrocarbonetos no poliestireno eles se distribuem de forma uniforme por toda a matriz polimérica.

A expansão tem como resultado a formação de estrutura celular poliédrica fechada e irregular. A distribuição de tamanhos é regulada entre 50 e 750  $\mu\text{m}$  pelo tempo de expansão e pelo uso de agentes de nucleação, geralmente oligômeros olefinicos dissolvidos na matriz de poliestireno. A concentração do agente expensor influencia o comportamento de expansão das pérolas, sendo concentrações ideais de pentano aquelas em torno de 3 a 12 % (GAETH, 1954; STASTNY; BUCHOLTZ, 1956; STASTNY, 1957). Usualmente o processo de polimerização para produção de EPS ocorre em dois ou mais estágios. Durante o primeiro estágio, as partículas finais são formadas, e em um segundo estágio o agente de expansão é adicionado e este se difunde nas pérolas. A duração do segundo estágio é, preferencialmente, determinada pela concentração de monômero residual que necessita ser alcançado. Para ambos os estágios do processo, iniciadores com diferentes características de decomposição precisam ser aplicados no início da polimerização. Dois peróxidos são preferencialmente usados para a produção de EPS: (a) peróxido de benzoíla (BPO), para iniciar o primeiro estágio da polimerização na temperatura em torno de 90 °C na pressão atmosférica, e (b) terc-butíla peroxibenzoato, para o segundo estágio na faixa de temperatura de 115-130 °C com pressões entre 6 e 10 bar, permanecendo nesta temperatura até que a reação se complete e ocorra a impregnação dos agentes de expansão nas pérolas. Um regime clássico de tempo-temperatura para a produção de EPS usando ambos iniciadores, como apresentado na Figura 1 (BISHOP, 1971).

Figura 1 - Típico regime de tempo-temperatura para dois estágios de polimerização.



Fonte: Klodt e Gougeon (2003).

O aquecimento das pérolas de EPS aumenta a pressão do agente expensor, forçando a expansão da matriz de poliestireno. A matriz polimérica encontra-se em uma forma altamente viscosa, pois a Temperatura de Transição Vítea ( $T_g$ ) do poliestireno se situa aproximadamente em 100 °C (HATAKEYAMA; QUINN, 1999).

A faixa de interesse da distribuição de tamanho de partícula no caso do EPS está entre 300  $\mu\text{m}$  a 1300  $\mu\text{m}$  (YUAN et al., 1991). Entretanto, cada produto tem uma faixa ótima para sua aplicação final, no caso para aplicação como embalagens de alimentos o tamanho fica em torno de 700 – 1180  $\mu\text{m}$ . Dessa forma, a distribuição do tamanho de partículas adequada deve ser o mais estreita possível, situando-se dentro da faixa usual, de forma mais pronunciada na região de diâmetro adequado ao produto desejado (OLIVEIRA, 2006).

Para algumas aplicações as faixas de interesse variam. No caso do EPS seu valor deve situar-se entre 150 000 g/mol a 200 000 g/mol, pois valores acima ou abaixo dessa faixa podem prejudicar a transformação final do produto. Em razão disso, o controle dessa propriedade se faz essencial na aplicação prática de um processo de polimerização (ODIAN, 2004).

O EPS convencional contém em torno de 7% de hidrocarbonetos orgânicos voláteis como agentes de expansão, distribuídos de forma uniforme por toda a matriz polimérica devido à solubilidade do pentano em estireno e poliestir (COSTA, 2006).

As vantagens da utilização de embalagens plásticas frente às de metal e vidro, sob alguns aspectos, são inúmeras, a citar: menor custo de produção e de transporte, são mais leves, algumas têm menor propabilidade de sofrerem danos físicos, menor dispêndio de energia na fabricação, possibilidade de entrar em contato direto com o alimento sem alterar as propriedades sensoriais deste, entre outras.

Neste sentido, o PS e EPS passam a ser materiais bastante utilizados para a aplicação em embalagens para acondicionamento de alimentos, no que diz respeito à proteção do alimento contra danos mecânicos e condições ambientais adversas durante toda a cadeia de distribuição. No caso do EPS, garante a qualidade e segurança alimentar, já que evita mudanças bruscas de temperatura.

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 limite de composição residual, neste caso do estireno, é de 2500 ppm. Vale salientar que a ANVISA se

baseia em padrões estabelecidos pelo FDA para a maior parte dessas determinações.

A qualidade dos produtos alimentícios, industrializados ou não, está constantemente influenciada por fatores de natureza química, física, microbiológica ou bioquímica, durante o período de tempo decorrente entre a sua produção e o consumo final, caracterizado como vida de prateleira do alimento (ESKIN; ROBINSON, 2001).

Segundo definições clássicas de vida de prateleira, trata-se do período ou intervalo de tempo durante o qual são mantidas aceitáveis as características do produto, avaliadas pelas propriedades organolépticas, perda de valor nutritivo ou contaminação microbiológica (SINGH; TAUB, 1998). Dentre os fatores mais importantes, que caracterizam a perda de qualidade dos alimentos destaca-se o crescimento microbiano, favorecido normalmente pelas condições de manipulação (manipulador e equipamentos), estocagem e de distribuição do produto (LELIEVELD et al, 2003).

No sentido convencional, uma embalagem aumenta a segurança do alimento através de barreiras à contaminações (microbiológicas e químicas) e prevenção de migração de seus próprios componentes para o alimento (HOTCHKISS, 1995).

Tradicionalmente, os materiais de embalagens têm sido selecionados no sentido de ter mínima interação com o alimento que acondicionam, constituindo assim barreiras inertes (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; MARSH; BUGUSU, 2007). Entretanto, diversos sistemas de embalagem estão sendo desenvolvidos, e com o adendo da nanotecnologia, a inserção de nanocargas em materiais poliméricos passa a ser uma alternativa interessante em que a embalagem apresente propriedades antimicrobianas. Portanto, essas embalagens adicionadas de nanocargas podem ser planejadas para corrigir deficiências de processos na indústria de alimentos, no que tange ao impedimento da proliferação microbiológica (HAN, 2003; AZEREDO, 2009).

Neste contexto, alguns estudos (HAN, 2003; MARSH; BUGUSU, 2007; DUNCAN, 2011) apresentam a utilização da prata como agente antimicrobiano em garrafas para sucos, água, leite e vinho, e em filmes de polipropileno e polietileno para embalagem de alimentos.

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. Considerando o objetivo do nosso trabalho, esta resolução determina que íons prata podem ser utilizados somente como aditivo antimicrobiano, possuindo restrição de limite de migração específica de 0,05 mg/kg de plástico e

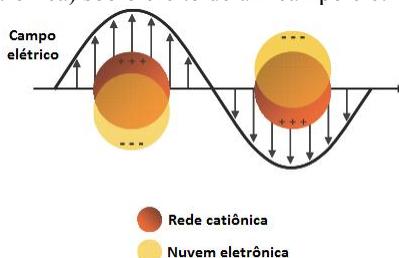
limite de composição de 3% m/m de Ag no material polimérico. Nessas condições, os alimentos que servirá de objeto de trabalho para este estudo serão os pescados *in natura*, e os padrões microbiológicos desses alimentos são estabelecidos e regulamentados pela Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA e Regulamento nº 1441/2007 de 5 de dezembro de 2007 segundo Jornal Oficial da União Européia.

### 2.3 NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A nanotecnologia é a aplicação da ciência para manipular materiais em escala atômica, a fim de criar novas estruturas de materiais, alcançando diferentes propriedades (VAIDYANATHAN et al., 2010). De uma forma geral, a nanotecnologia corresponde às tecnologias que permitem a construção de materiais ou estruturas em escala nanométrica (nm), que é, de aproximadamente 1 a 100 nm (SOLOMON et al., 2007; CARO et al., 2010; ORIAKHI, 2000).

As nanopartículas metálicas possuem a característica específica de espalhar luz com alta eficiência, devido à combinação de ambos os fenômenos de absorção e espalhamento. A interação do campo eletromagnético oscilante da luz, com as nanopartículas de metal, resulta na oscilação coletiva de elétrons de condução do metal que se encontram na superfície das nanopartículas, havendo, em consequência, absorção de radiação eletromagnética. Esse fenômeno é chamado de *plasmon*. Quando um *plasmon* é formado, ocorre uma separação de cargas elétricas na partícula em função da oscilação coletiva dos elétrons. Em outras palavras, por períodos muito curtos de tempo, os elétrons acumulam-se mais em uma região da partícula do que em outra, e tem-se a frequência da absorção plasmônica de superfície, conforme é ilustrado pela Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática de oscilação plasmônica de superfície (nuvem eletrônica) sob o efeito de um campo eletromagnético.



Fonte: Adaptado de Caro et al. (2010).

Quando ocorre a formação do *plasmon* em uma partícula, a oscilação dos elétrons tende a se deslocar além do ponto inicial, decaindo exponencialmente com a distância da superfície. Assim, o fenômeno de agregação pode ser observado através da mudança de cor das soluções coloidais de nanopartículas (CARO et al., 2010; GUZMÁN; DILLE; GODET, 2009). Se as partículas estiverem suficientemente próximas, os campos elétricos evanescentes das partículas podem interagir entre si, gerando ressonância em energia menores (comprimentos de onda maiores) levando, portanto, à mudança de cores e aparecimento de novas bandas de absorção nos espectros eletrônicos na região UV-Vis (CARO et al., 2010; LIM; LEE, 2008).

Muitos estudos tem sido realizados, na concepção de estruturas em nanoescala, utilizando como base as características da região de absorção plasmônica de superfície das nanopartículas metálicas para abrangentes aplicações (Tabela 1).

Tabela 1 – Características de absorção plasmônica de superfície e aplicações das nanopartículas metálicas.

<b>Nanopartícula metálica</b>	<b>Absorção plasmônica de superfície</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
Al/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	300-550 nm	Ópticas, Sensores, Sensores bioquímicos	AHMADIVAN D; GOLMOHAM MADI, 2015
Ag	300-700 nm	Talco antimicrobiano Semicondutores	SHAMELI ET AL., 2015 EUSTIS; EL-SAYED, 2006
CdSe	310-550 nm	Aplicações biomédicas	PARK ET AL., 2010
Au	400-1300 nm	Atividade catalítica	EUSTIS; EL-SAYED, 2006
Au	400-1000 nm	Diagnósticos de câncer Tratamento de Hipertermia	de WU; GAO; DONG, 2015 de OBAIDAT; ISSA; HAIK, 2015
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	400-1000 nm	Aplicações biomédicas	LEVIN ET AL., 2009

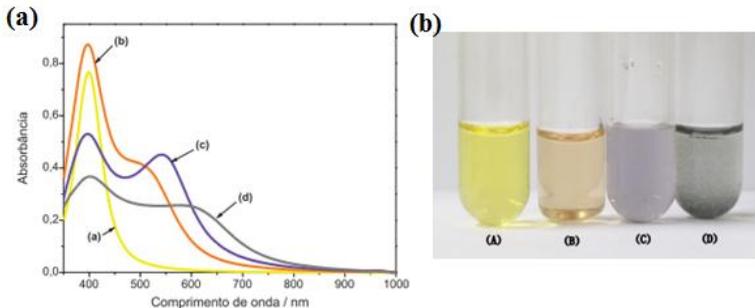
Tendo em vista que o objetivo deste trabalho é estudar a obtenção de compósitos poliméricos através do processo de polimerização em suspensão utilizando como carga as nanopartículas de prata, será, portanto, apresentado na sessão seguinte um aprofundamento maior em termos de revisão a respeito das principais características e propriedades dessas nanopartículas especificamente.

## 2.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Nanopartículas de prata (AgNP) tem tido grande atenção e emergido como principal produto do campo na nanotecnologia. O uso de nanopartículas tem ganhado impulso na atualidade pelo fato de possuírem propriedades bactericidas, químicas, ópticas e mecânicas interessantes (VAIDYANATHAN et al., 2010). Estas propriedades têm conduzido amplas aplicações de nanopartículas de prata, tais como antibacteriano têxteis e polímeros contendo nanopartículas de prata usados para fabricação de refrigeradores, lavadoras de louças, filmes plásticos, tábuas de corte, garrafas, baldes de plástico e vasilhames (GUZMÁN; DILLE; GODET, 2009; ZIELINSKA et al., 2009).

A banda de absorção plasmônica de superfície de nanopartículas de prata é diretamente afetada pelo tamanho e pela forma das nanopartículas. Um exemplo na mudança de propriedades dos nanomateriais está apresentado na Figura 3, mostrando mudanças nas densidades ópticas de soluções coloidais de acordo com os diferentes diâmetros das nanopartículas de prata presentes no meio (MELO JR. et al., 2012; SOLOMON et al., 2007). Durante a reação de redução da prata, pode-se observar a mudança de coloração da solução incolor de nitrato de prata para amarelo pela formação de AgNP. O estado de agregação das nanopartículas pode ser determinado pela análise da coloração dos colóides. Pequenos agregados produzem mudanças desta coloração que podem variar de amarelado, passando por laranja, violáceo e até elevados estados de agregação, com coloração acinzentada (SOLOMON et al., 2007).

Figura 3 - Dispersões coloidais de nanopartículas de prata. (a) espectros com diferentes densidades ópticas e (b) aspecto visual correspondente aos espectros.



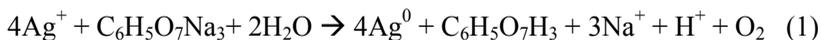
Fonte: Melo Jr. et al. (2012).

Kapoor (1998), ao sintetizar nanopartículas de prata utilizando método de redução química por borohidreto e por fóton-redução, relatou em seu trabalho e por fundamentação teórica, que o espectro de absorção UV é muito sensível à formação de agregados. Trocas no pico de absorção plasmônica de superfície à longos comprimentos de onda reflete a presença de partículas maiores. A agregação de partículas coloidais de prata causa um decréscimo na intensidade do pico de absorção plasmônica de superfície.

### 2.4.1 Rotas de síntese

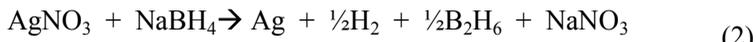
Vários métodos são usados para preparar nanopartículas de prata, incluindo redução química de sais de prata em solução aquosa por citrato (GUZMÁN; DILLE; GODET, 2009), borohidreto (ZIELINSKA et al., 2009) e outros agentes redutores (NASSAR; YOUSSEF, 2012; VAIDYANATHAN, 2010), com ou sem agentes estabilizantes (GUZMÁN; DILLE; GODET, 2009; ZIELINSKA et al., 2009; SONDI; GOIA; MATIJEVIC, 2003).

A reação de síntese de nanopartículas de prata a partir do citrato de sódio (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951) é apresentada na equação (1).



A redução química do nitrato de prata por borohidreto de sódio para obtenção de AgNP é apresentada nas equações (2) e (3). A redução geralmente é realizada sob refrigeração ou próxima à temperatura de

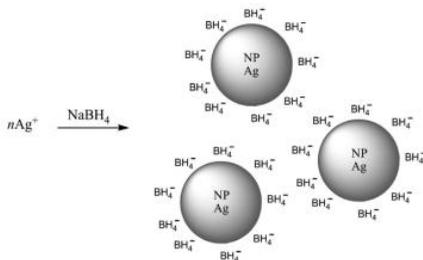
congelamento da água e dependendo do tempo de reação obtém-se partículas de até 12 nm de diâmetro em média (WOJTYSIAK; KUDELSKI, 2012; SOLOMON et al., 2007).



Agentes fortemente redutores como o borohidreto de sódio, induzem a formação de centros de nucleação que crescem formando pequenos *clusters*, cujo tamanho final, depende do agente redutor e do valor de R ( $R = n^\circ \text{ total de mols de BH}_4^- / n^\circ \text{ total de mols de Ag}^+$ ). Além de redutor, o borohidreto possui um efeito estabilizador, que é devido à carga elétrica conferida às nanopartículas pela absorção de íons dos sais utilizados (Figura 4) (WOJTYSIAK; KUDELSKI, 2012; SOLOMON et al., 2007). No caso da prata, a reação de redução pode ser muito intensa, e o agente protetor disperso não agiria em tempo o suficiente para recobrir cada partícula, de forma que os tamanhos resultantes das mesmas possivelmente aumentariam. Este aumento no tamanho das AgNP, pode ser o resultado de efeitos de aglomeração, e, portanto, a utilização de mais um agente estabilizante em solução se faz necessário (CHOU; CHANG; CHIU, 2012).

As nanopartículas de prata obtidas pelo método do borohidreto de sódio apresentam tamanhos entre 5 a 20 nm de diâmetro que podem ser caracterizadas por espectroscopia de absorção UV-Vis, apresentando absorção na faixa de 380-400 nm (SONG et al., 2009). Tanto a redução química dos sais de prata, em especial, o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), quanto o estado de agregação das nanopartículas variam com a troca do agente redutor, com as quantidades relativas do mesmo e as concentrações de reagentes, temperatura, duração da reação, etc. Adicionalmente o diâmetro das nanopartículas de prata resultantes da síntese também dependem dessas condições (SONG et al., 2009; SOLOMON et al., 2007).

Figura 4 - Nanopartículas de prata separadas por forças repulsivas com borohidreto adsorvido.



Fonte: Solomon et al. (2007).

#### 2.4.2 Estudos de estabilidade

O estudo das nanopartículas leva à necessidade da compreensão das propriedades superficiais das mesmas, pois devido ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas são instáveis por apresentarem altos valores de energia superficial. Durante a síntese, as partículas tendem a se aglomerar e crescer, ocorrendo a diminuição na energia total do sistema. A partir daí, as nanopartículas devem ser estabilizadas, e tal estabilidade pode ser alcançada por meio de interação eletrostática, devido a estabilização a partir de cargas na superfície das nanopartículas. A carga da superfície na fase dispersa pode ser aumentada pela adição de um surfactante iônico, que proporciona uma proteção eletrostática das nanopartículas para uma não aderir a outra. As nanopartículas também podem ser estabilizadas por meio da interação estérica, que ocorre devido à presença de moléculas grandes ligadas à superfície das nanopartículas, por exemplo, polímeros e surfactantes não iônicos (EL-SHISHTAWY; ASIRI; AL-OTAIBI, 2011; KVÍTEK et al., 2008).

Experimentos têm sido realizados para estudar o fenômeno de superfície que permite aos pesquisadores determinar mecanismos da interação adsorvido-adsorvente. Para prata é interessante investigar as propriedades ópticas e as propriedades de estabilizantes adsorvidos nas nanopartículas através da absorção na região visível devido ao efeito plasmônico de superfície (KAPOOR, 1998).

Patakfalvi, Virányi e Dékány (2004) estudaram a cinética de formação das nanopartículas de prata com citrato de sódio como agente redutor em presença de dois estabilizantes poliméricos, Poli (vinil álcool) (PVA) e Poli (vinil pirrolidona) (PVP), nas concentrações de 0,7 a 5 g/L através dos espectros UV-Visível e Microscopia Eletrônica. Em

altas concentrações de PVA (3 g/L), apesar das cadeias de polímeros permanecerem ao redor das partículas de  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Ag}^0$  e, estericamente inibir a nucleação e crescimento de partículas, o espectro apresentou-se não simétrico indicando a presença de partículas agregadas. Os espectros de absorvância das nanopartículas de prata contendo PVP como estabilizante, revelaram que o aumento na concentração deste polímero tem efeito negativo na taxa de formação das partículas de prata, do que quando se utiliza o PVA. Aumentando a concentração de PVP, diminui-se a taxa de formação das partículas e o tempo de reação aumenta. Neste caso, concentrações de 1,9 e 5 g/L também possibilitaram a formação de agregados. Quando utilizou-se PVA, as AgNP foram formadas mais rapidamente que na presença de PVP. Por exemplo, a formação de partículas terminou em cerca de 16 minutos utilizando PVA, mas necessitou de 26 minutos na presença de PVP, fato que confirmou que altas concentrações de polímeros estabilizantes diminuem a taxa de nucleação. Em contrapartida, ocorre a diminuição do tamanho da partícula e a distribuição de tamanho se torna mais monodispersa.

A escolha do estabilizante é crítica, pois essa escolha determina a estabilidade, solubilidade, reatividade e, até mesmo, o tamanho e forma das nanopartículas durante a síntese (BALAN et al., 2007).

Prathna, Chandrasekaran e Mukherjee (2011) estudaram diferentes sínteses de nanopartículas coloidais nas quais usaram citrato de sódio como agente estabilizante. Neste caso, a tendência de aglomeração para as nanopartículas recobertas por íons citrato foi diminuída. Wojtysiak e Kudelski (2012) também utilizaram citrato como estabilizante em síntese por redução química de nitrato de prata por borohidreto de sódio e observaram que os sais de prata ficaram mais estáveis durante a redução dos íons prata com borohidreto a temperatura ambiente, quando a concentração dos íons citrato estavam na faixa de 0,5-5 mM.

Tillmann (2004) investigou a estabilidade de nanopartículas de prata nos meios aquosos e orgânicos utilizando seis diferentes estabilizantes, tais como, ácido fórmico, dodecilsulfato de sódio, etilenoglicol, entre outros. A variação de pH foi estudada em pHs de 3 e 11. Os autores observaram que o meio com ausência de estabilizantes foi susceptível à formação de prata iônica precipitada nas paredes do recipiente, fato que possibilitou a comparação dos efeitos dos estabilizantes utilizados. Dentre os mais adequados, o dodecilsulfato de sódio e etilenoglicol se mostraram os melhores agentes estabilizantes.

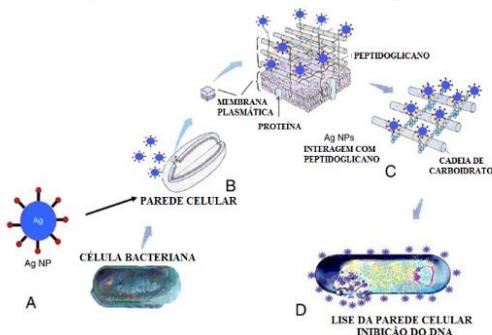
### 2.4.3 Propriedades bactericidas e mecanismo de ação

A prata e seus compostos têm sido utilizados há muito tempo como agentes antimicrobianos. Seus efeitos são conhecidos desde 1000 a.C.. Mesmo antes desta época, vasos de prata e cobre já eram utilizados para conservar a potabilidade da água (RUSSEL; HUGO, 1994). Além da prata, muitos outros metais foram estudados, resultando na seguinte escala de toxicidade contra microrganismos: Ag>Hg>Cu>Cd>Pb>Co>Au>Zn>Fe>Mn>Mo>Sn (NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008).

Dibrov et al. (2002) apud DUNCAN (2011) apresentaram evidências que os íons de prata ao atravessar a membrana bacteriana e penetrar o interior das células, interferem na atividade ribossômica e interrompem a produção de enzimas responsáveis pela produção de energia na célula. Possivelmente, este mecanismo ocorre pela interação das nanopartículas de prata com os grupos -SH das proteínas. Com ação similar aos agentes antimicrobianos comumente classificados como sulfonamidas. Tais proteínas projetam-se através da membrana celular bacteriana, permitindo o transporte dos nutrientes através da parede celular. Íons monovalentes de prata ( $Ag^+$ ) substituem o cátion hidrogênio ( $H^+$ ) de grupos (-SH) ou grupos tióis, inativando a proteína e assim, diminuindo a permeabilidade da membrana, que pode causar eventualmente a morte celular (FENG et al., 2000).

Outro mecanismo para a morte celular bacteriana seria o proposto por Mastsumure et al. (2003 apud MORONES et al. (2005)), em relação à interação nas nanopartículas com o fósforo presente no DNA, resultando na inativação das replicações. Fabrega et al. (2009) estudaram a geração de espécies reativas de oxigênio por nanopartículas de prata dentro das células bacterianas, e a geração desses radicais livres induzem o estresse oxidativo celular. Na Figura 5 é apresentado o esquema dos mecanismos de atuação das nanopartículas de prata e íons prata no combate aos microorganismos.

Figura 5. Esquema ilustrativo do mecanismo de atuação das nanopartículas de prata e íons de prata no combate aos microorganismos.



Fonte: Adaptado de Fayaz et al., 2010.

Davies e Etris (1997) demonstram que somente células contendo grupos (-SH) na superfície foram afetadas pela prata. Isso possivelmente explicaria, a razão pela qual somente as bactérias e os vírus são afetados pelos íons prata, contrariamente ao que ocorre às células de organismos eucariontes. Essas células por não apresentarem grupos (-SH) expostos na superfície celular, não são afetadas pelas AgNP. Portanto, as AgNP não são capazes de permear através das membranas celulares na ausência de grupos -SH, tornando a prata relativamente atóxica aos seres humanos e aos animais (DUNCAN 2011; CHALOUKKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010; DURAN et al., 2007; DAVIES; ETRIS, 1997).

A possibilidade da formação de radicais livres estarem envolvidos na atividade antibacteriana das AgNP também foi estudada por Soo-Hwan et al. (2011). Estes autores avaliaram também a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da leitura espectrofotométrica da intensidade de fluorescência com o intuito de comprovar a relação entre a atividade antibacteriana das AgNP com a formação de radicais livres. Neste sentido, os radicais livres gerados pelas AgNP induzem o dano celular na membrana bacteriana. Sob tais condições, altos níveis de ROS podem aumentar o estresse oxidativo nas células. Estresse oxidativo pode não somente causar dano na membrana celular, mas também pode causar dano nas proteínas, DNA, e sistema intracelular tal como o sistema respiratório. Depois de 3h de incubação, das soluções de AgNP com as bactérias *S.aureus* e *E.coli*, os autores puderam observar o aumento da ROS. Assim, podendo indicar que as AgNP podem formar ROS com água, e então, a membrana celular

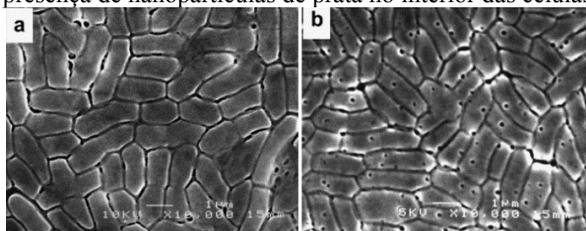
bacteriana, estrutura protéica e sistema intracelular pode ser danificado devido a formação de ROS pelas AgNP. A formação de ROS pelas AgNP inibiram a lactato desidrogenase, que é a enzima responsável pela respiração celular. E neste caso, as AgNP causam a inibição do crescimento bacteriano e reprodução. Após 6h de incubação, a perda de proteína celular foi significativa quando em contato com as AgNP, na qual os autores afirmaram que as nanopartículas podem aumentar a permeabilidade da membrana celular bacteriana. No entanto, a sensibilidade da membrana de *S.aureus* em relação à *E.coli* é menor. Esta diferença pode ser atribuída justamente à espessura da camada de peptídeoglicano da bactéria, que em *S.aureus* é mais espessa. Kim et al. (2007) avaliaram o efeito de AgNP com tamanho médio de  $13,4 \pm 2,6$  nm em diluições com concentrações variando de 0,2 a 33 mM, na atividade bactericida contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados do estudo sugerem que os efeitos das nanopartículas de prata devem estar associados com as características de certas espécies de bactérias. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tem diferenças na estrutura da parede celular, e à espessura da camada de peptídeoglicano. Nas bactérias gram-positivas a camada de peptídeoglicano é espessa e o transporte dos íons de prata é mais lento (DUNCAN, 2011; FENG et al., 2000). E portanto, esses autores abordam que, por esta razão, as nanopartículas de prata apresentaram menor eficiência contra *S. aureus* que contra *E.coli*, uma bactéria gram-negativa. Soo-Hwan et al. (2011) relatam que a camada de peptídeoglicano das bactérias Gram-negativas é cerca de poucos nanômetros de espessura, enquanto a das Gram-positivas possuem cerca de 30 a 100 nm e contém muitas camadas, as quais podem proteger em maior intensidade as células bacterianas contra a formação de ROS pelas AgNP.

Sondi; Salopek-Sondi (2004), demonstraram a existência de prata na membrana de *E. coli*. Como apresentado na Figura 6, além de confirmar a penetração de nanopartículas de prata na membrana celular da bactéria, e esta é uma explanação para o possível mecanismo do efeito antimicroniano, pois provavelmente há a interação das nanopartículas com os componentes internos da célula. E durante o tratamento das células com nanopartículas de prata há a degradação da estrutura da membrana da *E. coli* com o aparecimento de cavidades. Li et al. (2010) também demonstraram que as AgNPs causam rupturas na membrana externa de Gram-negativas na forma de cavidades.

Kim et al. (2007) apresenta que o tamanho reduzido das partículas dos materiais é uma ferramenta segura e eficiente para melhorar a biocompatibilidade e a atividade biocida desses materiais. Na

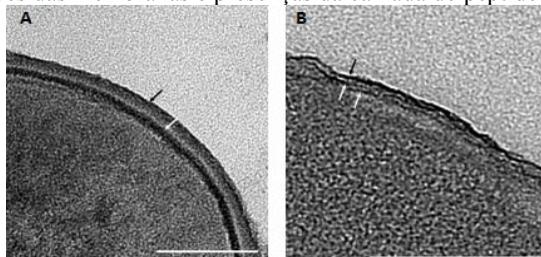
síntese realizada por esses autores usando nitrato de prata como precursor e borohidreto de prata como agente redutor, sem estabilizantes, a solução final apresentou a concentração de 3 mM de nanopartículas de prata a qual foi concentrada 10 vezes usando um evaporador rotatório a vácuo. Obteve-se um tamanho médio das nanopartículas de prata de  $13,4 \pm 2,6$  nm e as diluições com concentrações variando de 0,2 a 33 mM foram usadas para os testes de atividade biocida com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados do estudo sugerem que os efeitos antimicrobianos das nanopartículas de prata devem estar associados com as características de certas espécies de bactérias. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tem diferenças na estrutura da membrana, a qual está relacionada à espessura da camada peptidoglicano, do que nas bactérias gram-positivas esta é espessa e o transporte dos íons de prata é mais lento, como pode ser observado nas micrografias da Figura 7 (DUNCAN, 2011; FENG et al., 2000). E portanto, esses autores abordam que por esta razão as nanopartículas apresentaram menor eficiência contra *Staphylococcus aureus*.

Figura 6 - Microscopia eletrônica de células nativas de *E. coli*. (a) células tratadas com  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  de AgNP em meio líquido por 4h (b) indicando a presença de nanopartículas de prata no interior das células.



Fonte: Jung et al., 2008.

Figura 7 - Estruturas internas de (a) *S. aureus* e (b) *E. coli* observadas por TEM. Indicações das membranas e presenças da camada de peptidoglicano.



Fonte: Jung et al., 2008.

A atividade bactericida das nanopartículas é influenciada pelo seu tamanho e pela hidrofobicidade da matriz (DUNCAN, 2011). Assim, nanopartículas com tamanho reduzido e sem agregação são preferíveis nessa aplicação, permitindo assim que uma maior superfície de contato e consequentemente uma efetiva ação contra as bactérias (DALLAS; SHARMA; ZBORIL, 2011; MORONES et al., 2005). Outro fator que influencia a atividade bactericida é a forma das nanopartículas de prata, como investigado por Pal, Tak e Song (2007). Neste contexto, a inibição do crescimento de *E. coli* em placas com ágar nutriente por nanopartículas esféricas foi observada num conteúdo de 6 µg de prata sólida. Enquanto, para nanopartículas triangulares, uma concentração de 10 µg de prata sólida foi necessária para conduzir a inibição do crescimento bacteriano.

Soo-Hwan et al. (2011) ao estudarem a atividade bacteriana de nanopartículas de prata sólidas para *S. aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa), avaliaram a concentração mínima inibitória das nanopartículas para estes microrganismos usando o método por contagem em placa. A avaliação do crescimento das células bacterianas foi realizada sob diferentes concentrações de AgNPs. A contagem média de células foi de 10<sup>5</sup> UFC/mL e as concentrações finais de AgNP foram 0, 50, 100, 150, 250 e 500 µg/mL. A atividade antibacteriana das AgNP foi identificada durante 8h, com a utilização das concentrações de 100 e 150 µg/mL da AgNP, as quais inibiram o crescimento de ambos *S. aureus* e *E. coli*. Entretanto, a inibição do crescimento foi mais rápida para *E. coli*.

Mathew e Kuriakose (2013) investigaram a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata encapsuladas por albumina de soro bovina (biopolímero) através do método por difusão em disco para *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. As zonas de inibição das AgNP medidas para cada bactéria estudada são apresentadas na Tabela 2. Tais resultados confirmaram a eficiência das nanopartículas de prata encapsuladas por biopolímero através da atividade antimicrobiana apresentada para várias bactérias.

Tabela 2 - Medidas das zonas de inibição das AgNP segundo estudo de Mathew e Kuriakose (2013)

Bactérias	Zona de inibição (mm)
<i>S. aureus</i>	26
<i>S. marcescens</i>	25
<i>P. aeruginosa</i>	25
<i>E.coli</i>	24
<i>K. pneumoniae</i>	24

A medida das zonas de inibição do crescimento microbiano também foram utilizadas como indicativo para atividade antimicrobiana no estudo de Vimala et al. (2009) sintetizaram nanopartículas de prata em semi-hidrogel de poliacrilamida e carboidratos (goma acacia, carboximetilcelulose e amido) para aplicações antimicrobianas (biomédicas e farmacêuticas). A atividade antimicrobiana do material estudado foi avaliada tomando como base a zona de inibição do material em contato com a bactéria *E.coli*. As áreas de inibição do material impregnado com prata e estabilizado com carboidratos seguiu a seguinte ordem: semi-hidrogel com goma acacia (1,8 cm) > semi-hidrogel com carboximetilcelulose (1,6 cm) > semi-hidrogel com amido (1,5 cm).

Os efeitos antimicrobianos das nanopartículas de prata foram estudados por Kim et al. (2007) contra leveduras (isoladas de mastite bovina), *E. coli* O157:H7 (ATCC 43886) e *S.aureus* (ATCC 19636) utilizando o método modificado por difusão em ágar e concentrações de 0,2 a 33 nM de AgNP, a fim de avaliar a concentração mínima inibitória (MIC) para cada microrganismo. Os resultados de MIC para leveduras ficou estimado entre as concentrações de 6,6 – 13,2 nM, para a *E.coli* pode ser estimado entre 3,3 – 6,6 nM e para a *S.aureus* a MIC foi estimada para concentrações maiores que 33 nM. Além disso, não ocorreu nenhuma inibição para a solução chamada de controle veículo, aquela constituída por prata sem estar na forma de nanopartículas. E, portanto, o efeito de inibição do crescimento pode ser atribuído diretamente à prata na forma de nanopartículas pois essas inibiram efetivamente o crescimento bacteriano. Em se tratando do *S. aureus*, o efeito inibitório das nanopartículas de prata foi menor que comparado com as demais bactérias estudadas neste trabalho. Os autores apresentam que o efeito antimicrobiano das nanopartículas de prata está associado à espécie das bactérias, em se tratando da espessura da membrana citoplasmática, como já apresentado pelo estudo de Jung et al. (2008). Os autores concluíram então que as nanopartículas de prata são efetivas na redução do crescimento bacteriano e, portanto,

promissores agentes antimicrobianos, e sugerem a aplicação para dispositivos médicos e sistemas antimicrobianos.

As nanopartículas de prata foram testadas para quatro bactérias gram-negativas: *E.coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa* e *S.typhus* no estudo de Morrones et al. (2005), em diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O efeito das AgNP no crescimento bacteriano variou para cada bactéria, e os resultados demonstraram que a concentração inibitória da prata foi diferente para as espécies de bactérias estudadas. No entanto, concentrações superiores a 75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  inibiram significativamente o crescimento de todas as bactérias.

Neste contexto, é notável a quantidade de estudos realizados sobre as propriedades antimicrobianas de nanopartículas de prata. Dessa forma, serão descritos a seguir os trabalhos relevantes que sintetizam materiais poliméricos antimicrobianos a partir da incorporação de AgNPs em PS. Tais trabalhos serviram de base para o desenvolvimento desta tese já que na literatura não há estudos sobre a incorporação de nanopartículas de prata em EPS e suas propriedades antimicrobianas.

Wang et al. (2008) sintetizaram nanocompósito de Ag/PS através de polimerização em emulsão do estireno contendo nanopartículas de prata *in situ*. As nanopartículas foram sintetizadas por reversa microemulsão usando o nitrato de prata em água, o citrato de sódio foi utilizado como agente redutor, o estireno na fase óleo, dodecil sulfato de sódio (SDS) utilizado como emulsificante, e isopentanol como coemulsificante. Foram preparadas duas microemulsões, uma composta pela solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (0,2M) e, outra, composta por citrato de sódio (0,4M), as quais foram misturadas em 0,86 M e 1M SDS/estireno, respectivamente. A concentração global de  $\text{AgNO}_3$  e citrato de sódio foram  $8,8.10^{-5}$  M e  $2.10^{-4}$  M, respectivamente. A microemulsão contendo citrato de sódio foi adicionada por gotejamento na microemulsão contendo nitrato de prata sob constante agitação magnética e a 30 °C por 2h, obtendo-se a microemulsão contendo as nanopartículas de prata. A obtenção das partículas do nanocompósito Ag/PS foi realizada em duas etapas, na primeira etapa 30 mL da solução de prata foi dispersada em 60 mL de água destilada com agitação ultrassônica por 30 minutos para obter uma suspensão uniforme. Na segunda etapa, 1g de PVP foi usado como agente de estabilizante e adicionado na mistura sob constante agitação. Em seguida, nitrogênio foi borbulhado no meio reacional por 30 minutos, a mistura reacional foi colocada em um balão de vidro de três entradas e 0,1 g de KPS (iniciador) foi adicionado quando a temperatura do sistema atingiu 70

°C, água refrigerada foi circulada para manter a temperatura do sistema reacional e a purga de N<sub>2</sub> foi mantida. As partículas de compósito polimerizadas foram depositadas com cloreto de sódio e lavadas várias vezes com água deionizada, e em etanol por 5h. Finalmente, as partículas do compósito foram secadas à vácuo em 60 °C por 48h. Como resultados, a polimerização em emulsão do estireno na presença de AgNP tem maior conversão que atingiu cerca de 90% em 3,0 h, e a taxa de polimerização pode chegar ao máximo em 26 min. A polimerização na presença de AgNP apresentou-se como um sistema não homogêneo no início da reação, as quais podem se tornam centros de nucleação. Assim, a polimerização de estireno na presença de AgNP é semelhante à polimerização em emulsão por semente. Segundo os autores, neste processo de polimerização, o monômero e a taxa de conversão são mais elevados do que aqueles de polimerização em emulsão típica. As partículas exibiram uma forma esférica regular homogeneamente distribuídas. A distribuição de tamanho das AgNPs foi estreita e o diâmetro médio das nanopartículas foi de 5,9 nm. O diâmetro médio das partículas do compósito Ag/OS foi de 12,6 nm e a prata não foi detectada na superfície das pérolas de poliestireno. Estas observações podem conduzir a conclusão de que as AgNP são encapsuladas nas partículas de PS no decorrer do processo de polimerização em suspensão e a espessura da camada de poliestireno é de cerca de 2-6 nm. Neste estudo, portanto, a preparação das partículas do compósito ocorreu a partir de duas aborgagens: 1) síntese de AgNP pela redução de AgNO<sub>3</sub> por citrato de sódio via microemulsão inversa; 2) preparação da encapsulação das AgNP em PS através de polimerização do estireno por emulsão na presença de AgNP.

An et al. (2009) desenvolveram um método de síntese de prata usando citrato de sódio como agente redutor em líquido iônico 1-n-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato ([BMIM·BF<sub>4</sub>] sob algumas condições controladas, além da obtenção de nanopartículas de prata em poliestireno na forma casca-núcleo. A metodologia empregada consistiu em dispersar nanopartículas de prata e estireno foram dispersados diretamente em meio de [BMIM·BF<sub>4</sub>-etanol (5/2 v/v) para formar uma suspensão ordinária, então a polimerização com poli(vinil pirrolidona)(PVP) como estabilizante e 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador foi realizada para preparar poliestireno com nanopartículas de prata na forma de casca-núcleo. Foram investigados e discutidos as estruturas, atividade e mecanismos antimicrobianos das nanopartículas de prata e do Ag/PS. As nanopartículas de prata foram sintetizadas em líquido iônico BMIM·BF<sub>4</sub>, e, portanto, foram preparadas

as soluções de nitrato de prata em  $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$  com uma concentração de 0,03 mol/L e de citrato de sódio também em  $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$  com a concentração de 0,033 mol/L. Primeiramente, a solução de citrato de sódio foi adicionado gota a gota sobre a solução de  $\text{AgNO}_3$  sob agitação vigorosa a 30 °C por 0,5 h. A solução ficou em agitação constante por 3h. Em seguida, ajustado o pH para 8,0 com amônia, foi obtido um colóide marrom contendo nanopartículas de prata. Para posterior caracterização, os colóides de prata foram separados por centrifugação, lavados com etanol absolute por diversas vezes, e secados à vácuo a 60 °C por 48h. Para a obtenção de nanopartículas casca-núcleo de Ag/PS, utilizou-se o líquido iônico ( $\text{BMIM}\cdot\text{BF}_4$ ) em solvente alcoólico (5/2, v/v). 4 mL de estireno e 0,2g de PVP foram dissolvidos em 24 mL de etanol absolute para formar uma solução transparente, então 60 mL de solução de AgNP foram adicionados e dispersados por vibrações ultrassônicas por 30 minutos para obter uma suspensão homogênea. Depois de borbulhar nitrogênio por 30 minutos, 0,1g de AIBN foram adicionados e a polimerização por deposição foi conduzida em 60 °C. Finalmente, as nanopartículas casca-núcleo foram lavadas com água deionizada, deixadas em methanol por 1h, filtradas e secadas à vácuo a 40 °C por 48h. O ensaio de viabilidade celular foi realizado para avaliar o efeito antimicrobiano das nanopartículas de prata e partículas de Ag/PS casca-núcleo sob as bactérias *E. coli* (ATCC 44752) e *S. aureus* (ATCC 26003). As suspensões das bactérias foram preparadas adicionando 10  $\mu\text{L}$  da diluição da bactéria em 1 mL de caldo Luria-Bertani (cada tipo de célula bacteriana é cerca de  $10^9$  CFU/mL). 100  $\mu\text{L}$  das suspensões bacterianas e uma certa quantidade de nanopartículas foram misturadas em tubo teste contendo 10 mL de caldo Luria-Bertani. A ordem de diluição da bactéria neste estágio foi de  $10^{-2}$ . Para a solução diluída, foram preparadas diluições em série de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ . A perda de viabilidade das bactérias estudadas foram determinadas pela contagem viável em ágar Luria-Bertani depois da diluição seriada das misturas de suspensões. 10  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$  das soluções foram colhidas e espalhadas em placas com ágar Luria-Bertani. Todas as placas foram incubadas a 37°C de 0 a 24 h. O mesmo procedimento foi conduzido para as nanopartículas casca-núcleo de Ag/PS. Como resultados, as nanopartículas de prata e as nanopartículas casca-núcleo Ag/PS foram distribuídas homogeneamente e exibiram esferas regulares com os tamanhos em cerca de 5-15 nm e 15-25 nm, respectivamente. A inativação bacteriana ou ação germicida das nanopartículas de prata e Ag/PS foi observada com uma concentração de células bacterianas de  $10^5$  CFU/mL. Os autores apresentam que as nanopartículas de prata

apresentaram maior inibição se comparadas com as nanopartículas casca-núcleo Ag/PS. Isto ocorreu nas primeiras 16h do teste, a partir deste tempo a atividade antimicrobiana das nanopartículas casca-núcleo Ag/PS foi gradualmente aumentando até reagir a níveis similares às nanopartículas de prata em cerca de 24 h. A concentração efetiva de prata no nanocompósito que inibiu completamente o crescimento de *E.coli* foi de  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sendo que tal concentração permitiu uma inibição parcial de *S. aureus*. Esses resultados, segundo os autores, sugerem que os efeitos antimicrobianos de nanopartículas de Ag podem estar associados com as características de certas espécies bacterianas. Porque a camada de peptidoglicano das bactérias gram-negativas (*E. coli*) é mais fina do que a das bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e portanto, as nanopartículas de prata podem penetrar a membrana celular de *E. coli* mais facilmente e inibi-la de modo mais eficiente. E finalmente, os autores indicam que as nanopartículas casca-núcleo preparadas são materiais antimicrobianos de liberação controlada para potenciais aplicações biológicas e farmacêuticas.

A encapsulação de nanopartículas de prata em microesferas de poliestireno foi estudada por Kumbhar e Chumanov (2009). Esta abordagem envolve a estruturação de uma camada de PS que envolve um núcleo inorgânico, aonde se encontram as nanopartículas de prata. Para tanto, a polimerização em emulsão é uma das técnicas utilizadas para preparar tais híbridos. No entanto, os autores apresentam um novo método para a encapsulação das nanopartículas de prata, o qual se refere à utilização de acetona como agente de inchamento das microesferas de PS e a síntese de AgNP na presença de tais microesferas. A síntese das nanopartículas de prata envolve a redução de uma solução aquosa saturada de óxido de prata(I) por uma atmosfera ultrapura de hidrogênio a 10 psi a uma temperatura de 70 °C. O hidrogênio gasoso reduz o óxido de prata (I) para formar pequenas sementes seguido por crescimento lento e uniforme ao longo dos eixos cristalográficos, resultando em uma distribuição de tamanho estreita. A duração da síntese foi de 3 horas para a obtenção de partículas de prata na faixa de 70-80 nm. Este mesmo procedimento foi aplicado pelos autores para a síntese de nanopartículas de prata na presença de 0,5 mL de microesferas de PS (~ 200 nm). A solução da reação foi centrifugada em tubos de vidro para remover o óxido de prata (I) que não reagiu na suspensão. Cerca de 100 µL de acetona foi adicionado à 2 mL da mistura de reação centrifugada. O precipitado de AgNP e microesferas de PS em acetona foram submetidos à sonicação que resultou na formação e dispersão das partículas compostas por Ag-PS. Instantaneamente uma troca de

coloração foi observada a qual foi associada com a formação da nanoestrutura em casca-núcleo. A encapsulação das AgNP nas microesferas foi observada por microscopia eletrônica de varredura. Os autores comentam que o mecanismo para a encapsulação nas nanopartículas de prata nas microesferas de PS ainda não está claro, mas apresentem um possível entendimento do que ocorre. Sabe-se que as microesferas de PS podem ser inchadas quando dispersadas em solventes como tolueno e acetona e podem formar esferas ocas com orifícios superficiais controláveis quando tais solventes são evaporados. Este fato indica que o inchamento das microesferas de PS com acetona é um importante passo para conduzir a encapsulação de AgNP. A principal questão relaciona-se com a força motriz que faz com que o polímero encapsule as AgNP ou, por outras palavras, faz com que as nanopartículas penetrem no interior das microesferas PS. A acetona atua como um plastificante, e o inchamento das microesferas aumenta a flexibilidade das cadeias poliméricas. Este inchaço permite que os anéis de benzeno se adaptem a uma configuração mais favorável à interação com a superfície metálica. A presença de acetona no interior das microsferas (inchadas) de PS no ambiente circundante também reduz a energia livre da superfície do polímero em ambas as interfaces, assim pode promover a maior penetração das AgNP nas microesferas.

Paula et al. (2009) incorporaram nanopartículas de prata no copolímero de poli(estireno-co-ácido-acrílico) para avaliar a atividade antibacteriana deste material. A obtenção das nanopartículas de prata se deu pela redução química de uma solução aquosa de nitrato de prata com uma solução aquosa de borohidreto de sódio com citrato de sódio como estabilizante. As AgNP obtidas apresentaram a banda de ressonância plasmônica em 445 nm. O copolímero poli(estireno-co-ácido-acrílico) foi sintetizado na fração de 9:1 estireno/ácido acrílico em massa via polimerização por radicais livres usando peróxido de benzoíla como iniciador. A reação foi realizada em 110 °C sob atmosfera inerte por 2h. O produto obtido foi dissolvido em acetona, precipitado em metanol, coletado, filtrado e seco à vácuo a 70 °C por 24 h. Foram preparadas duas amostras de polímero contendo nanopartículas de prata em diferentes concentrações (25 e 50 ppm) sob vigorosa agitação por 1 h. O produto resultante foi derramado em placa de Petri para completa evaporação do solvente a temperatura ambiente para obter um filme polimérico. A concentração final de prata no copolímero, foi medida por espectroscopia de absorção atômica, e foram de 0,61 e 1,22 ppm, respectivamente. O método de difusão em disco foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana dos copolímeros impregnados com

AgNPs contra *S. aureus* (ATCC 6538) e *E.coli* (ATCC 25922). Os meios Mueller-Hinton e MacConkey foram usados para as culturas bacterianas, respectivamente. A atividade antimicrobiana foi confirmada pela presença de um halo de inibição, o qual foi proporcional ao aumento da concentração de nanopartículas de prata na matriz polimérica. Este resultado provou ser importante para a prevenção da aderência e proliferação das bactérias estudadas na superfície do material.

Betancourt-Galindo et al. (2012) encapsularam nanopartículas de prata em matriz de poliestireno usando o processo de polimerização por miniemulsão. Utilizaram como iniciador o 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN) e como surfactante o brometo de cetil metil amônio (CTAB). A atividade antimicrobiana foi estudada para as bactérias *E.coli* e *S.aureus*. As nanopartículas de prata utilizadas no estudo eram amostras comerciais com tamanho de partícula menor que 30 nm (99,5% de pureza) e sofreram modificação de superfície usando uma razão em massa de 1:0,5 de AgNP e 3-aminopropiltrimetoxo silano (APTMS). A reação de modificação da superfície da AgNP foi realizada sob refluxo a 80°C, onde AgNP e APTMS foram misturados em octano por 6h. A solução foi separada por decantação, e os sólidos foram secados *overnight* a 80°C para subseqüentes caracterizações. As nanopartículas de prata foram encapsuladas por polimerização em miniemulsão usando hexadecano (HD) como coestabilizante e variando a quantidade de surfactante e iniciador. O iniciador foi aplicado nas concentrações de 0,7 e 2,5 g/L. A polimerização foi realizada em reator de vidro de 100 mL; uma solução micelar de surfactant/água (CTAB/H<sub>2</sub>O) foi preparada por agitação durante 30 minutos. A mistura de iniciador, AgNP modificadas e monômero de estireno foi dispersado usando ultrassom por 3 minutos e então, a mistura foi adicionada no reator de vidro. A solução foi sonicada por 2 minutos a fim de alcançar uma miniemulsão estável e melhor dispersão das AgNPs. A reação de polimerização foi conduzida sob atmosfera de N<sub>2</sub> a 80°C e 430 rpm de agitação. Ácido metacrílico foi adicionado para melhorar a estabilidade e compatibilidade da solução. As propriedades antimicrobianas dos nanocompósitos de poliestireno e nanopartículas de prata foram testadas contra as cepas de *E.coli* e *S.aureus*. O teste com os microrganismos foi realizado pelo espalhamento das cepas na superfície de placas com ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Depois do processo de incubação, 100 µg do nanocompósito PS-AgNP foi colocado em cada placa com o microrganismo em crescimento. A atividade antimicrobiana foi determinada pela medida do diâmetro da zona de inibição (em mm) em

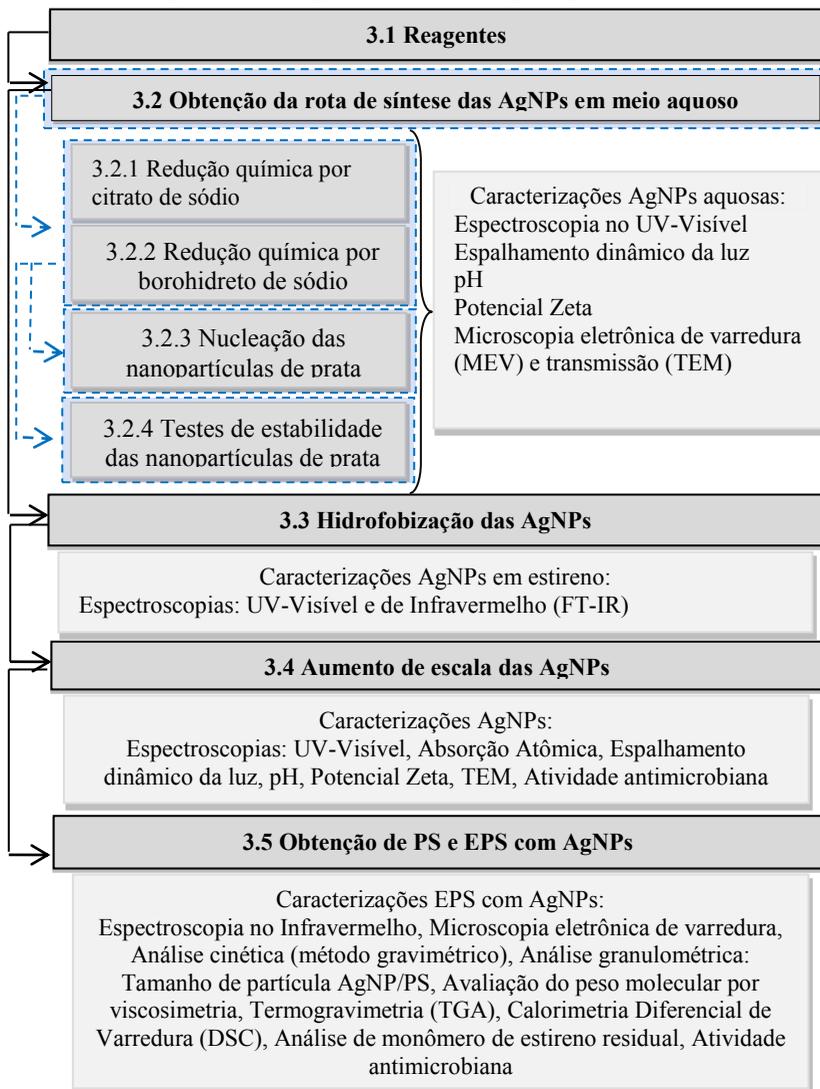
torno dos nanocompósitos de PS-AgNP. Para alcançar a encapsulação das nanopartículas inorgânicas em uma matriz hidrofóbica (orgânica), é necessário que a superfície das nanopartículas torne-se hidrofóbica, ou antes ou durante a incorporação na fase monomérica. A fim de promover um processo de encapsulação eficiente, as nanopartículas de prata, com a superfície modificada com APTMS, foram aplicadas na reação na proporção 1:0,5 em peso. A partir dos resultados de conversão da reação, quando a concentração de 2,5 g/L de AIBN foi utilizada, apresentou-se maiores taxas de polimerização do que com a concentração de 0,7 g/L. Em ambos os casos a conversão do estireno foi em torno de 75% depois de 90 minutos de reação. Todas as nanopartículas de prata são visíveis como pontos escuros no lado de dentro das partículas de estireno, as quais apresentaram tamanhos de aproximadamente 50 e 100 nm. A atividade antimicrobiana dos nanocompósitos foram estudados contra as cepas de *E.coli* e *S.aureus*. Segundo os autores, o crescimento dos microrganismos foi afetado significativamente com os nanocompósitos de PS e AgNP se comparados com o controle. A zona de inibição não foi observada para as amostras do controle. No entanto, para o PS com AgNP a inibição foi de 17% para a *E.coli* e 9% para *S.aureus* para a concentração de 0,7 g/L de AIBN, com 0,17% de prata. Já para a concentração de 2,5 g/L de AIBN e 1,23% de prata, a inibição foi de 21 % para *E.coli* e 13 % para *S.aureus*. A diminuição do número de colônias foi atribuída ao aumento de concentração de iniciador e de prata na obtenção dos nanocompósitos. E, de acordo, com os resultados encontrados estes nanocompósitos pode ser usados em diferentes aplicações tais como pinturas clínicas e recobrimento de materiais biomédicos.

A partir dos trabalhos descritos na literatura, observa-se que a atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata pode ser avaliada por diferentes métodos e para um amplo grupo de bactérias. Além disso, percebe-se que, as nanopartículas de prata podem ser incorporadas em diversos materiais poliméricos e por diversos processos reacionais. No entanto, a proposta de incorporação de AgNPs em poliestireno expansível passa a ser inédita e promissora. Principalmente por se tratar de uma espuma semirrígida que, durante o processamento, não é submetida a um processo de fusão da massa polimérica. Qualquer aditivo necessita ser adicionado no processo de síntese o que, frequentemente, causa a instabilidade do meio reacional e/ou alterações das propriedades finais do polímero obtido. Neste caso, a incorporação das nanopartículas de prata *in situ* na polimerização em suspensão do estireno passa a ser inovadora.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para facilitar a compreensão, este capítulo está dividido em cinco partes, as quais estão descritas no fluxograma da Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma da metodologia experimental.



Fonte: do autor.

As unidades experimentais utilizadas neste trabalho estão alocadas no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização – LCP do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos – EQA da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. No entanto, os equipamentos utilizados para as caracterizações dos materiais desenvolvidos estão alocados em diferentes laboratórios de pesquisa devido ao caráter multidisciplinar do trabalho. Dentre os departamentos e instituições parceiras temos: Central de Análises do Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemática da UFSC; Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME da UFSC; Departamento de Ciência dos Alimentos – CAL do Centro de Ciências Agrárias – CCA da UFSC; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – MIP do Centro de Ciências Biológicas – CCB da UFSC; Instituto de Química do Centro de Tecnologia e Ciências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ.

### 3.1 REAGENTES UTILIZADOS

Os seguintes reagentes foram utilizados para a síntese das nanopartículas de prata: nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\geq 99\%$ , Cinética), citrato de sódio ( $\text{NaCit}$ ,  $\geq 98\%$ , Cinética), borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich), dodecilsulfato de sódio (SDS,  $\geq 99\%$ , Vetec), poli(álcool vinílico)(PVA, MW 78.000, 99,7% hidrolisado, Polyscience, Inc.). Como agentes de limpeza e oxidante de vidrarias foram utilizados o permanganato de potássio (30 g/L) (Cinética). Água destilada foi utilizada para o preparo das soluções e como fase contínua das reações de polimerização. Para a etapa de hidrofobização das nanopartículas de prata foram utilizados os seguintes reagentes: ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\geq 85\%$ , CPQ) e ácido oléico p.a. (LabSynth). Para as reações de polimerizações foram utilizados os seguintes reagentes: estireno ( $\geq 99,5\%$ , Innova S.A.) contendo inibidor p-terc-butilcatecol na concentração de 12-15 ppm; na fase contínua foi utilizado o agente estabilizante poli(vinil pirrolidona), com valor K-90 (PVP K-90, MM 360.000 g/mol, Termodécnica Ltda); como iniciador utilizou-se peróxido de benzoíla (BPO,  $\geq 75\%$ , Akzo Nobel); o n-pentano (grau técnico, Ipiranga Petroquímica S.A. O nitrogênio foi utilizado para inertizar o meio reacional (AGA). Utilizou-se também os seguintes reagentes: tolueno p.a., inibidor p-benzoquinona ( $\geq 99\%$ , Sigma Chemical Co.) As cepas bacterianas utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella TYPHIMURIUM* (ATCC 14028) e *Staphilococcus aureus* (ATCC 25923). As pesagens

foram realizadas em balança analítica de precisão modelo AR2140, série 10379847 (OHAUS Adventurer TM, TOLEDO do Brasil).

### 3.2 OBTENÇÃO DA ROTA DE SÍNTESE DAS AgNPs

Para a síntese das nanopartículas de prata foi utilizada solução aquosa de nitrato de prata a 1mM como precursor do metal, usando o método de redução química através da titulação da solução do precursor com solução aquosa do agente redutor. Este foi analisado em relação à dois diferentes compostos: citrato de sódio e borohidreto de sódio, através de planejamento experimental central composto.

#### 3.2.1 Redução química por citrato de sódio<sup>1</sup>

A síntese de AgNP, usando como agente redutor o citrato de sódio (1 mM a 5 mM) (GUZMÁN et al., 2009) foi realizada sob agitação (500 rpm a 1700 rpm) (GARCIA, 2011) e aquecimento (40 °C a 100 °C)(LIM; LEE, 2008). A vazão em massa variou de  $6,2 \cdot 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$  a  $31,7 \cdot 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$ . As variações nos parâmetros seguiram valores apresentados na literatura. Os experimentos foram realizados através de planejamento experimental central composto com superfície de resposta. Os parâmetros testados no planejamento experimental, para determinar as condições ideais de síntese foram: agitação (rpm) ( $x_1$ ), vazão em massa ( $\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$ ) ( $x_2$ ), tempo de aquecimento após a síntese (s) ( $x_3$ ), temperatura de síntese (°C) ( $x_4$ ) e concentração de citrato (mM) ( $x_5$ ). As variáveis independentes e seus níveis foram codificados como -2, -1, 0, 1 e 2. Um total de 27 experimentos foram realizados, incluindo  $2^4 = 16$  pontos do cubo, 1 ponto central e 10 pontos axiais. Para os cálculos estatísticos das variáveis,  $X_i$  foram codificadas como  $x_i$  de acordo com a equação (4).

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\delta X} \quad (4)$$

onde  $X_0$  é o valor de  $X_i$  no ponto central e  $\delta X$  apresenta o valor do passo (KHATAEE et al., 2010).

---

<sup>1</sup> Resumo expandido apresentado em forma de painel no *XIX Encontro de Química da Região Sul* (07 a 9 novembro de 2012), intitulado "Síntese de nanopartículas de prata via redução química por citrato de sódio através de otimização por metodologia de superfície de resposta".

### 3.2.2 Redução química por borohidreto de sódio<sup>2</sup>

A síntese de AgNP usando como agente redutor o borohidreto de sódio (1 mM a 5 mM) (SOLOMON et al., 2007) foi realizada sob agitação (500 rpm a 1700 rpm) (GARCIA, 2011) e temperatura de síntese que variou de 0 °C a 35 °C (WOJTYSIAK; KUDELSKI, 2012; SOLOMON et al., 2007). A vazão em massa variou de  $6,2 \cdot 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$  a  $31,7 \cdot 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$ . As variações nos parâmetros seguiram a literatura e os experimentos foram conduzidos através de planejamento experimental central composto com superfície de resposta. Os parâmetros testados no planejamento experimental para determinar as condições ideais de síntese foram: agitação (rpm) ( $x_1$ ), vazão em massa ( $\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$ ) ( $x_2$ ), temperatura de síntese (°C) ( $x_3$ ) e concentração de borohidreto (mM) ( $x_4$ ). As variáveis independentes e seus níveis foram codificados como -1,68, -1, 0, 1 e 1,68. Um total de 26 experimentos foram realizados, incluindo  $2^4 = 16$  pontos do cubo, 2 pontos centrais e 8 pontos axiais. Para os cálculos dos pontos axiais das variáveis,  $X_i$  foram codificadas como  $x_i$  de acordo com a equação (4).

Os coeficientes, em ambas as rotas de sínteses, foram calculados por análise de regressão e sua significância foi verificada usando análise de variância (ANOVA) com o software Statistics 7.0. As nanopartículas de prata obtidas pelas duas rotas de síntese acima apresentadas foram caracterizadas em termos de: distribuição de tamanho de partícula, polidispersidade, pH, condutividade elétrica, densidade óptica e microestrutura.

### 3.2.3 Nucleação das nanopartículas de prata<sup>3</sup>

As nanopartículas foram sintetizadas de acordo com Solomon et al., 2007, com adaptações em relação às diferentes dosagens volumétricas de  $\text{AgNO}_3$  (2, 4, 6, 8, 10 mL) em três sistemas distintos de temperatura (5, 15 e 35 °C) conforme Tabela 1. Levou-se em consideração as variações nos parâmetros seguindo planejamento experimental prévio, referente às condições de sínteses e as respostas para o menor tamanho de partícula (item 3.2.2). A redução química de

---

<sup>2</sup> Resumo expandido apresentado em forma de painel no XIX Encontro de Química da Região Sul (07 a 9 novembro de 2012 intitulado "Otimização de parâmetros de síntese de nanopartículas via redução com borohidreto usando metodologia de superfície de resposta".

<sup>3</sup> Artigo publicado em Anais de Congresso "Estudo de nucleação e crescimento de nanopartículas de prata obtidas por redução química", In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014. doi: 10.5151/chemeng-cobeq2014-1910-16919-178523

AgNO<sub>3</sub> por NaBH<sub>4</sub>, considerando diferentes sistemas de temperatura, foi monitorada por espectrofotômetro UV-Vis. As medidas de densidade óptica foram obtidas a partir de amostras de AgNP sintetizadas e armazenadas em frasco âmbar após 24 h, sob refrigeração.

Para acompanhar a cinética de nucleação das nanopartículas de prata, foi utilizada a rota de síntese em que a solução aquosa de nitrato de prata (1mM) foi titulada com solução aquosa de borohidreto de sódio (3 mM). O sistema foi agitado a 1100 rpm, à vazão em massa de  $19,4 \cdot 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$ , à temperatura de 35 °C. A nucleação das AgNP foi monitorada por espectrofotômetro UV-Vis, a partir de alíquotas de solução coloidal de AgNP retiradas periodicamente do sistema de titulação.

### 3.2.4 Avaliação da estabilidade das nanopartículas de prata<sup>4</sup>

Os estabilizantes, citrato de sódio, dodecil sulfato de sódio(SDS) e poli(vinil álcool)(PVA) foram misturados separadamente ao borohidreto de sódio durante 5 minutos sob agitação a 250 rpm. Após este período foi realizada a síntese das AgNP conforme estabelecido no item 3.2.2.

O estudo do efeito do estabilizante na síntese das AgNP foi realizado a partir de um planejamento experimental para cada estabilizante separadamente, avaliado através da superfície de resposta. Os parâmetros testados no referido planejamento experimental foram: relação molar entre NaBH<sub>4</sub>:AgNO<sub>3</sub> ( $x_1$ ) e concentração dos estabilizantes citrato de sódio, SDS e PVA (MM: 78.000, 99,7% hidrolisado)(adaptado de PATAKFALVI; VIRÁNYI; DÉKÁNY, 2004). As variáveis independentes e seus níveis foram codificados como -1,41, -1, 0, 1 e 1,41. Um total de 10 experimentos foram realizados, incluindo  $2^2 = 4$  pontos do cubo, 2 pontos centrais e 4 pontos axiais. Para os

---

<sup>4</sup> 1) Resumo intitulado "Study of synthesis of silver nanoparticles using protecting agents – poly(vinyl alcohol)(PVA): effects of the molar relation precursor/reducing and PVA concentrations", In: XII Encontro da SBPMat, 2013. 2) Resumo intitulado "Estudo de nucleação e crescimento de nanopartículas de prata estabilizadas com poli(álcool vinílico)". In: 12º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2013. 3) Artigo publicado em Anais de Congresso "Efeito da relação molar redutor/precursor na síntese de nanopartículas de prata usando citrato de sódio e dodecil sulfato de sódio", In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014. doi: 10.5151/chemeng-cobeq2014-1903-16967-146192

cálculos dos pontos axiais das variáveis,  $X_i$  foram codificadas como  $x_i$  de acordo com a equação (4). Os coeficientes foram calculados por análise de regressão e sua significância foi verificada usando análise de variância (ANOVA) com o software Statistics 7.0.

#### 3.2.4.1 Estabilidade sob refrigeração

As nanopartículas de prata em solução coloidal com e sem estabilizantes foram armazenadas sob refrigeração em frasco âmbar durante 45 dias para a avaliação da estabilidade. A estabilidade foi acompanhada em diferentes períodos (0, 7, 15 e 45 dias) por espectroscopia UV-Visível.

#### 3.2.4.2 Estabilidade em diferentes pHs

A estabilidade das nanopartículas de prata frente a pHs entre 2 e 12 foi estudada. Os ajustes de pH foram realizados utilizando solução de ácido nítrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M, em duas fases:

- 1) Antes da síntese das AgNP: a partir da solução de nitrato de prata;
- 2) Depois da síntese das AgNP: a partir da suspensão estoque de AgNP.

As soluções tanto de nitrato de prata quanto de nanopartículas de prata após ajuste de pH foram agitadas a 100 rpm por 10 min em temperatura ambiente. A estabilidade das AgNPs foi acompanhada por espectroscopia UV-Visível e análise de potencial Zeta.

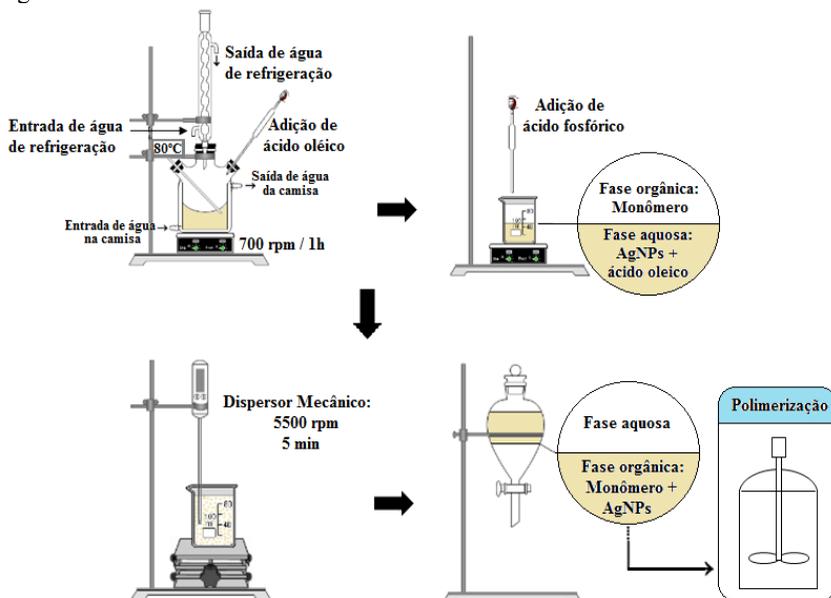
### 3.3 HIDROFOBIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A hidrofobização das AgNP se deu através da transferência de fase das mesmas, da solução aquosa para o monômero estireno, e foi alcançada, usando ácido oléico e ácido fosfórico como agentes de transferência, seguindo o procedimento de acordo com Seo et al. (2008) com adaptações. Tanto o volume de ácido oléico (mL) ( $x_1$ ) quanto de ácido fosfórico (mL) ( $x_2$ ), utilizados na indução da transferência de fase das AgNP (hidrofobização), foram estabelecidos a partir de um planejamento experimental central composto. As variáveis independentes e seus níveis foram codificados como -1,41, -1, 0, 1 e 1,41. Um total de 10 experimentos foram realizados, incluindo  $2^2 = 4$  pontos do cubo, 2 ponto central e 4 pontos axiais. Para os cálculos dos

pontos axiais das variáveis  $X_i$  foram codificadas como  $x_i$ , de acordo com a equação (4).

Um volume de 20 mL de solução coloidal de AgNP juntamente com o volume de ácido oléico, determinado no planejamento experimental, foi mantido sob agitação a 80°C por 1h. Transcorrido este período, um volume de solução de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 0,1 M, também determinado através do planejamento experimental, foi adicionado à mistura em agitação 200 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o estireno foi adicionado a igual volume de solução aquosa de nanopartículas de prata, obtendo-se uma mistura bifásica. O sistema foi agitado vigorosamente com dispersor mecânico (Ultraturrax T25, IKA) a 5500 rpm completa transferência das AgNP para o monômero, esta foi comprovada pela passagem da coloração amarela da fase aquosa para a fase orgânica, conforme resultados também observados por Seo et al. (2008). Após esta etapa o sistema composto por monômero e AgNPs hidrofóbicas seguiu para a polimerização (Figura 9).

Figura 9 – Procedimento experimental do processo de hidrofobização das AgNPs.



Fonte: do autor.

### 3.4 UNIDADE EXPERIMENTAL: AUMENTO DE ESCALA DA SÍNTESE DAS AgNPs

O aumento de escala da síntese das nanopartículas de prata tomou como referência o procedimento de síntese e a faixa de tamanho de partícula das AgNP obtidos no delineamento experimental apresentado no item 3.2.2. E, portanto, o aumento de escala se deu em termos de volume total obtido e consistiu em uma escala de 1:10.

Utilizou-se um reator do tipo batelada, encamisado e de vidro borossilicato, sem chivanas, com capacidade volumétrica de 1 litro (GG Equipamentos e Vidraria de Laboratórios Ltda ). A tampa do reator possui orifícios para as conexões necessárias da bureta, haste do agitador, termopar tipo J (Ecil) e permite acesso ao meio reacional para carregar reagents e retirar amostras. A agitação é realizada por um impelidor do tipo hélice tripla com diâmetro total de 60 mm (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda) acoplado a um tacômetro digital (modelo TD2004-C, TacoTrom) com sensor óptico, e controlada por um inversor de frequência ( $\mu$ line-WEG), conectado à alimentação de um motor trifásico de 0,25 cv (Eberle), com faixa de agitação até 4000 rpm e precisão de  $\pm 5$  rpm. A haste possui uma inclinação de  $20^\circ$  em relação à posição vertical. A distância entre o impelidor e o fundo do reator assim como a distância entre a sua lateral é de 20 mm.

O controle de temperatura é realizado por meio do banho termocriostático (modelo MQBTCA-100, Microquímica Equipamentos Ltda), possuindo um sistema de controle proporcional-integral-derivativo (PID). A água do banho circula em sistema fechado através de mangueiras conectadas à entrada e saída da camisa do reator. Na Figura 10 é apresentada a Unidade Experimental utilizada.

Inicialmente a solução do agente redutor borohidreto de sódio (3 mM) foi adicionado ao reator. Em seguida, a temperatura foi ajustada e mantida durante toda a reação em  $35^\circ\text{C}$ , conforme ensaios determinantes (item 3.2.3). O nitrato de prata (1mM) foi adicionado durante o processo reacional, que teve duração de 30 minutos.

Figura 10 - Unidade experimental de aumento de escala da síntese das AgNPs.



Fonte: Laboratório de Controle de Processos e Polimerização – LCP UFSC

### 3.5 UNIDADE EXPERIMENTAL: POLIMERIZAÇÃO EM MASSA

Inicialmente as nanopartículas obtidas em ampliação de escala foram transferidas para o monômero estireno para a polimerização em massa com o intuito de obter informações teóricas para a obtenção do nanocompósito frente à polimerização em suspensão.

As condições operacionais referente à polimerização em massa estão apresentadas na Tabela 3. As nanopartículas foram transferidas para o monômero na proporção de 1:2 (v/v). Em seguida, adicionou-se à fase orgânica o iniciador BPO e a mistura reacional foi agitada por 15 minutos a temperatura ambiente para completa dissolução do iniciador. A massa reacional foi transferida para tubos de vidro, onde cada tubo continha 5 mL da fase orgânica. Após a inertização do meio com nitrogênio, os tubos foram fechados e imersos em um banho termostático (modelo MQBTCA-100, Microquímica Equipamentos Ltda) com temperatura controlada ( $90 \pm 1^\circ\text{C}$ ). A reação teve duração de 6 horas até a obtenção dos polímeros PS e PS/Ag. Ao término da reação os tubos foram removidos do banho termostático e submetido à baixa temperatura ( $\sim 1^\circ\text{C}$ , em congelador doméstico) para terminar a reação.

### 3.5.1 Polimerização térmica do estireno em presença de ácido oléico e AgNP

A polimerização térmica do estireno foi determinada a partir das características reológicas das amostras em presença de ácido oléico e nanopartículas de prata, com o intuito de verificar a influência da adição do ácido oléico na polimerização térmica do estireno. Os meios reacionais analisados foram compostos por estireno puro, estireno + ácido oleico, estireno + ácido oleico + AgNP.

A reação foi conduzida em temperatura de 90 °C por 6 h e a retirada dos tubos com o meio reacional da unidade experimental ocorreu a cada 15 minutos. Utilizou-se um viscosímetro rotacional com cilindros concêntricos geometria DC 60 (modelo VT 550 Thermo Haake, Thermo Fisher Scientific). As medidas foram realizadas a 25±0,5 °C ajustadas por banho termostático (DC 30, Thermo Fisher Scientific) acoplado ao viscosímetro. Os dados de taxa de cisalhamento, tensão de cisalhamento foram fornecidos diretamente pelo equipamento e foram obtidos a cada 15 minutos de reação, com uma taxa de cisalhamento de 0 a 600 s<sup>-1</sup> (curva ascendente) e de 700 a 0 s<sup>-1</sup> (curva descendente), com o tempo de 10 minutos para cada curva. As curvas ascendentes de tensão de cisalhamento (Pa) por taxa de cisalhamento (s<sup>-1</sup>) foram ajustadas e a viscosidade foi calculada utilizando o modelo de Newton a partir da equação (5).

$$\tau = \mu \cdot \gamma \quad (5)$$

onde  $\tau$  é o valor da tensão de cisalhamento (Pa),  $\mu$  é o valor de viscosidade absoluta (Pa.s) e  $\gamma$  é o valor da taxa de deformação (s<sup>-1</sup>).

### 3.5.2 Filmes de PS e PS/Ag

O PS e PS/Ag obtidos foram solubilizados em tolueno na concentração de 80% sob agitação de 200 rpm (Shaker, DIST) por 7 dias em temperatura ambiente. Após este período obteve-se uma solução polimérica viscosa a qual foi utilizada para a preparação de filmes de PS e PS/Ag. A solução polimérica foi vertida em placas de vidro (25 x 17 x 0,3 cm), as quais foram armazenadas em recipiente hermético (21 x 32 x 11 cm) nivelado e inertizado com N<sub>2</sub> durante 10 dias. A secagem dos filmes de PS e PS/Ag foi completa em estufa à vácuo a 60 °C por 36 h.

Tabela 3 – Formulação usada na reação de polimerização em massa.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Estireno (g)	113,63
Iniciador (Peróxido de Benzoíla)(BPO)† (g)	0,42
Nanopartículas de prata† (v/v)	1:2

†Relativo à massa de estireno.

### 3.6 UNIDADE EXPERIMENTAL: POLIMERIZAÇÃO EM SUSPENSÃO E IMPREGNAÇÃO

Para os experimentos de polimerização em suspensão para a produção do poliestireno (PS) e poliestireno expansível (EPS) foi utilizado um sistema de trabalho semelhante ao apresentado no item 3.4. Este sistema consiste em um reator de aço inoxidável (AISI 316L), sem chicanas, encamisado (Metalquim Ltda) com capacidade volumétrica de 5 litros (Figura 11) e pressão máxima de 15 kgf/cm<sup>2</sup>, conectado a um banho termocriostático (modelo Unistat 405w, Huber), o qual contém um fluido sintético (DW-Therm) que passa através da camisa realizando o aquecimento e resfriamento do sistema, na faixa de temperature de -90 a 200 °C.

O sistema de aquecimento e resfriamento é realizado através de um trocador de calor a placas (modelo M3-FM, Alfa Laval). O vapor para aquecimento do sistema é fornecido por uma caldeira a gás com capacidade de 300 kg/h de vapor a 8 kgf/cm<sup>2</sup> e alimentado na linha a 4 kgf/cm<sup>2</sup>.

O resfriamento de água é realizado a temperature ambiente, através da rede hidráulica instalada.

O sistema de agitação da unidade conta com uma hsta em que na parte superior localizam-se duas pás chatas, que formam um ângulo de 20° em relação à horizontal, e na base três pás tipo hélice.

O sistema é acionado por um inversor de frequência (modelo Microline, SIEMENS), com transmissão/recepção de dados em linha, de 1 a 5 V, 4 a 20 mA ou digital, acoplado a um motor (Eberle) trifásico, 220 V, com potência de 1/3 cv, com velocidade de rotação variável de 200 a 500 rpm.

Figura 11 - Unidade experimental para polimerização em suspensão e impregnação.



Fonte: Laboratório de Controle de Processos e Polimerização – LCP UFSC

### 3.7 SÍNTESE DO MATERIAL POLIMÉRICO (PS e PS/Ag)

As reações realizadas nesta unidade experimental consistem em duas etapas. A primeira delas é a reação de polimerização do estireno e a segunda a impregnação das partículas com n-pentano para posterior expansão. As condições operacionais referente à polimerização em suspensão estão apresentadas na Tabela 4. O reator foi carregado com água e monômero, no caso do sistema do PS/Ag nanocompósito, considerou-se a transferência das AgNP para a fase monomérica. E, então o sistema foi aquecido até 90 °C. Em seguida, o iniciador foi adicionado e após 15 minutos de reação, adicionou-se cerca de 50% do agente de suspensão. O restante do agente de suspensão foi adicionado ao longo da reação de polimerização de acordo com a amostragem do ponto de identificação de partícula. O processo reacional teve duração de 6h. Para a etapa de impregnação das partículas com n-pentano, após a partícula atingir o Ponto de Identificação de Partícula (PIP), o reator foi pressurizado a 1,5 kg.f.cm<sup>-2</sup> e aquecido à 105 °C. O agente expensor foi injetado durante 30 minutos e a temperatura do reator foi elevada até 120 °C, tais condições foram mantidas por 2h. Após a completa polimerização o reator foi completamente resfriado a temperatura ambiente, despressurizado e descarregado. O PS e PS/Ag obtidos foram lavados sucessivamente com álcool etílico e água destilada para a retirada de resíduos da reação, filtrado à vácuo e seco à temperatura ambiente por 24 h.

Tabela 4 - Formulação usada na reação de polimerização de suspensão do estireno.

Parâmetro	Valor
Temperatura (°C)	90±1
Agitação (rpm)	300
Tempo de reação (min)	360
<i>Fase aquosa</i>	
Água (l)	3,5
Agente de suspensão (poli(vinil pirrolidona))* (mL)	105
<i>Fase orgânica</i>	
Estireno (l)	1
Nanopartículas de prata hidrofobizadas (v/v)†	1:3
Iniciador (Peróxido de benzoíla)† (g)	4
N-Pentano† (mL)	170,9

†Relativo à massa do estireno; \*relativo à massa da água.

### 3.8 ADITIVAÇÃO E EXPANSÃO DO EPS E EPS/Ag

Ambos os polímeros PS e PS/Ag após secos receberam aditivação com a mistura dos sais de triestearato de glicerila (0,2%), monoestearato de glicerila (0,2%) e estearato de zinco (0,2%). Os polímeros foram então armazenados a 5±1 °C durante 7 dias. Após, as partículas poliméricas de PS e PS/Ag, previamente separadas por peneiramento, foram expandidas em estufa à 100 °C por 30 minutos.

### 3.9 CARACTERIZAÇÕES

Será apresentadas neste item as técnicas empregadas para a caracterização das nanopartículas de prata hidrofílicas, hidrofóbicas, bem como dos polímeros (PS e EPS) puros e impregnados com AgNPs.

#### 3.9.1 Espectroscopia UV-Vis

Esta técnica permitiu a caracterização das amostras das AgNPs hidrofílicas e hidrofóbicas frente às suas propriedades ópticas, a partir dos espectros pode-se retirar parâmetros importantes, tais como o pico de absorção plasmônica de superfície (SPR) das nanopartículas, o valor máximo de absorção óptica ( $A_{max}$ ), o comprimento de onda no máximo

de absorção ( $\lambda_{\max}$ ) e a largura à meia-altura (FWHH), esta última está relacionada à dispersão de tamanho das nanopartículas.

Os espectros de absorção UV-Vis das nanopartículas de prata hidrofílicas e hidrofóbicas foram obtidos utilizando espectrofotômetro (Hitachi U-1900), em cubetas de quartzo (caminho óptico: 10 mm), em modo de varredura de comprimentos de onda de 300 a 600 nm, com velocidade de 400 nm/min, utilizando software HITACHI Spectrophotometer UV Solutions.

### **3.9.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)**

Esta técnica de caracterização permitiu avaliar a distribuição de tamanho de partícula e polidispersidade das AgNPs. As medidas de tais parâmetros foram realizadas utilizando Nano Sizer modelo Nano-S-ZEN 1600 (Malvern Instruments Série MAL S01216), para as nanopartículas hidrofílicas, no estudo da rota de síntese, nucleação e estabilidade, com medidas a partir de 20 corridas por amostra, com intervalos de 1 segundo entre as medidas, temperatura de 25 °C, em cubeta de vidro, utilizando o Dispersion Technology Software v4.2. Os valores de distribuição de tamanho de partícula das amostras foram apresentados em Z-médio (nm), acompanhado do valor da polidispersidade do meio e curvas de distribuição de frequência.

### **3.9.3 Potencial Zeta**

As medidas de potencial Zeta foram realizadas nas amostras das nanopartículas de prata hidrofílicas, no estudo da aplicação dos estabilizantes e em diferentes pHs, justamente para avaliar a estabilidade das amostras a um campo elétrico. Para leitura utilizou-se o ZetaSizer (modelo ZEN 3600, Malvern Instruments Série MAL 1030322), com medidas a partir de 15 corridas por amostra, com intervalos de 1 segundo entre as medidas, temperatura de 25 °C, em cela capilar (modelo DTS 1060), utilizando o Zetasizer Series Software v6.20.

### **3.9.4 pH**

As medidas e ajustes de pH do nitrato de prata, antes da síntese das AgNPs, e das AgNPs depois de sintetizadas para o estudo da estabilidade em diferentes pHs foram feitos utilizando um pHmetro modelo MPA-210 (ADAMO, São Paulo, Brasil).

### 3.9.5 Microscopia Eletrônica de transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi realizada para a caracterização das amostras de nanopartículas de prata hidrofílicas sintetizadas tanto na escala piloto quanto àquelas sintetizadas com o aumento de escala. Além disso, a estrutura das células bacterianas de *E.coli*, *S. thymurium* e *S.aureus* submetidas ao tratamento com as AgNP (uma concentração acima da bacteriostática) também foram caracterizadas por esta técnica.

A tensão utilizada foi de 100 kV, sendo que as amostras de AgNPs foram gotejadas em grades de cobre recobertas por filme de carbono de 300 mesh, com o auxílio de uma micropipeta de alta precisão. Esta mistura foi seca à vácuo à temperatura ambiente e, quando prontas levadas ao microscópio (TEM JEOL JEM 1011).

Uma alíquota de 10 $\mu$ L das bactérias suspensas em caldo Mueller-Hinton (MH)(10<sup>8</sup> UFC/mL) foram submetidas à crescimento em caldo MH sem e com solução de AgNPs (uma concentração acima da concentração bacteriostática)(*E. coli* e *S. TYPHIMURIUM*: 60 g.L<sup>-1</sup>; *S.aureus*: 40 g.L<sup>-1</sup>). A mistura de solução e bactéria foi incubada a 37 $\pm$ 1 °C por 48 h, centrifugadas à 13 400 rpm por 2 minutos para obter as células em *pellets*. As células em *pellets* foram fixadas com fixador de Karnovsky modificado que consiste de 2% (v/v) de glutaraldeído e 2% (v/v) de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,05 M (pH 6,5 a 4 °C por 2 h. Em seguida, foram lavadas três vezes com o mesmo tampão por um período de 10 min cada lavagem. As amostras foram fixadas com tetróxido de ósmio a 1% (v/v) no mesmo tampão a 4 °C por 2h e lavadas duas vezes com água destilada. Após a pós-fixação, as amostras desidratadas de etanol em série graduada (uma vez em 30, 50, 70, 80 e 95% e três vezes em 100% por 10 min cada série). Após desidratação, as amostras foram tratadas com banhos de etanol e resina de Spurr em série graduada (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 por 24 h cada) e, em seguida com dois banhos de resina pura por 24 h cada. As amostras foram então colocadas nos moldes para então serem polimerizadas em estufa a 70 °C por 24 h. Cortes semifinos (aprox. 700 nm de espessura) e, em seguida, ultrafinos (aprox.70 nm de espessura) foram feitos a partir do material emblocado com uma lâmina de diamante, utilizando um ultramicrotomo (UC6, Leica). As seções ultrafinas dos filmes foram depositadas em grades de cobre de 300 mesh e, finalmente, contrastadas, com solução acetato de uranila a 5% (m/v) por 10 min, em seguida com citrato de chumbo a 5% (m/v) por 5 min e lavadas em banhos de água

destilada por 24 vezes de 10 s cada e em fluxo de água corrente por 30 s e, foram levadas ao microscópio (TEM JEOL JEM 1011).

### 3.9.6 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a morfologia dos materiais obtidos, a microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) (JEOL JSM-6701F) foi realizada tanto para as amostras de nanopartículas de prata hidrofílicas e quanto para os polímeros puros (PS e EPS) e com AgNPs (PS/Ag e EPS/Ag), especialmente para esses últimos foi realizada a análise de EDX, para a identificação elementar. A voltagem do aparelho utilizada foi de 15 kV para as amostras líquidas e de 1 kV para a análise de EDX.

As amostras líquidas de AgNPs foram gotejadas, com o auxílio de uma micropipeta de alta precisão, em placas de silício as quais foram acomodadas em *stube* e secas à vácuo à temperatura ambiente.

As análises em MEV das AgNPs e polímeros puros (PS e EPS) e com AgNPs (PS/Ag e EPS/Ag), foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME da UFSC, e as análises de EDX foram realizadas no Instituto de Química da UERJ.

Quando prontas as amostras foram recobertas com uma camada de 5 nm de ouro para em seguida analisadas. Os equipamentos utilizados pertencem ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### 3.9.7 Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR)

Para identificação dos principais grupamentos funcionais presentes nos materiais obtido foram realizadas análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).

Os espectros de FT-IR das AgNPs foram obtidos em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (modelo IRPrestige, Shimadzu) na faixa de 600-4000  $\text{cm}^{-1}$ . As medidas foram realizadas utilizando a célula para líquidos do equipamento.

Os polímeros sem e com AgNPs foram caracterizados em forma de filmes e para isso o espectrômetro com acessório de reflectância total atenuada (ATR)(modelo One, Perkin Elmer), tal caracterização foi realizada no Instituto de Química da UERJ.

### 3.9.8 Cinética da polimerização (método gravimétrico)

Para determinar a influência da adição das nanopartículas de prata na conversão da polimerização do estireno utilizou-se o método gravimétrico para avaliar a cinética da reação. O meio reacional foi preparado conforme condições apresentadas na Tabela 5 e o experimento cinético foi conduzido na unidade experimental de polimerização em massa. A retirada dos tubos com o meio reacional, da unidade experimental ocorreu a cada 15 minutos até que o último tubo fosse retirado com 10 h de reação.

Tabela 5 – Formulação usada na cinética da reação de polimerização.

Parâmetros	Valores
Estireno (g)	186,34
Iniciador (Peróxido de Benzoíla)(BPO)† (g)	0,69
	1:2
Nanopartículas de prata† (v/v)	1:18
	1:25

†Relativo à massa de estireno.

Para a realização das análises para a verificação do percentual de conversão polimérica dissolveu-se, utilizando placas de Petri de vidro (diâmetro interno 9,5 cm), aproximadamente, 1 g da massa do tubo de vidro em 10 mL de tolueno e 0,01 g de inibidor *p*-benzoquinona. As placas com as amostras foram mantidas em repouso por 24 h para completar o processo de dissolução do material polimérico em tolueno. Após as amostras estarem dissolvidas, estas foram levadas à secagem em estufa onde permaneceram a 60 °C durante 48 h. As amostras foram, então resfriadas à temperatura ambiente em dessecador e pesadas. O procedimento de secagem e resfriamento foi repetido até peso das placas permanecesse constante. O resultado da conversão final de monômero se dá por diferença entre os valores de massa iniciais e finais desta análise. Por diferença de massa foi determinada a curva de conversão „versus“ o tempo para a amostra com AgNP, comparado com a análise obtida a partir do polímero puro.

### 3.9.9 Análise granulométrica: Tamanho de partícula PS/AgNP

Para determinar a distribuição de tamanho (DTP) das partículas do material polimérico produzido sem e com AgNPs utilizou-se a análise granulométrica. As partículas de PS e PS/Ag foram submetidas à técnica de peneiramento utilizando um conjunto de peneiras da série

Tyler (Bertel) com sete peças, correspondentes à abertura da peneira (2360, 1180, 1000, 710, 600, 425 e 300) e fundo < 300  $\mu\text{m}$ . As peneiras foram selecionadas para avaliar se a maior fração do produto se encontra dentro do diâmetro de aplicabilidade industrial (710 a 1180  $\mu\text{m}$ ). Tal conjunto (peneiras acomodadas em ordem crescente e material polimérico em pérolas) foi agitado em dispositivo vibratório vertical por 30 minutos. Após a separação das frações de cada peneira, o material polimérico foi pesado. Além da obtenção da curva de distribuição do DTP, foi determinado, também o valor do diâmetro médio de Sauter ( $d_{32}$ ) a partir da equação (6).

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n \Delta\varphi_i}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta\varphi_i}{D_i}} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta\varphi_i}{D_i}} \quad (6)$$

onde  $d_{32}$  é média superficial dos diâmetros,  $\Delta\varphi_i$  é a fração mássica da amostra retidada da peneira  $I$ ,  $\overline{D_i}$  é a média dos diâmetros entre e peneira de retidos e a imediatamente superior da série.

### 3.9.10 Avaliação da massa molecular por viscosimetria

A técnica de viscosimetria foi utilizada para avaliar o peso molecular das soluções poliméricas diluídas a partir dos materiais obtidos (PS e PS/Ag). Experimentalmente, a determinação dos parâmetros viscosimétricos foi realizada utilizando-se um viscosímetro capilar Ubbelohde com capilar de diâmetro 0,58 mm, imerso em banho termostático à  $30 \pm 0,5$  °C como esquematizado na Figura 12. A equação (7) foi utilizada para relacionar a viscosidade intrínseca com a massa molecular médio ponderal do polímero.

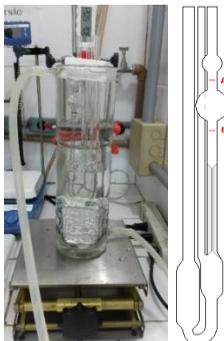
$$[\eta] = K.(PM_w)^a \quad (7)$$

onde  $\eta$  é a viscosidade intrínseca ( $\text{mL.g}^{-1}$ ) e  $PM_w$  é a massa molecular média ponderal ( $\text{g.mol}^{-1}$ ).

Os polímeros PS e PS/Ag foram diluídos em tolueno a partir de uma solução-mãe, totalizando seis soluções que tiveram o tempo de escoamento cronometrado (Região A – B da Figura 12). Para as condições das analyses realizadas os valores  $K = 0,0092$  e  $a = 0,72$

foram utilizados. O tempo de escoamento, tanto do solvente quanto da solução, foi considerado como sendo a média dos tempos de três medidas consecutivas.

Figura 12 – Experimento de viscosimetria e desenho esquemático do viscosímetro de Ubbelohde.



Fonte: Laboratório de Controle de Processos – LCP UFSC.

### 3.9.11 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

Foram realizadas análise de termogravimetria dos polímeros com e sem AgNp para o estudo da influência que as nanopartículas de prata tem sob a estabilidade térmica do poliestireno.

Os filmes de PS e PS/Ag obtidos através da polimerização em massa foram analisados usando um analisador termogravimétrico (Dp Union, modelo SDT Q 600) do Instituto de Química da UERJ.

Os polímeros com e sem AgNP obtidos pela polimerização em suspensão foram analisados usando os equipamentos TGA – 50 e DSC – 50 (Shimadzu) da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

As amostras (25 mg) foram analisadas com velocidade de aquecimento de 10°C/min até 600°C sob atmosfera inerte (N<sub>2</sub>).

### 3.9.12 Análise de monômero de estireno residual

A determinação de monômero residual se faz necessária para o cumprimento da legislação, de acordo com diretrizes do Ministério da Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da

Resolução nº 105 que regulamenta as disposições gerais sobre embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

Na determinação da quantidade de monômero residual foi utilizado um cromatógrafo a gás (modelo GC-2010AF) acoplado a um *headspace* (modelo AOC-5000) (Shimadzu), equipado com um detector por ionização de chama a temperatura de 200 °C e um sistema de injeção automático. A programação linear da coluna do cromatógrafo gasoso foi de iniciar a 50 °C por 5 minutos, seguido por uma rampa de aquecimento até 100 °C por meio de uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>. As condições de operação do *headspace* foram de 7 minutos de incubação da amostra no forno com uma agitação baixa de 250 rpm a uma temperatura igual a 90 °C no forno e 110 °C na seringa. O solvente utilizado para as diluições foi o clorofórmio.

O cálculo das concentrações de estireno foi realizado a partir de uma curva de calibração relacionando as áreas dos picos relativas ao estireno com concentrações conhecidas do mesmo.

#### 3.9.13 Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS)

Para medir a quantidade de prata das suspensões foi utilizado um espectrofotômetro de absorção atômica de chama (modelo AA-6300, Shimadzu) do Laboratório de Transferência de Massa – LABMASSA da UFSC. Para separar as AgNPs, as suspensões aquosas foram centrifugadas (Eppendorf, Minispin). A separação foi feita centrifugando 2 mL de AgNPs aquosas a 12000 rpm por 15 minutos. Para a calibração, soluções padrões foram preparadas na concentração de 4 mg.L<sup>-1</sup>. A solução estoque foi diluída em série para obter as concentrações de 3, 2, 1 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Ag (Binaeian, Rashidi, Attar 2012).

Para medir o conteúdo de prata no poliestireno, o nanocomposito foi digerido com ácido sulfúrico *overnight* e as medidas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (Hitachi, Z-8230) da Central de Análise do Departamento de Química da UFSC.

#### 3.9.14 Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram empregadas três técnicas microbiológicas (teste de difusão, diluição em caldo e teste de contato) para a avaliação antimicrobiana das AgNPs considerando as espécies de referência: *Staphylococcus aureus* (ATCC 02923 e 25923), *Escherichia coli*

(ATCC 25922) e *Salmonella TYPHIMURIUM* (ATCC 14028). A determinação da atividade antimicrobiana seguiu os padrões microbiológicos para pescados da legislação, de acordo com diretrizes do Ministério da Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da Resolução nº 12 que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos e Regulamento da União Européia nº 1441/2007.

Os inóculos bacterianos foram preparados a partir do plaqueamento das cepas para ágar Mueller-Hinton para *S.aureus* e ágar MacConkey para *E.coli* e *S. TYPHIMURIUM* incubados durante 24 h a  $36\pm 1$  °C. Uma alçada da cepa foi coletada do plaqueamento e solubilizada em caldo Mueller Hinton que foi incubado novamente por 24 h a  $36\pm 1$  °C.

#### 3.9.14.1 Teste de difusão

Para este teste utilizou-se, especificamente, as cepas bacterianas *E.coli* (ATCC 25922) e *S.aureus* (ATCC 02923). Os inóculos foram semeados em toda a superfície de placas de Petri contendo meio ágar Mueller-Hinton utilizando *swab* estéril. A concentração das suspensões aplicada foi correspondente a  $10^8$  UFC/mL.

Para avaliar a atividade antimicrobiana das AgNP sintetizadas em aumento de escala, foi utilizado o teste de difusão. As AgNPs obtidas no item 3.4 foram preparadas a partir de diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  (1, 1,5, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mM).

O método consistiu em inocular 50  $\mu\text{L}$  das amostras de AgNPs em orifícios de 8 mm de diâmetro, previamente feitos no ágar. Os sistemas foram mantidos sob refrigeração de  $5\pm 1$  °C por 14 h para a difusão das AgNPs e, em seguida, incubados por 24 horas a  $36\pm 1$  °C em estufa bacteriológica e sob condições aeróbicas. Após o período de incubação, as placas foram observadas quanto à formação de halos de inibição. A leitura dos resultados foi realizada medindo-se o diâmetro dos halos, em mm, formados ao redor dos orifícios contendo as AgNP. Em cada placa de Petri foram perfurados 3 orifícios para obter as medidas em triplicata.

#### 3.9.14.2 Concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB)

Para esta a determinação da CMI e da CMB das AgNPs, utilizou-se, as cepas bacterianas *E.coli* (ATCC 25922), *S.aureus* (ATCC 02923 e 25923) e *S. TYPHIMURIUM* (ATCC 14028).

A técnica de diluição em caldo foi utilizada para determinar a CMI. Nesta técnica foi utilizado o meio Mueller-Hinton (MH), onde foram adicionados em cada tubo 5 mL do MH, 10 µL de cada suspensão bacteriana ajustada correspondente a  $10^5$  UFC/mL e as soluções de AgNPs em concentrações variáveis (2, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 µg.mL<sup>-1</sup>). Como controle negativo foi utilizado o tubo contendo apenas o caldo MH, e como controle positivo, o caldo MH inoculado com 10 µL da suspensão bacteriana, sem AgNPs. O resultado da CMI foi determinado como a menor concentração de AgNP que impediu o crescimento da bactéria (meio de cultura sem turvação), e consequentemente está foi considerada a concentração bacteriostática das AgNPs. A concentração bactericida (CMB) da prata foi, portanto, determinada através do plaqueamento do tubo sem turvação do ensaio de CMI, por meio de alça bacteriológica, em ágar MH para *S.aureus* e ágar MacConkey para *E.coli* e *S. TYPHIMURIUM*. As placas foram incubadas a  $36\pm 1$  °C por 24 h, sendo considerada a concentração bactericida a da placa que não apresentou crescimento bacteriano.

#### 3.9.14.3 Teste de contato aplicado ao EPS e EPS/Ag

O teste de contato foi aplicado nos polímeros expandidos sem e com a prata para a verificação da capacidade antimicrobiana das AgNPs incorporadas frente as cepas *E.coli*, *S. aureus* e *S. TYPHIMURIUM*. Este teste de contato simula o contato direto do microrganismo, possivelmente presente no pescado que entrará em contato com o EPS desenvolvido neste estudo.

As bactérias previamente cultivadas em meio MH a  $36\pm 1$  °C por 24 h foram centrifugadas e lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS; 0,01 M, pH 7,2) para remover os resíduos de meio de cultura. As amostras foram diluídas para obter uma suspensão contendo aproximadamente  $10^8$  UFC/mL para a padronização das suspensões bacterianas. Para a leitura da densidade de opacidade da suspensão um espectrofotômetro foi usado com um comprimento de onda de 580 nm. As suspensões padronizadas foram diluídas mais duas vezes para conterem cerca de  $10^4$  UFC/mL e, essas, foram utilizadas como suspensões de trabalho. Cerca de 50 µL de suspensão de trabalho foi colocada em contato com o material polimérico EPS e EPS/Ag dentro de uma câmara úmida (32 cm x 36 cm x 9 cm) hermeticamente fechada a temperatura ambiente ( $\sim 25$  °C) em intervalos de tempo variados: 1 h ( $t_1$ ), 4 h ( $t_4$ ), 13 h ( $t_{13}$ ), 25 h ( $t_{25}$ ) e 28 h ( $t_{28}$ ). Em seguida, as cepas foram

diluídas em série ( $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  UFC/mL) e plaqueadas em ágar MH e MacConkey para a contagem de colônias.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento do presente trabalho. Para melhor exposição e discussão dos resultados, o capítulo está dividido em quatro partes. A primeira parte se refere aos resultados obtidos referente à síntese por redução química das AgNPs. Na segunda parte, será discutido o aumento de escala de síntese das AgNP. Na terceira parte, o processo de hidrofobização das AgNP diretamente para a fase monomérica (estireno) será apresentado e, por fim, na quarta parte, serão apresentados os resultados referentes a obtenção do poliestireno e poliestireno expansível puro e com prata será abordada. Cada etapa é acompanhada das respectivas caracterizações de acordo com o material obtido.

### 4.1 ROTAS DE SÍNTESES DE AgNP

A escolha da rota de síntese em função dos fatores e níveis das variáveis utilizados no planejamento experimental que permitiram avaliar os efeitos e interações, se deu através de um modelo empírico polinomial de segunda ordem (equação 8), no qual o tamanho de partícula (nm) das AgNP foi selecionado como resposta (Y).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (8)$$

onde  $y$  é a resposta predita,  $\beta_0$  a constante do modelo,  $\beta_i$  os coeficientes dos efeitos lineares,  $\beta_{ii}$  os coeficientes dos efeitos quadráticos,  $\beta_{ij}$  os coeficientes de interação entre os fatores,  $X_{ij}$  e  $X_j$  as variáveis independentes codificadas,  $\epsilon$  o erro,  $k$  o número de variáveis consideradas, e  $i$  e  $j$  os fatores codificados do sistema.

#### 4.1.1 Rota de síntese de AgNP com citrato de sódio

Os valores preditos para o tamanho de partícula (nm) se aproximaram dos valores experimentais demonstrando que o modelo é aplicável. O coeficiente de regressão significativo foi positivo ( $R = 0,8978$ ), indicando uma superfície resposta com um ponto mínimo no planejamento experimental. A análise de variância (ANOVA) foi usada para determinar a relação entre a resposta e as variáveis significativas, a fim de obter as condições ótimas (tamanho nanométrico) para o tamanho de partícula das nanopartículas de prata (Tabela A - Apêndice A). Estes

resultados apresentaram que o modelo quadrático foi válido para o estudo ( $F=6,59$  e  $p<0,05$ ).

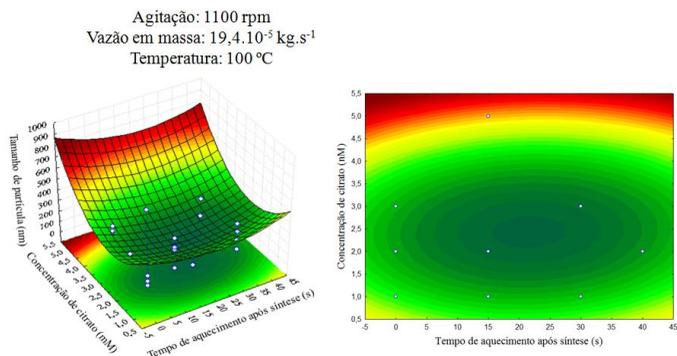
Um modelo quadrático é descrito com a relação matemática entre as variáveis independentes e a resposta (equação 9).

$$y = 225,67 + 1,33x_1 + 116,38x_2 + 20,94x_3 - 50,16x_4 + 200,22x_5 + 1,31x_1x_2 + 17,33x_1x_3 - 8,81x_1x_4 + 50,50x_1x_5 + 90x_2x_3 - 79,27x_2x_4 + 192,75x_2x_5 - 72,19x_3x_4 - 14,33x_3x_5 - 95,90x_4x_5 + 11,37x_1^2 + 58,81x_2^2 + 80,05x_3^2 - 26,95x_4^2 + 225,25x_5^2 \quad (9)$$

Para descrever os efeitos individuais e cumulativos das variáveis testadas e seus efeitos na resposta de tamanho de partícula, foram usados os gráficos para melhor visualização. Na Figura 13 são apresentados o gráfico da superfície de resposta (A), em um plano tridimensional e o dos contornos (B), em um plano bidimensional, para o modelo de regressão dos dados.

Ao avaliar os resultados de acordo com o processo de seleção da região ótima das condições de síntese que minimizam o tamanho de partícula, convém ressaltar que muitas amostras apresentaram partículas largas ( $> 100$  nm), provavelmente devido ao mecanismo de agregação, distorcendo o valor de Z-médio (SHARMA; RIA; LIN apud VAIDYANATHAN et al., 2010).

Figura 13 - Gráfico de superfície de resposta (A) e contorno (B) para o tamanho de partícula (nm) em função da concentração de citrato (mM) e do tempo de aquecimento após síntese (s).



Fonte: do autor.

A resposta mínima (tamanho de partícula =  $21,10 \pm 1,78$  nm) (Apêndice A) foi obtida com a velocidade de agitação de 1100 rpm, vazão em massa de  $19,4 \cdot 10^{-5}$  kg.s<sup>-1</sup>, tempo de aquecimento após a síntese de 20 s, temperatura de síntese de 100 °C e concentração de citrato de 3 mM. Medidas complementares foram realizadas para a condição otimizada e estão apresentadas na Tabela A2 (Apêndice A).

O pH da solução de síntese através do método citrato, é levemente ácido (Tabela A2 – Apêndice A), possivelmente um efeito da hidrólise do AgNO<sub>3</sub>, em baixa concentração e grande volume, contra um pequeno volume de citrato em concentração maior. Os valores de pH encontrados na literatura para este método são de 6,5 a 6,8 (GARCIA, 2011). Neste estudo, contudo, os valores variaram de 6,72 até 7,93.

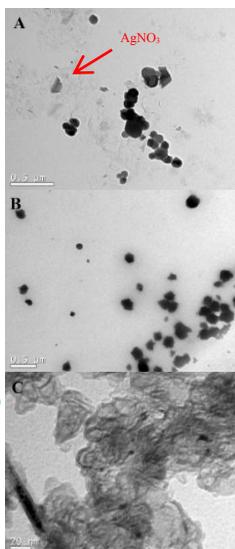
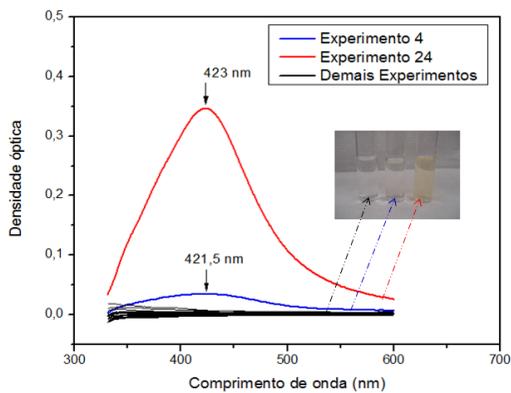
De acordo com os resultados obtidos, a partir do processo de seleção da região ótima dos fatores para a síntese realizada neste estudo, pode-se observar que somente uma condição experimental apresentou condições ideais de acordo com a literatura, fato relacionado a ocorrência de pico na região em torno de 400-450 nm (Figura 14), que indica a presença de nanopartículas de prata (Ag<sup>0</sup>) (HORMOZINEZHAD et al., 2012; LIM; LEE, 2008). Considerando o experimento 4, em que utilizou-se a temperatura de 80 °C, observa-se um pequeno pico (Figura 14), e conforme resultados semelhantes a Lim e Lee (2008), possivelmente a condição experimental de baixa temperatura pode fazer com que a pequena quantidade de nanopartícula formada seja instável. É possível observar na Figura 14a e 14c a presença de cristais de nitrato de prata no sistema, que não foram reduzidos pelo citrato de sódio. Tal comportamento foi observado também por Bober et al. (2011), em que os cristais de nitrato de prata diminuem com o aumento e formação de nanopartículas de prata. Na Figura 14b, há presença somente de AgNP, que corresponde ao espectro do experimento 24, vindo de encontro com o comportamento apresentado pelos espectros UV-Vis.

A Figura 15 apresenta as distribuições de tamanho de partícula das AgNP sintetizadas pelo método do citrato para as amostras que apresentaram a confirmação da banda de absorção plasmônica de superfície (Figura 13). Portanto, pode-se notar que as distribuições são largas e bimodais, confirmando a necessidade da utilização de estabilizantes durante a síntese, pois as condições de curvas de distribuição largas pode ser o reflexo da agregação das nanopartículas. É possível observar na microestrutura por TEM que os agregados (A) confirmam a distribuição larga de tamanho de partícula para o experimento 4. Com relação ao experimento 24, pode-se verificar a

ocorrência de nanopartículas com tamanhos extremamente reduzidos na TEM (B), confirmando as características apresentadas pela distribuição de tamanho de partícula.

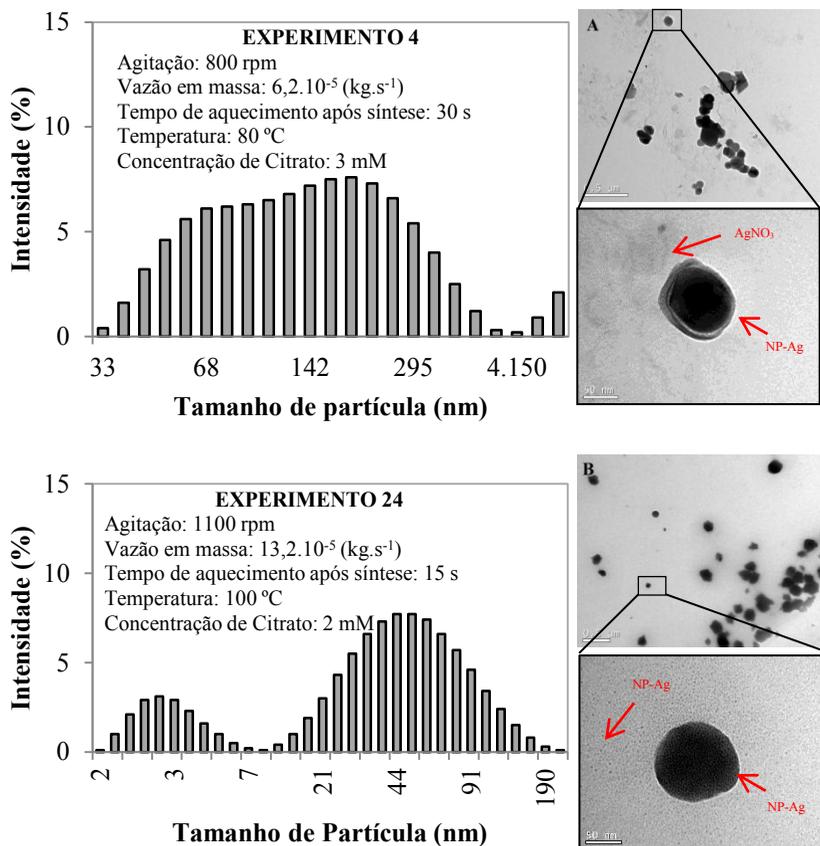
Figura 14 - Espectro de absorção UV-visível e microestruturas TEM das AgNP.

Inserto: Coloração das soluções de nanopartículas sintetizadas. A) micrografia das AgNP referente ao experimento 4; B) micrografia das AgNP referente ao experimento 24; c) micrografia das AgNP referente aos demais experimentos.



Fonte: do autor.

Figura 15 - Distribuições de tamanho de partículas da solução coloidal de AgNP sintetizadas por citrato de sódio



Fonte: do autor.

#### 4.1.2 Rota de síntese de AgNP com borohidreto de sódio

O planejamento experimental central composto, usando a metodologia de superfície de resposta foi usado também para elucidar os principais efeitos e as interações entre os fatores estudados: agitação, temperatura de síntese, vazão em massa e concentração de redutor na síntese de nanopartículas de prata com borohidreto de sódio. A análise de variância (ANOVA) foi usada para determinar a relação entre a resposta e as variáveis significativas, e estes resultados apresentaram

que o modelo foi significativo ( $F=9,63$  e  $p<0,05$ ). O ajuste indicou que o modelo quadrático (equação 10) foi válido para o estudo, através da análise de regressão ( $R^2=0,9267$ ). Os fatores e respostas experimentais e previstas referente aos valores de tamanho de partícula (nm) obtidos através do planejamento experimental são apresentados no Apêndice B (Tabela B1).

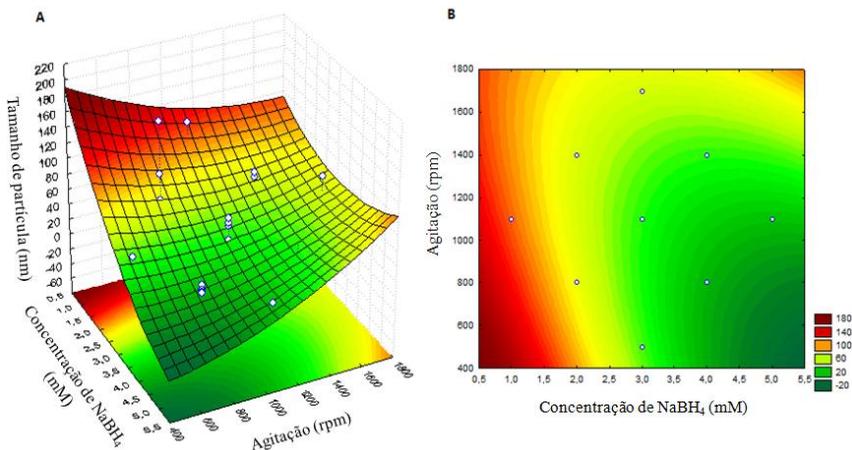
$$y = 46,8 - 1,75x_1 - 1,42x_2 - 5,92x_3 - 29x_4 + 2,19x_1x_2 + 4,98x_1x_3 + 8,85x_1x_4 + 8,56x_2x_3 + 0,8x_2x_4 + 5,65x_3x_4 + 3,81x_1^2 - 8,58x_2^2 + 0,96x_3^2 + 5,45x_4^2$$

(10)

Os gráficos foram usados para descrever os efeitos individuais e cumulativos das variáveis testadas e seus efeitos na resposta. Nas Figuras 16 a 18 são apresentados os gráficos da superfície de resposta (A) em um plano tridimensional e os contornos (B) em um plano bidimensional para o modelo de regressão dos dados.

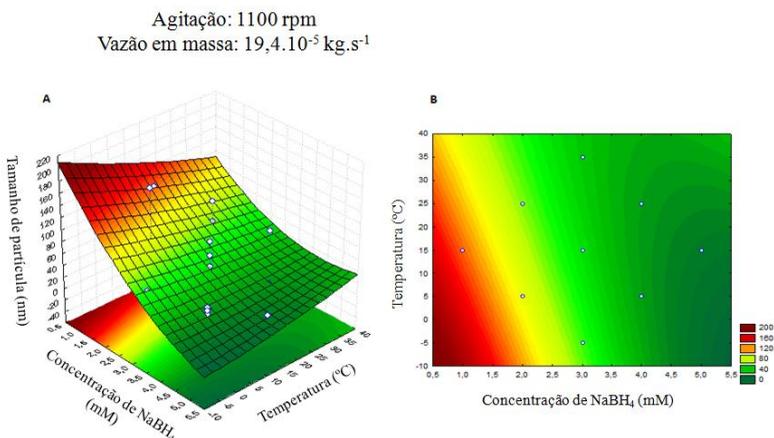
Figura 16 - Relação entre concentração de redutor (mM) e agitação (rpm) referente ao ponto +1 para o tamanho de partícula (nm). (A) superfície de resposta e (B) superfície de contorno.

Vazão em massa:  $25,6 \cdot 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$   
Temperatura:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



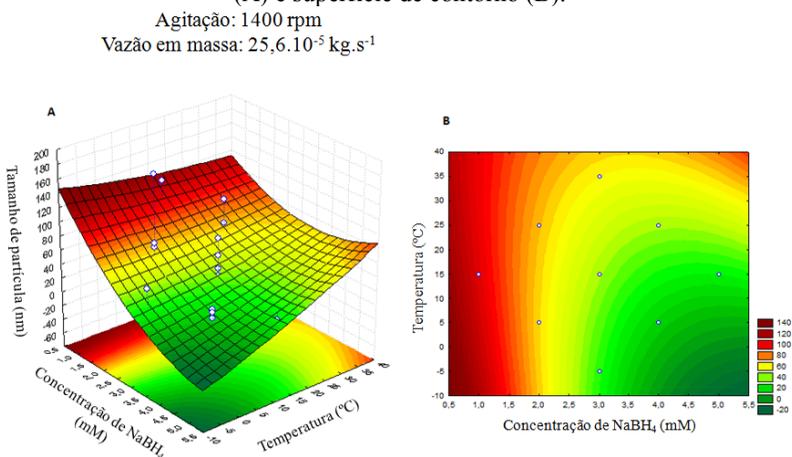
Fonte: do autor.

Figura 17 - Relação entre temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de redutor (mM) referente ao ponto central para tamanho de partícula (nm). Superfície de resposta (A) e superfície de contorno (B).



Fonte: do autor.

Figura 18 - Relação entre temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de redutor (mM) referente ao ponto +1 para tamanho de partícula (nm). Superfície de resposta (A) e superfície de contorno (B).



Fonte: do autor.

A resposta mínima para o planejamento experimental desenvolvido nesta etapa para a síntese de AgNP, usando borohidreto de

sódio como redutor, foi obtida considerando três faixas de tamanhos de partículas em diferentes condições, conforme apresentado na Tabela 6, e as respectivas regiões que minimizam a resposta do modelo empírico deste planejamento experimental.

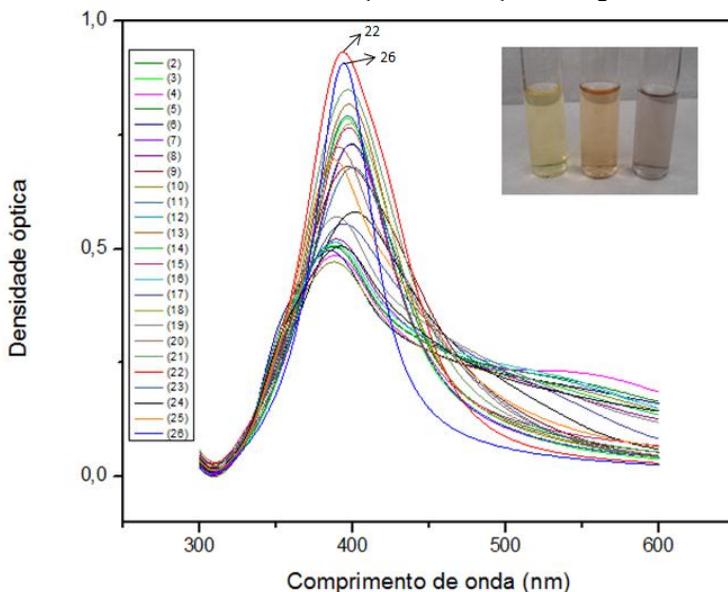
Tabela 6 - Características de tamanho de partícula com as respectivas condições otimizadas na síntese de AgNP com NaBH<sub>4</sub>.

Faixa de tamanho de partícula	Fatores experimentais			
	Agitação (rpm)	Vazão ( $\cdot 10^{-5}$ ) (kg.s <sup>-1</sup> )	Temperatura para síntese (°C)	Concentração de borohidreto (mM)
< 35 nm	1100	19,4	15	3
			35	
35 – 60 nm	1400	25,6	5	4
			15	
60 – 90 nm	500	31,7	25	2
				3

As determinações complementares das nanopartículas de prata são apresentadas na Tabela B2 (Apêndice B). O pH da solução de síntese através do método de redução química pelo borohidreto é alcalino, efeito dos produtos da hidrólise do BH<sub>4</sub><sup>-</sup>, (BH<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub><sup>-</sup>, BO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (VAN HYNING; ZUKOSKI, 1998), e se apresentou na faixa de 8,96 a 9,64. A análise de espectroscopia na região do UV-Visível foi realizada e, a partir dos valores de densidade óptica, obtêm-se importantes parâmetros, tais como, valor máximo de absorção óptica (A<sub>máx</sub>), comprimento de onda no máximo de absorção ( $\lambda_{máx}$ ) e largura à meia-altura (FWHH), conforme SOLOMONS et al. (2007) e SONG et al. (2009).

Os espectros UV-Visível das nanopartículas coloidais de prata preparadas a partir da redução química com NaBH<sub>4</sub>, determinadas pelo planejamento experimental, são apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Espectro de absorção UV-Visível das AgNP sintetizadas com  $\text{NaBH}_4$ . Inseto: diferentes colorações das soluções de AgNP sintetizadas.

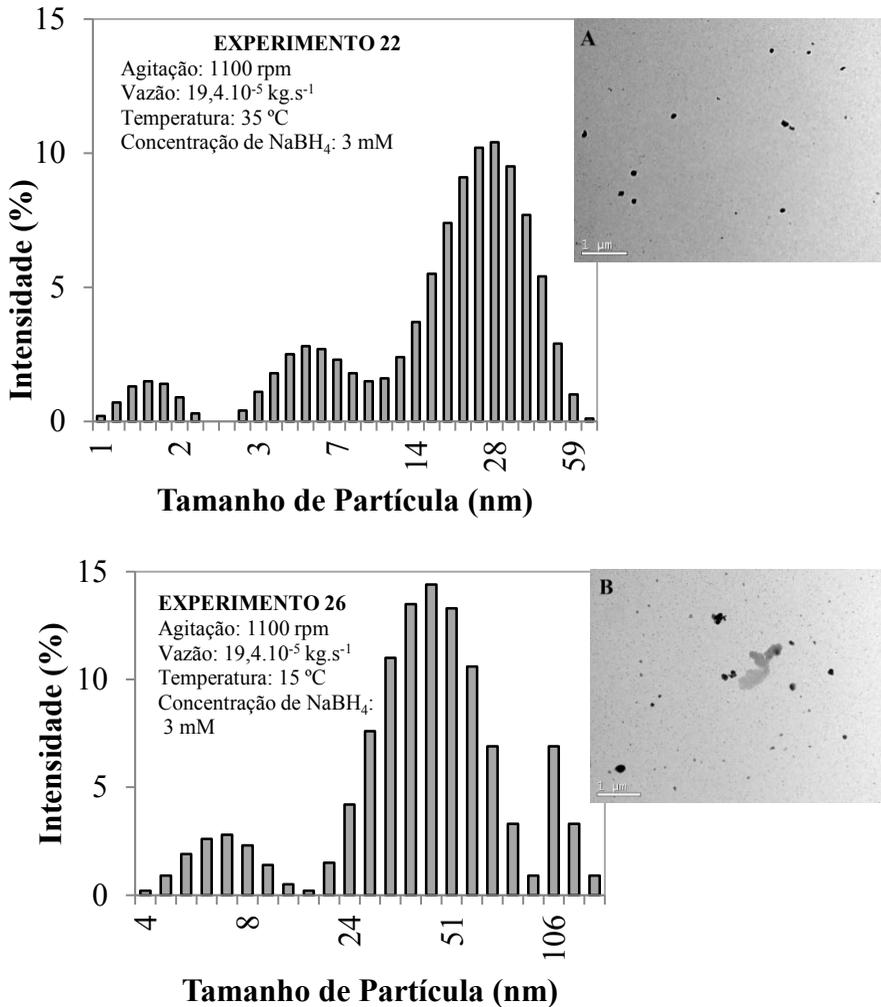


Portanto, todas as amostras de AgNP apresentaram pico característico de absorção plasmônica de superfície em torno de 400 nm de comprimento de onda, semelhante aos resultados de SONG et al. (2009) e LIM; LEE (2008), comportamento este indicativo da formação de nanopartículas.

É possível observar na Figura 19 que algumas amostras de nanopartículas de prata apresentaram maiores valores de absorbância na região característica em torno de 400 nm (em destaque picos 13, 21, 22, 26). Neste caso, os experimentos 7 e 13 apresentaram menor absorbância que os experimentos 21, 22 e 26. A redução da absorbância (em destaque pico 25) e o aparecimento de bandas em comprimento de onda de absorção em regiões maiores que 500 nm (em destaque pico 4), semelhante aos resultados obtidos por CARO et al. (2010), refletem o comportamento de agregação. Considerando os espectros das nanopartículas mais uniformes (experimento 22 e 26), as distribuições de tamanho de partículas desses dois experimentos são apresentadas na Figura 20. As amostras apresentaram tamanhos de partículas bem distintos, o que pode ser observado também nas microestruturas (TEM).

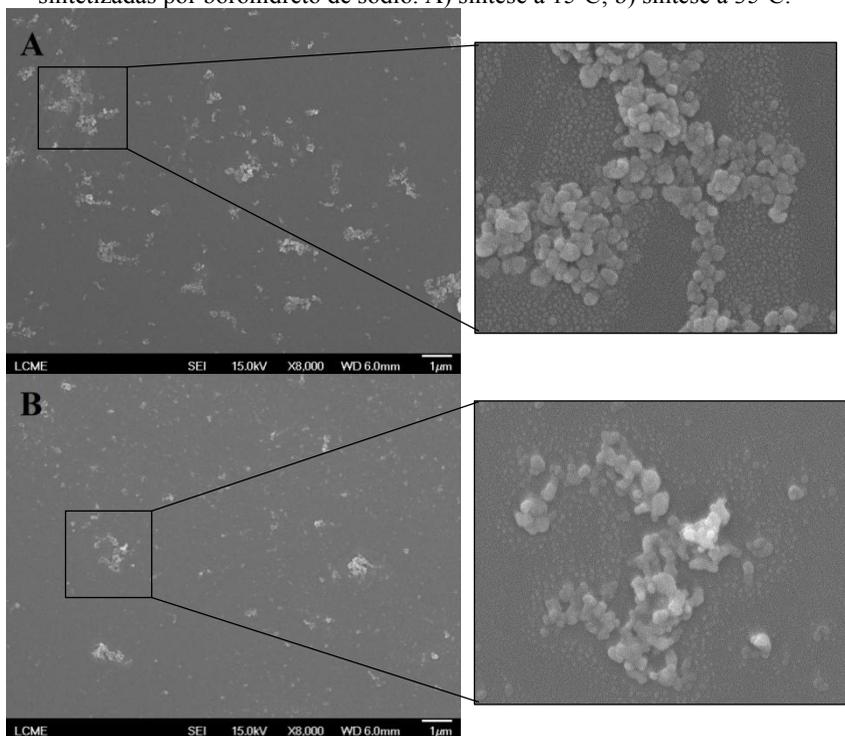
As amostras selecionadas e apresentadas na Figura 20 foram submetidas à análise de SEM-FEG como apresentado na Figura 21, sendo possível observar agregados maiores para a amostra sintetizada a 15 °C se comparada com a amostra sintetizada a 35 °C.

Figura 20 - Distribuições de tamanho de partículas e microestruturas (TEM) da solução coloidal de AgNP sintetizadas por borohidreto de sódio. A) 35°C; B) 15°C.



Fonte: do autor.

Figura 21 - Microestruturas por SEM-FEG das soluções coloidais de AgNP sintetizadas por borohidreto de sódio. A) síntese a 15°C; b) síntese a 35°C.



Fonte: do autor.

Tomando como comparação as duas rotas de sínteses de nanopartículas de prata aqui apresentadas vale ressaltar que:

1) Diante do processo de seleção da região ótima para minimizar a resposta (tamanho de partícula) do planejamento experimental para síntese de nanopartículas de prata através do método de redução por citrato, a condição ideal de vazão em massa é de  $13,2 \cdot 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$  e o tempo de aquecimento das soluções após a síntese é de 40 s, com temperatura de síntese de 100 °C, agitação de 1100 rpm e concentração de citrato de 3mM.

2) Com relação ao processo de seleção da região ótima para nanopartículas de prata sintetizadas através do método de redução por borohidreto, as condições ideais foram divididas de acordo com três faixas de tamanhos de partícula (Tabela 12). Tendo em vista de que o método sintetiza nanopartículas em média de 12 nm, escolhendo-se a

menor faixa de tamanho de partícula (< 35 nm) tendo-se, nestas condições, as seguintes características de seleção da região ótima desta síntese: vazão em massa de  $19,4 \cdot 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$ , velocidade de agitação de 1100 rpm, temperatura de 15 °C e 35 °C e concentração de  $\text{NaBH}_4$  de 3 mM.

#### 4.1.3 Nucleação das nanopartículas de prata

Antes do estudo de nucleação, propriamente dito, das nanopartículas de prata se fez necessário acompanhar os espectros de densidade óptica para as AgNP, considerando as temperaturas selecionadas de acordo com planejamento experimental prévio (Tabela B2 – Apêndice B). Tomou-se como base as rotas que apresentaram tamanhos de partícula < 35 nm, nas condições já apresentadas no item 4.1.2. De acordo com o estudo feito por Solomons et al. (2007), em que a redução química das nanopartículas de prata com borohidreto de sódio foi realizada a temperatura de 5 °C, verificou-se a necessidade de comparação entre os sistemas, combinados com a adição de diferentes quantidade de  $\text{AgNO}_3$  (2 a 10 mL) em termos de característica de região de absorção plasmônica de superfície e distribuição de tamanho de partícula.

Inicialmente é possível observar na Figura 22, os espectros de densidade óptica das AgNP sintetizadas à diferentes temperaturas (5, 15 e 35 °C), com as diferentes quantidades de  $\text{AgNO}_3$  adicionadas ao sistema.

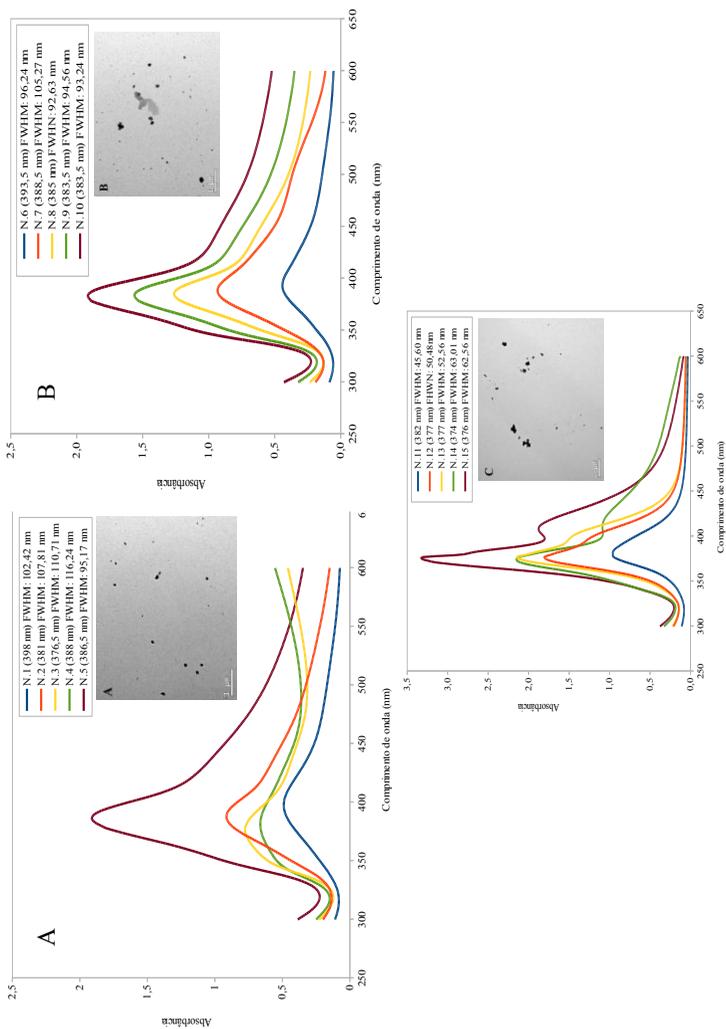
Na Figura 22A, os valores de comprimento de onda variaram de 376,5 a 398 nm, as larguras à meia altura variaram de 96,17 a 116,24 nm, e a formação de pico na região de absorção plasmônica de superfície de maior intensidade e a curva mais estreita à meia altura foram obtidas pela amostra N.5. Portanto, de acordo com esses resultados, não seria conveniente utilizar uma dosagem menor que 10 mL de  $\text{AgNO}_3$  1 mM na síntese das AgNP. A Figura 22B apresenta os espectros das AgNP sintetizadas a 35 °C. Os valores de comprimento de onda variaram de 383,5 a 393,5 nm, e as larguras à meia altura (FWHM) de 93,24 a 105,27 nm. As amostras N.8, N.9 e N.10 apresentaram menores valores para o parâmetro de FWHM. Vale ressaltar que nesta faixa de temperatura tanto as distribuições de tamanho de partícula quanto os espectros de UV-Vis apresentaram comportamento periódico, o que é muito interessante em termos de controle de síntese. É interessante observar que os perfis das amostras N.12, N.13, N.14 e N.15 (Figura 22C) apresentaram ombros acima de 400 nm no espectro

de UV-Vis, possivelmente pelo efeito de agregação acentuado durante as sínteses, apesar dos valores de comprimento de onda variarem de 374 a 382 nm e os valores de FWHM de 45,60 a 63,01 nm. Na temperatura de síntese de 5 °C, fenômenos de agregação mais acentuados, foram observados que aqueles de temperaturas de sínteses selecionadas pelo nosso planejamento experimental (15 e 35 °C), conforme espectros de densidades ópticas e caracterização por TEM.

Portanto, para avaliar o tipo de comportamento periódico observado no sistema de síntese à 35 °C, fez-se a relação entre o comprimento de onda e a quantidade de nitrato de prata adicionado aos sistemas de sínteses de AgNP, a qual é apresentada em valores médios na Figura 23. Os dados apresentam correlação exponencial, onde a diminuição da quantidade de AgNO<sub>3</sub> conduz a maiores comprimentos de onda. Comportamento semelhante foi analisado por Smitha et al. (2008), que avaliaram a adição de diferentes quantidades volumétricas de citrato de sódio, na redução química de nitrato de prata, para a produção de nanopartículas. Aqueles autores encontraram que o comprimento de onda na região de absorbância plasmônica de superfície mudou para menores comprimentos de onda, com menor volume adicionado de citrato, através de uma correlação linear. Tal comportamento, segundo os autores, é característica de diminuição no tamanho de partícula.

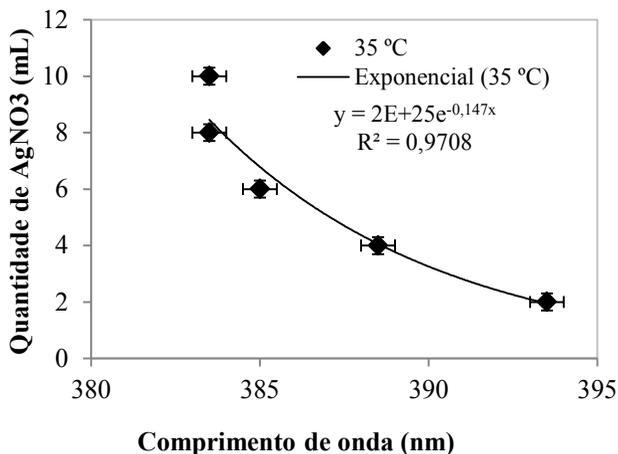
Na Figura 24 são apresentados os espectros que caracterizam o processo de nucleação das AgNP sintetizadas à temperatura de 35 °C. Pode-se observar que no início da adição do agente redutor no sistema (NaBH<sub>4</sub>) os picos apresentaram baixa intensidade, o que caracteriza reduzida formação de AgNP no sistema. Com o decorrer do tempo, à medida que o agente redutor é adicionado, a absorbância aumentou gradualmente de intensidade, a qual deve ser determinada ao aumento considerável na quantidade de prata reduzida. A intensidade da densidade óptica foi induzida até um ponto máximo, onde a partir de um dado volume (20 mL e 25 mL de AgNO<sub>3</sub> em destaque) esta intensidade diminui e o pico troca de posição para maiores comprimentos de onda. Segundo Luo (2007), a mudança do pico de absorção plasmônica de superfície a altos comprimentos de onda pode ser atribuída ao aumento de tamanho das partículas de prata. Para esses mesmos autores, com o tempo de reação decorrido, novos átomos de prata são gerados no sistema, e a nucleação ocorre com a concentração de átomos de prata que reagem a uma supersaturação crítica, resultando na formação de *nuclei*. O *nuclei* cresce até AgNP anexando outros átomos de prata livre.

Figura 22 - Espectros de absorção e distribuição de tamanho de partículas das AgNP em diferentes quantidades de  $\text{AgNO}_3$ . N.1) 2mL; N.2) 4mL; N.3) 6 mL; N.4) 8 mL; N.5) 10 mL de  $\text{AgNO}_3$ . (A) 15 °C; (B) 35 °C; (C) 5 °C.



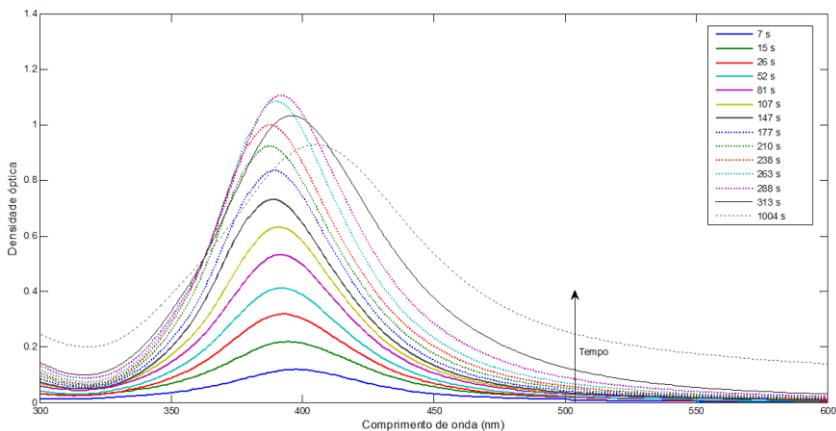
Fonte: do autor.

Figura 23 - Variações do comprimento de onda no pico de *plasmon* com a quantidade de nitrato de prata a 35°C.



Fonte: do autor.

Figura 24 - Espectros UV-Vis durante a síntese das AgNP a partir da redução do AgNO<sub>3</sub> com NaBH<sub>4</sub> à 35 °C.

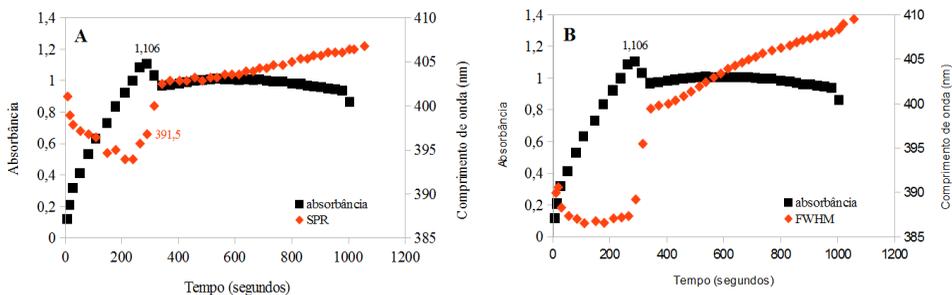


Fonte: do autor.

Para avaliar de maneira mais clara o processo de formação das AgNP em nosso processo de síntese, as medidas de absorbâncias e os picos de absorção plasmônica de superfície (SPR) foram plotados em relação ao período de tempo da síntese, conforme Figura 25. O

comportamento do pico de absorção plasmônica de superfície (SPR) e da largura à meia altura (FWHM) apresentado na Figura 25A e B, respectivamente, representam o processo de formação das partículas, as quais são largas no início da reação e sendo decompostas em partículas menores com o passar do tempo.

Figura 25 - Nucleação de AgNP à 35 °C. A) Curso da absorbância e SPR e B) curso da absorbância e FWHM através do tempo.



Fonte: do autor.

A redução de nitrato de prata usando borohidreto de sódio para formar uma concentração crítica de núcleos de sementes de prata podem ser explicado pela teoria de nucleação (KEATING et al. 2012). Esta teoria fundamenta o comportamento apresentado na Figura 25, onde é possível observar que as nanopartículas aumentam de tamanho para formar as sementes ou *nuclei*, apresentam tamanhos largos, mas ao serem quebradas sofrem uma redução de tamanho. Finalmente, o crescimento da partícula cessa e inicia-se o acréscimo a um momento da reação, sendo que este passa a ser caracterizado como agregação. Diante do exposto, optou-se em realizar a síntese das AgNP até nucleação máxima representada, neste caso, pelo valor máximo de absorbância (1,106 u.a.) que ocorre em 288 segundos.

#### 4.1.4 Estabilização das nanopartículas de prata

Os fatores, relação molar entre  $\text{NaBH}_4:\text{AgNO}_3$  e concentração de estabilizante (citrato de sódio, SDS e PVA), que podem influenciar na polidispersidade das amostras de nanopartículas de prata foram analisados através de um planejamento central composto. Os fatores, juntamente com as respostas experimentais e preditas referente aos

valores de polidispersidade obtidos através do planejamento experimental, são apresentados nas Tabela C1, C2 e C3 (Apêndice C), para os estabilizantes: citrato de sódio, SDS e PVA, respectivamente.

Os valores preditos para a polidispersidade variaram de acordo com as condições experimentais em questão, e as respostas preditas, para os três estabilizantes, se aproximaram dos valores experimentais, demonstrando que os modelos quadráticos foram aplicáveis para este estudo ( $p < 0,05$ ).

Os modelos quadráticos foram descritos com a relação matemática entre as variáveis independentes e a resposta nas equações (11), (12) e (13), para o uso dos estabilizantes citrato de sódio, SDS e PVA, respectivamente.

$$y = 0,27 - 0,09x_1 + 0,09x_2 - 0,13x_1x_2 + 0,07x_1^2 - 0,03x_2^2 \quad (11)$$

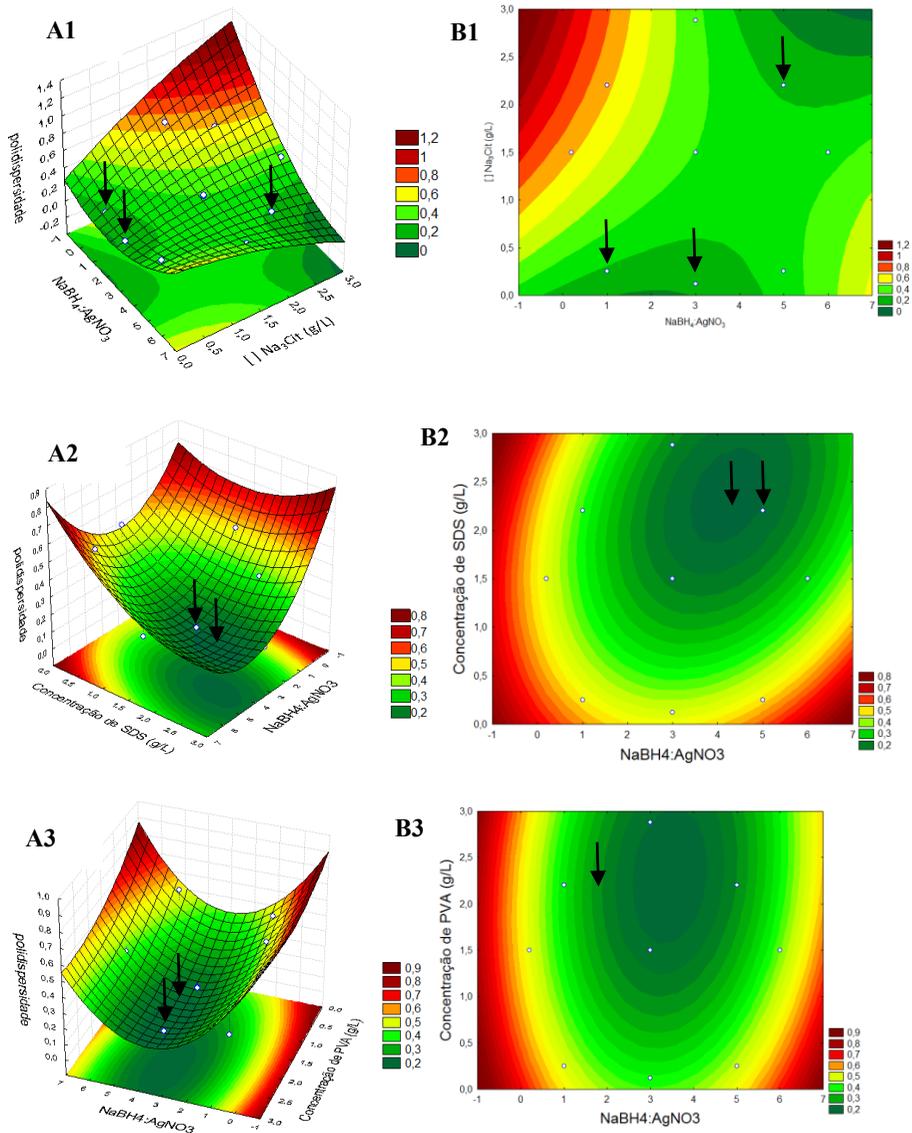
$$y = 0,22 - 0,05x_1 - 0,12x_2 - 0,05x_1x_2 + 0,09x_1^2 + 0,06x_2^2 \quad (12)$$

$$y = 0,23 - 0,03x_1 - 0,09x_2 - 0,02x_1x_2 + 0,12x_1^2 + 0,04x_2^2 \quad (13)$$

Para descrever os efeitos individuais e cumulativos das variáveis testadas e seus efeitos na resposta, gráficos foram utilizados para a apresentação e análise dos dados. Na Figura 26 são apresentados os gráficos da superfície de resposta (A) em um plano tridimensional e os contornos (B) em um plano bidimensional para o modelo de regressão dos dados, nas diferentes condições do planejamento experimental.

A resposta mínima, para o planejamento experimental desenvolvido no estudo utilizando citrato de sódio como estabilizante, foi obtida em três condições experimentais como destacado na Figura 26 (A1 e B1), acondicionado aos experimentos 1, 4 e 7 (Tabela 6). Considerando o planejamento experimental utilizando SDS como estabilizante, a resposta mínima foi obtida correspondente ao experimento 4 (Tabela 7) e a condição correspondente à relação molar  $\text{NaBH}_4:\text{AgNO}_3$  igual a 4 e concentração de SDS de 2,2 g/L, regiões em destaque na Figura 26 (A2 e B2). É possível observar na Figura 26 (A3 e B3) as respostas mínimas obtidas na utilização de PVA como estabilizante. Essas condições correspondem ao experimento 8 apresentado na Tabela C3 (Apêndice C), e a condição correspondente à fração molar  $\text{NaBH}_4:\text{AgNO}_3$  igual a 3 e concentração de PVA de 2,2 g/L.

Figura 26 - Relação entre concentração de estabilizantes e relação molar  $\text{NaBH}_4:\text{AgNO}_3$  em função da polidispersidade. Superfície de resposta (A) e de contorno (B). A1 e B1) citrato de sódio, A2 e B2) SDS, A3 e B3) PVA.



Fonte: do autor.

Medidas complementares foram realizadas para a condição otimizada do estudo da estabilização das AgNPs com citrato de sódio, SDS e PVA, estão apresentadas na Tabela C4 a C6 (Apêndice C).

Referente às AgNP estabilizadas por citrato de sódio, os valores de pH variaram de 9,60 a 10,06 e a condutividade elétrica das AgNP variaram de -78,70 a -145,8 mV. Este mesmo experimento, dos três experimentos selecionados no planejamento, apresentou o menor valor de largura à meia-altura referente ao valor máximo de densidade óptica (Tabela C4 – Apêndice C). As determinações referente às AgNP estabilizadas por SDS são apresentadas na Tabela C5 (Apêndice C), sendo que os valores de pH variaram de 9,12 a 9,66, de condutividade elétrica de -102,9 a 144,5 mV, do Z-médio de 9,88 a 155 nm. No parâmetro potencial zeta ocorreu variação de -15,0 a -30,5 mV. Na Tabela C6 (Apêndice C), referente às AgNP estabilizadas por PVA, os valores de pH variaram de 7,54 a 9,62, e a condutividade elétrica das AgNP variaram de -21 a -146,8 mV. É interessante considerar a característica do potencial zeta quando utilizou-se citrato como estabilizante (Tabela C4), que apresentou valor de -35,8 mV, o qual é o valor mais negativo obtido dentre todos os experimentos, o que representa a condição de maior estabilidade obtida no experimento. Segundo a literatura, a estabilidade de partículas em solução podem ocorrer quando o valor deste parâmetro é de  $\leq -30$  mV (ZETA-METER, 2012).

Portanto a utilização do citrato de sódio como estabilizante parece ser o mais adequado. Por isso, realizou-se o estudo da estabilidade sob refrigeração para verificação da eficiência dos estabilizantes aplicados (citrato de sódio, SDS e PVA). Para tal estudo as soluções coloidais de nanopartículas de prata foram avaliadas durante 45 dias sob refrigeração, e os perfis foram traçados em diferentes períodos por espectroscopia de UV-Visível para os três estabilizantes utilizados (citrato de sódio, SDS e PVA).

É possível observar na Figura 27 a intensidade da banda de absorção plasmônica dos experimentos selecionados pelo planejamento experimental, e dos estabilizantes das AgNP comparados com a amostra controle. Inicialmente, deve se observar que a amostra controle é extremamente instável, pois o pico de absorção plasmônica reduziu-se gradativamente ao longo do período de armazenamento. O comprimento de onda variou de 386 nm a 395 nm. A redução total na densidade óptica, na amostra controle, aos 45 dias de armazenamento, foi de aproximadamente 62 %, e a largura à meia altura aumentou aproximadamente em 3%.

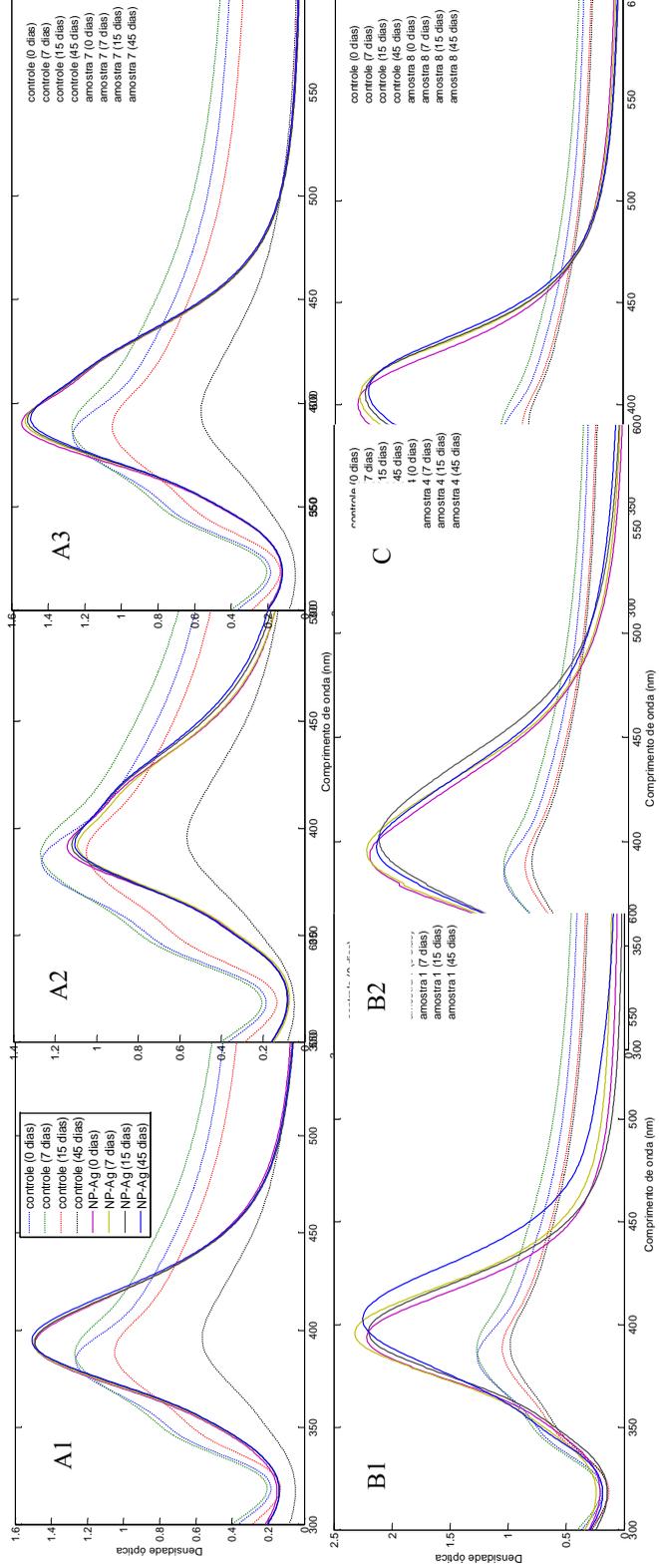
Na Figura 27 - A1, ao compararmos a amostra controle com a condição experimental 1 do planejamento com citrato de sódio, é possível observar que o valor de densidade óptica não sofreu redução após 45 dias. Portanto, este comportamento demonstra a eficiência do citrato de sódio em estabilizar as AgNP por este período de tempo. Analisando a Figura 27 (A2 e A3), observou-se que as condições de citrato de sódio utilizadas, se mostraram menos eficientes à estabilidade das AgNP, levando em consideração o aumento na largura da banda à meia altura, e redução da densidade óptica, além da presença de ombros acima de 400 nm.

Na Figura 27 - B1 é possível observar o comportamento das AgNP estabilizadas por SDS nas condições do experimento 1 durante os 45 dias, com redução da densidade óptica durante o período de tempo analisado. Há um aumento de aproximadamente 23% na largura à meia altura da banda de absorção plasmônica nesta condição. Os valores de comprimento de onda variaram de 394 a 403 nm. Referente à Figura 27 - B2, nas condições do experimento 4, é possível observar que ao longo do período de armazenamento das AgNP a densidade óptica reduziu ~2,5% e a largura à meia altura aumentou em torno de 5%. Os valores de comprimento de onda variaram de 393 a 400 nm.

É possível observar na Figura 27 C as curvas características para as soluções de AgNP estabilizadas com PVA, para o experimento 8, selecionado no planejamento experimental, durante o período de 45 dias. Em termos de densidade óptica, as amostras apresentaram uma redução de 4% e a largura da banda à meia altura aumentou ~7%.

Diante destas análises a partir da espectroscopia UV-Visível com o tempo é possível afirmar que a utilização do citrato de sódio, com as condições estabelecidas no experimento 1 do respectivo planejamento experimental, é a condição mais indicada em termos de estabilidade durante 45 dias sob refrigeração.

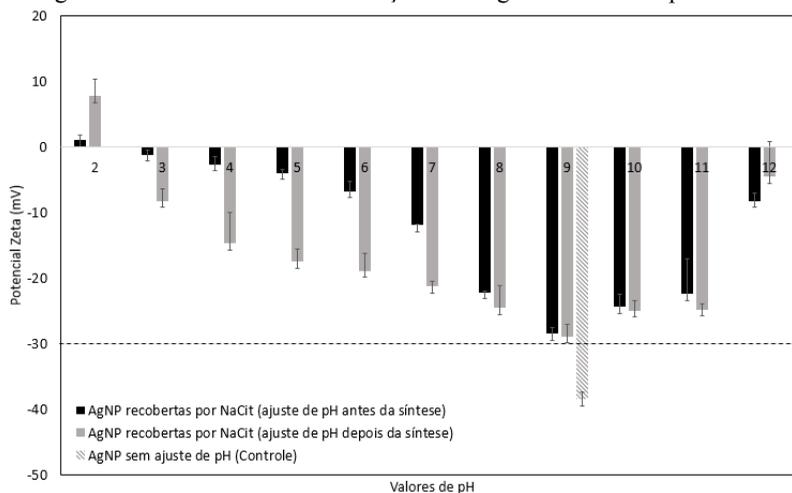
Figura 27 - Espectro de absorção UV-Visível das AgNP estabilizadas. A) citrato de sódio: 1) experimento 1, B) experimento 2, C) experimento3; B) SDS: 1) experimento 1, 2) experimento 4; C) PVA, experimento 8.



Fonte: do autor.

A partir disso, realizou-se o estudo da estabilidade das AgNPs recobertas com citrato de sódio sob diferentes pHs (1 a 13) através da medida do potencial zeta, já que a estabilidade das nanopartículas está relacionada à carga superficial. Os ajustes de pHs foram realizados antes e depois da síntese das nanopartículas. Os resultados das medidas de potencial zeta estão apresentados na Figura 28, e caracterizam que as AgNPs possuem superfície positiva em pH 2 e superfície negativa na faixa de pH de 3 a 12.

Figura 28 – Potencial zeta das soluções das AgNPs recobertas por NaCit.



Fonte: do autor.

A influência do pH no potencial zeta foi estudada por Long, Wu e Chen (2007) em nanopartículas de prata estabilizadas por oligoquitosana, as quais apresentaram uma faixa de 28 mV em pH 2,4 à -56 mV em pH 11. Sathishkumar e colaboradores (2009) apresentaram que o valor absoluto do potencial zeta negativo aumenta com o aumento do pH, fenômeno que pode estar relacionado à instabilidade das nanopartículas em pH ácido.

AgNPs comerciais foram avaliadas por Khan, Mukherjee e Chandrasekaran (2011), os quais obtiveram medidas de potencial zeta positivas em pH até 8 e acima deste, o potencial zeta tornou-se negativo. Prathna, Chandrasekaran e Mukherjee (2011) sintetizaram nanopartículas de prata com citrato de sódio obtendo valores de potencial zeta de -13,32 mV em pH 3 a -31,42 mV em pH 10. Tal fenômeno também foi

estudado por Kim et al. (2007), e, portanto, a carga negativa das nanopartículas podem ser atribuída aos íons borato e citrato adsorvidos na superfície das AgNPs. Valores de  $-40$  mV foram obtidos na faixa de pH de 2 a 12 para AgNP sintetizadas com citrato no estudo de Romer et al (2011).

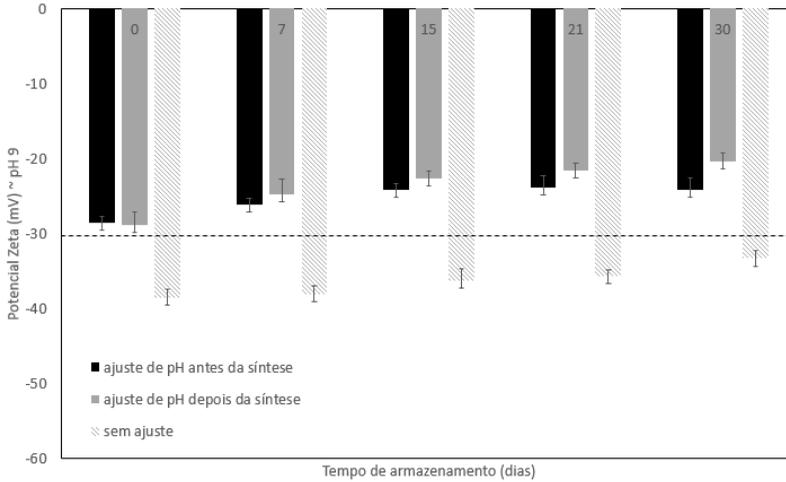
Em pH 9, as AgNPs apresentaram os maiores valores de potencial zeta. Os ajustes de pH antes e depois da síntese das nanopartículas não apresentaram diferença significativa nos valores de potencial zeta, os quais foram de  $-28,5$  mV e  $-28,9$  mV, respectivamente. E sem ajuste de pH (pH controle:  $9,6 \pm 0,4$ ) o valor medido foi de  $-38,5$  mV.

Segundo a literatura, o potencial zeta altamente negativo aumenta a força eletrostática repulsiva entre as partículas, e portanto, aumentando a estabilidade das AgNPs. Tal comportamento foi estudado a partir de nanopartículas de prata recobertas com exopolissacarídeos, as quais apresentaram alta estabilidade exibindo valores de referência de potencial zeta de  $-30$  mV em pH 10 (KHAN, MUKHERJEE E CHANDRASEKARAN, 2011b). Petica et al (2008) apresentam que valores de potencial zeta em torno de  $-18,2$  mV indicam uma fraca estabilidade da solução de AgNPs. Valores em torno de  $-30,5$  mV indicaram alta estabilidade e valores de  $-35,4$  mV do potencial zeta caracterizam a presença de uma carga elétrica na superfície das AgNP muito forte que dificulta a agregação.

Os resultados sugerem que a maior estabilidade das AgNPs é alcançada com o pH da síntese completada sem ajustes (pH 9,6). A relação entre estabilidade e altos valores negativos de potencial zeta também foram mencionados na literatura (PRATHNA, CHANDRASEKARAN E MUKHERJEE, 2011; RAO et al., 2013).

As amostras em ajustadas em pH 9 e o controle foram armazenadas por 30 dias para estudo da estabilidade da interação do estabilizante com a nanopartícula, como apresentado na Figura 29. Apesar do potencial zeta diminuir ao longo do tempo, e significando que as AgNPs perder a estabilidade, ainda assim, as nanopartículas sem ajuste de pH apresentam estabilidade acima da faixa de referência ( $-30$  mV).

Figura 29 – Potencial Zeta das AgNPs recobertas por NaCit depois da interação por 30 dias em pH 9,6±0,4.



Fonte: do autor.

## 4.2 HIDROFOBIZAÇÃO DAS AgNPs

Os efeitos e interações do volume ideal, tanto de ácido oléico quanto de ácido fosfórico, na transferência de fases das AgNP foram avaliados através de um planejamento experimental central composto. Um total de 10 experimentos foram realizados e os fatores referentes aos volumes de ácido oléico (0,1 a 4,1 mL) e de ácido fosfórico a 0,1 M (0,13 a 0,27 mL) mensurados.

A densidade óptica das nanopartículas de prata foi selecionada como resposta (Y). Portanto, para estimar a resposta, um modelo empírico polinomial de segunda ordem foi obtido (equação 14).

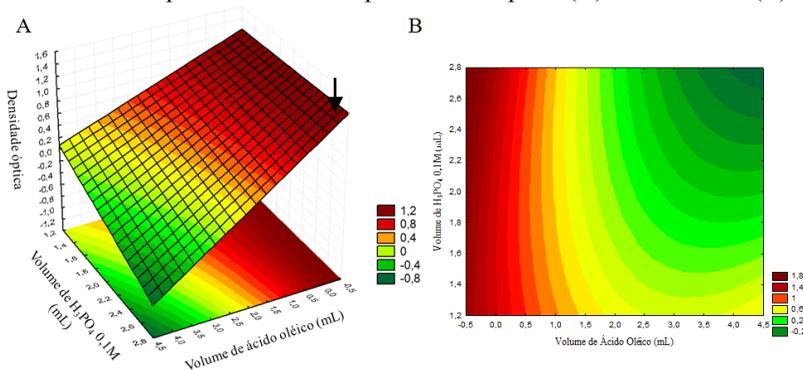
$$y = 0,38 - 0,52X_1 - 0,08X_2 - 0,11X_1X_2 + 0,15X_1^2 + 0,03X_2^2 \quad (14)$$

Os coeficientes foram calculados por análise de regressão e sua significância foi verificada usando análise de variância (ANOVA) com o software Statistics 7.0. Utilizou-se a análise de regressão para avaliar a significância estatística, o qual apresentou  $R^2 = 0,9379$ . Os valores preditos se aproximaram dos valores experimentais demonstrando que o modelo foi aplicável (Tabela D1 – Apêndice D). A ausência do pico

característico da absorção plasmônica de superfície identifica a ausência de transferência de AgNP, do meio aquoso ao meio orgânico.

Na Figura 30 são apresentados os gráficos de superfície de resposta (A) e os contornos (B) para o modelo de regressão dos dados, nas diferentes condições do planejamento experimental, em que ocorreu a transferência de fase das AgNP. A resposta máxima de densidade óptica obtida neste estudo corresponde ao volume de 0,1 mL de ácido oléico e 2,7 mL de  $H_3PO_4$  0,1M.

Figura 30 - Relação entre os volumes de  $H_3PO_4$  0,1M e ácido oléico em função da densidade óptica. Gráfico da superfície de resposta (A) e de contorno (B).



Fonte: do autor.

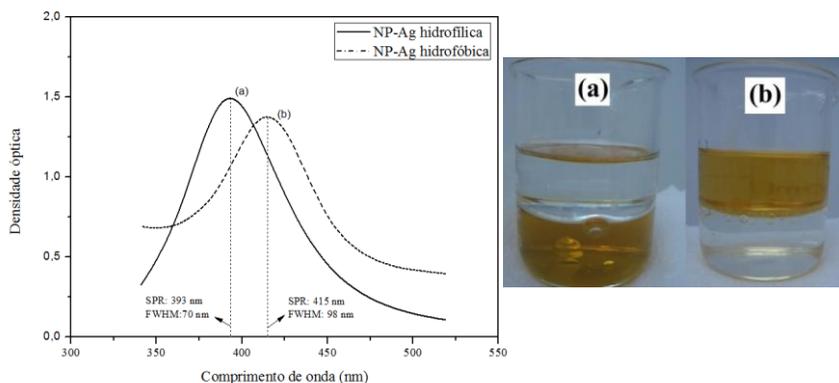
A Figura 31 apresenta as AgNP hidrofílicas em solução aquosa e AgNP hidrofóbicas em estireno. Em na Figura 31(A) temos as camadas imiscíveis das AgNP em meio aquoso (abaixo) e estireno antes da agitação. E, portanto, na Figura 31(B) as AgNP em estireno e solução aquosa (abaixo) depois da indução da transferência de fase por conversação do ácido oléico. A transferência das AgNP foi monitorada pela presença da banda de absorção plasmônica de superfície por espectroscopia UV-Vis. Observa-se que a absorvidade das AgNP hidrofóbicas é menor quando comparada com as AgNP hidrofílicas. A posição do pico SPR mudou para altos comprimentos de onda após a transferência das nanopartículas para o estireno.

A interação entre os componentes, possivelmente, está relacionada à quando o ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) é adicionado ao sistema, e, então, o grupo carboxilato do ácido oléico é convertido a ácido carboxílico o qual recobre a superfície da prata, por meio de ligação

coordenada (ligante monodentado ou quelato) e a 'cauda' hidrofóbica está diretamente direcionada ao meio do solvente (LI et al., 2002; SEO et al., 2008). E, portanto, a transferência de fase pode ser observada pela coloração amarela da fase orgânica e a perda de cor da fase aquosa depois da adição de ácido fosfórico. Observou-se que a absorptividade das NP-Ag hidrofóbicas é menor quando comparada com as NP-Ag hidrofílicas. A posição do pico SPR mudou para altos comprimentos de onda após a transferência das nanopartículas para o estireno.

A mudança nos espectros de UV-Vis após hidrofobização das NP-Ag pode não ser uma consequência do crescimento das nanopartículas depois da incorporação no estireno, mas, pode ser atribuída, através dos pressupostos da teoria de Mie, à mudança no índice de refração do ambiente e/ou pela interação dipolo-dipolo entre nanopartículas da vizinhança ao estireno. Possivelmente, a interação NP-Ag/estireno favoreceu o aumento do tempo livre médio entre as colisões entre as partículas, consequentemente diminuindo a densidade dos elétrons na superfície das partículas (SARKAR et al., 2009), e com isso, refletindo no aumento dos comprimentos de onda (Figura 30b), de 393 para 415 nm. Portanto, a transferência de fase das nanopartículas, do meio aquoso para o meio orgânico, via monômero estireno, foi possível pela indução do ácido oleico e ácido fosfórico.

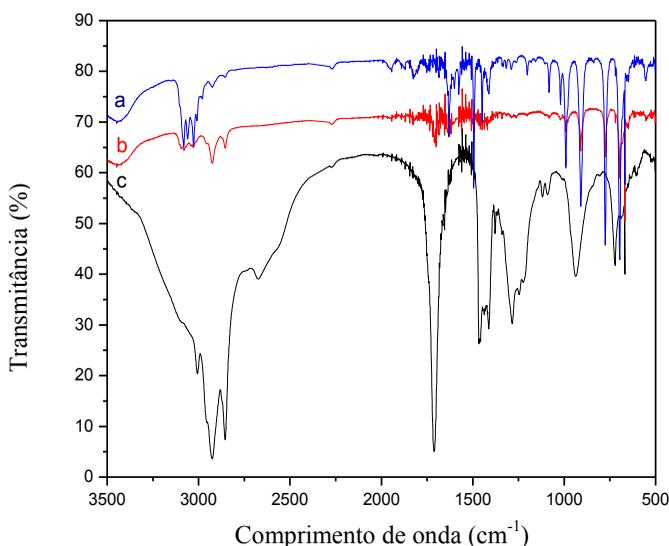
Figura 31 - Espectros e fases do processo de hidrofobização das AgNP. Em (a) camadas imiscíveis das AgNP em meio aquoso (abaixo) e estireno antes da hidrofobização. (b) NP-Ag em estireno e solução aquosa (abaixo) depois da hidrofobização.



Fonte: do autor.

A Figura 32 apresenta os espectros de infravermelho para as nanopartículas de prata em estireno, após o processo de hidrofobização (Figura 32), à nível de comparação também são apresentados os espectros do estireno e ácido oleico. Observa-se de um modo geral, que a adição das nanopartículas de prata no monômero estireno provou mudanças significativas nas bandas 3080 e 3027  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem à banda característica do anel aromático da molécula do estireno, e nas bandas 2925 e 2853  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem aos modos vibracionais de  $-\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  da molécula do ácido oleico. As mudanças observadas nestas regiões do espectro das nanopartículas em estireno diz respeito à intensidade, que podem estar relacionadas à interação entre o anel aromático do estireno e a cadeia carbônica do ácido oleico que recobre as nanopartículas de prata, indicando a compatibilidade entre monômero/ácido oleico/AgNP.

Figura 32 - Espectro de FT-IR de (a) estireno, (b) nanopartículas de prata recobertas por ácido oleico e (c) ácido oleico puro.

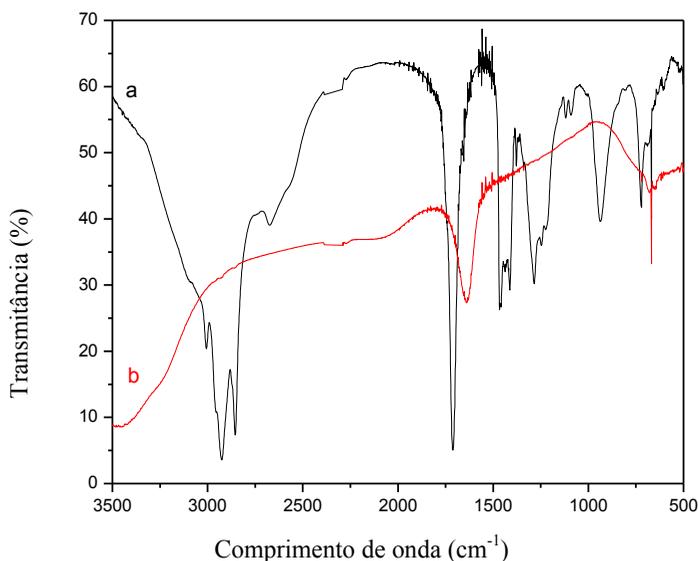


Fonte: do autor.

Para identificar o agente de recobrimento nas nanopartículas, o espectro de FT-IR das AgNP e do ácido oleico puro são comparados e são apresentados na Figura 33. O ácido oleico puro apresentou as bandas a 3006, 2925 e 2854  $\text{cm}^{-1}$ , características dos modos vibracionais de

=CH, -CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub> são claramente percebidos. Além disso, observando o espectro do ácido oleico, o pico a 1711 cm<sup>-1</sup> determina a vibração por estiramento de C-O e -OH, do dímero COOH, o qual está enfraquecido e deslocado no espectro das nanopartículas. Este deslocamento se deu para a banda a 1640 cm<sup>-1</sup>, o que corresponde à banda de estiramento COO<sup>-</sup>, correspondente à carboxilatos insaturados. Este comportamento confirma a presença de ácido oleico na superfície das nanopartículas, possivelmente via complexação carboxilato-metal (BROMBERG et al., 2010).

Figura 33 - Espectro de FT-IR de (a) ácido oleico puro e (b) nanopartículas de prata recobertas por ácido oleico.



Fonte: do autor.

#### 4.3 AUMENTO DE ESCALA DAS AgNPs

O aumento de escala das sínteses de AgNPs consiste na estimativa do comportamento do sistema, otimizado no item 4.1.2, em escala maior considerando os parâmetros de Z-médio e Potencial Zeta como padrões de resposta a partir dos experimentos em escala de laboratório. Na Tabela 7 são apresentados os experimentos referentes ao aumento de escala da síntese de AgNP.

Tabela 7 – Experimentos de aumento de escala da síntese de AgNPs.

Componentes	Escala de laboratório	Experimentos de aumento de escala		
		A	B	C
Concentração de AgNO <sub>3</sub> (mM)	1	1	1	1
Concentração de NaBH <sub>4</sub> (mM)	3	3	3	3
Proporção AgNO <sub>3</sub> :NaBH <sub>4</sub> (v/v)	1:3	10:30	15:10	15:8,35
Concentração de Na <sub>3</sub> Cit (g/L)	0,12	0,12	0,12	0,12
Temperatura (°C)	35	35	35	35
Agitação (rpm)	1100	700	700	700
Vazão (kg.s <sup>-1</sup> )	19,4	19,4	19,4	19,4
Z-médio (nm)*	28,8±0,7 <sup>a</sup>	34,5±1,4 <sup>b</sup>	51,8 ± 1,8 <sup>c</sup>	25,6±0,3 <sup>a</sup>
Potencial Zeta (mV)*	-28,6±0,4 <sup>a</sup>	-23,9±0,5 <sup>b</sup>	-12,5±0,8 <sup>c</sup>	-39,4±0,2 <sup>d</sup>
pH	9,9±0,2 <sup>a</sup>	9,8±0,1 <sup>a</sup>	9,7±0,2 <sup>a</sup>	9,5±0,1 <sup>a</sup>

\* valores médios ± desvio padrão. Experimentos realizados em triplicata. Medidas obtidas de ensaios realizados em triplicata. Valores dentro da linha distribuídos com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,01) por teste de separação de médias de Tukey.

Para os experimentos de aumento de escala as concentrações de AgNO<sub>3</sub>, NaBH<sub>4</sub> e Na<sub>3</sub>Cit foram mantidas conforme experimento realizado em escala de laboratório. A velocidade de agitação nas condições de aumento de escala foi reduzida pois, em 1000 rpm, conforme escala de laboratório, o agitador mecânico apresentou instabilidade de funcionamento. E as três proporções entre AgNO<sub>3</sub>:NaBH<sub>4</sub> em volume foram estabelecidas através de testes preliminares, e correspondem a escala 10 vezes aumentada. No experimento A considerou-se o aumento direto da condição de laboratório. No Experimento B considerou-se o aumento da quantidade de precursor em relação ao redutor. E no Experimento C reduziu-se a

quantidade de redutor. Tomando como base os parâmetros medidos, em relação ao Z-médio e potencial zeta, na escala de laboratório, os experimentos A e B no aumento de escala apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ), segundo teste de Tukey, nesses parâmetros. No entanto, o experimento C apresentou-se semelhante estatisticamente ( $p < 0,01$ ) nos dois parâmetros e justamente a condição ideal de aumento de escala foi estabelecida. Com o intuito de compreender a síntese das AgNPs com as alterações nas condições de aumento de escala realizou-se os experimentos de cinética de nucleação dos experimentos A, B e C.

Na Figura 34 são apresentados os espectros que caracterizam o processo de nucleação da síntese das AgNP em aumento de escala. A intensidade da densidade óptica foi induzida até o ponto máximo que corresponde a nucleação máxima - ponto final da formação de *nuclei* para a obtenção das AgNPs. A partir deste ponto o fenômeno de agregação das nanopartículas se inicia. Tal fenômeno foi fundamentado por Luo (2007) e Keating et al. (2012) e seguiu a mesma tendência na síntese em escala de laboratório (Figura 24 e 25). Tanto o Experimento A quanto o Experimento B apresentaram larguras de bandas maiores e regiões de agregação se comparadas com os espectros referentes ao Experimento C. Comprovando que, além do Experimento C apresentar características semelhantes entre Z-médio e Potencial Zeta para o experimento em escala de laboratório, a cinética de nucleação complementou a adequação desta rota para o aumento de escala da síntese das AgNPs.

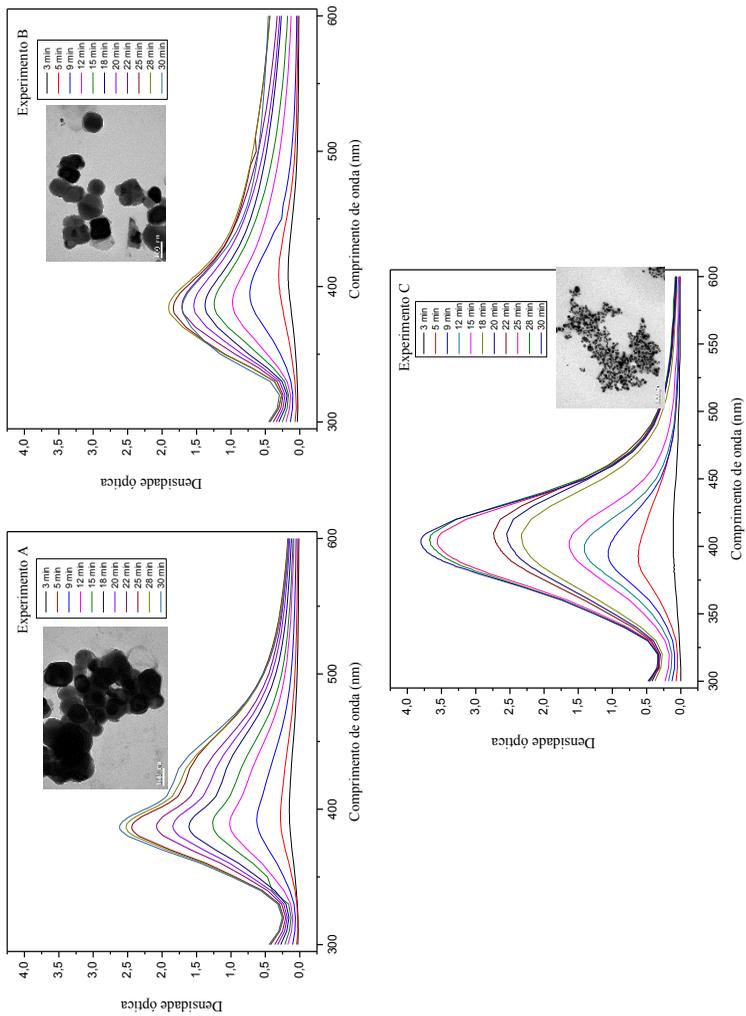
É possível observar também, na Figura 34 os detalhes da caracterização de microscopia eletrônica de transmissão dos experimentos de aumento de escala. A partir das micrografias são notados os fenômenos de agregação mais acentuados nos experimentos A e B do que no Experimento C, neste último foi observado os tamanhos menores das AgNPs sintetizadas. Pelo fato da velocidade de agitação ser reduzida nos experimentos de aumento de escala, uma nova condição em relação à proporção dos reagentes da síntese foram estudadas, já que o aumento de escala de laboratório ficou diferente significativamente das características do Experimento A. A velocidade de agitação da síntese de AgNP foi avaliada por Maestre-López et al. (2015), e os autores puderam avaliar que a taxa de agitação afeta diretamente a cinética de reação e consequentemente no processo de nucleação. No Experimento A, possivelmente a redução da velocidade de agitação diminuiu as colisões das partículas no meio reacional interferindo negativamente no processo de nucleação das AgNPs.

O excesso de  $\text{NaBH}_4$ , na síntese de AgNPs, é requerido para que ocorra a estabilização das AgNPs (SOLOMON et al., 2007) e a concentração tanto do precursor ( $\text{AgNO}_3$ ) de prata quanto de redutor ( $\text{NaBH}_4$ ) são muito baixas utilizando sínteses aquosas, e portanto, o processo de redução química é muito sensível à proporção dos reagentes (MANEERUNG, TOKURA e RUJIRAVANIT, 2008; YU, HUANG e TANG, 2011; CARDOSO et al, 2014). O valor de R ( $n^\circ$  total de mols de  $\text{BH}_4^-/n^\circ$  total de mols de  $\text{Ag}^+$ ) passa a ser um fator importante na formação dos centros de nucleação tanto na formação quanto no tamanho final das AgNPs (SOLOMON et al., 2007). O excesso de redutor foi mantido nos experimentos em aumento de escala, no entanto, a variação do valor de R possibilitou a obtenção de melhores condições para o Experimento C que apresentou um valor de R de 5, enquanto o Experimento A e B apresentaram valores de 9 e 6, respectivamente.

Segundo Zhang e Wu (2010) apud Cardoso et al. (2014), o aumento da proporção de  $\text{NaBH}_4$  está relacionado ao aumento do diâmetro médio da partícula devido à liberação de elétrons pelo agente redutor. Pois quando a quantidade de redutor é maior, o número de elétrons livres na solução aumenta e, portanto, diminui o potencial zeta a favor da agregação das AgNPs. Tal fato foi observado pelos resultados de potencial zeta, os quais confirmaram que os experimentos A e B estão abaixo do valor de referência  $\leq -30$  mV que confirma a estabilidade para as AgNPs. De acordo com Link, Wang e El-Sayer (1999) o aumento da densidade óptica de AgNP está relacionado com o aumento do número de partículas obtidas. Tal relação foi observada quando utilizou-se menores valores de R no experimento C de aumento de escala, que correspondem a menores números de mols de  $\text{NaBH}_4$  em relação ao  $\text{AgNO}_3$ . Yu, Huang e Tang (2011) apresentam que valores de R em torno de 5 são favoráveis para que o precursor (íons Ag) possa ser totalmente consumidos e portanto, impedindo os processos de agregação.

Os valores de pH dos experimentos não foram diferentes ( $p < 0,01$ ) estatisticamente e semelhanças nestes resultados foram obtidas por Polte et al. (2012). Os autores afirmam que aumentos de pH 9 para 11 comprovam a formação de espécies secundárias ( $\text{B}(\text{OH})_4^-$ ) provenientes do agente redutor, gerando intermediários  $\text{BH}_2(\text{OH})_2^-$  e  $\text{BH}(\text{OH})_3^-$ , e que na presença de prata este fenômeno é acelerado, promovendo a diminuição da estabilidade das AgNPs. Tendo em vista que nossos experimentos não atingiram pH 11 acredita-se que estes fenômenos secundários puderam ser controlados.

Figura 34 – Espectros de UV-Vis referente à cinética de nucleação dos experimentos de aumento de escala para síntese de AgNPs. Detalhe: Micrografias de TEM das AgNPs sintetizadas em aumento de escala. Magnificação: 150 000 vezes.



Fonte: do autor.

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR AAS

A Espectrometria de Absorção Atômica foi empregada para quantificar o teor de prata nas soluções de AgNPs.

A Tabela 8 apresenta os níveis de concentração de prata das soluções de AgNP sob condições experimentais otimizadas usando como redutores citrato de sódio, borohidreto de sódio, ambas em escala de laboratório. Além das condições otimizadas no aumento de escala considerando as concentrações de 1 e 10 mM de AgNO<sub>3</sub>.

O teor de prata foi determinado a partir da diluição das soluções de AgNP de 20 vezes. Os dados experimentais foram ajustados a partir de uma curva de calibração com 0,5 a 4 mg.L<sup>-1</sup>, a qual apresentou um coeficiente de correlação de 0,9998 (Apêndice G, Tabela G1). A equação da regressão linear foi  $A = 0,1519C_{Ag} + (1,9 \times 10^{-3})$  (n=5) onde  $C_{Ag}$  é a concentração de Ag em mg.L<sup>-1</sup> e  $A$  é a absorbância.

Tabela 8 - Concentração de AgNP determinada por espectrometria de absorção atômica.

AgNPs	Condição	Concentração
Síntese com NaBH <sub>4</sub>	Síntese com NaCit	22,18 ± 0,03 mg.L <sup>-1</sup>
	Escala de laboratório	27,18 ± 0,21 mg.L <sup>-1</sup>
	Aumento de escala (15:8,35)(1mM de AgNO <sub>3</sub> )	32,06 ± 0,02 mg.L <sup>-1</sup>
	Aumento de escala (10 mM de AgNO <sub>3</sub> )	35,49 ± 0,33 mg.L <sup>-1</sup>

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES DE AgNPs

##### 4.5.1 Teste de difusão

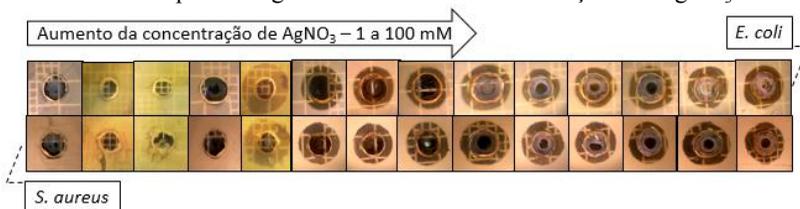
Foram realizados testes preliminares para a verificação da atividade antimicrobiana das AgNPs sintetizadas em aumento de escala utilizando o teste de difusão através da formação de halos de inibição para as bactérias *E. coli* e *S.aureus*. Utilizando-se o precursor nitrato de prata na concentração de 1 mM não foi possível observar atividade antimicrobiana das AgNPs e portanto, realizou-se os experimentos com o aumento de concentração em série do precursor para avaliar tanto a formação das AgNP quanto sua atividade em relação às bactérias mencionadas. Os resultados e imagens dos halos de inibição estão apresentados como valores médios na Tabela 9 e Figura 35, respectivamente.

Tabela 9 – Valores médios dos halos de inibição e desvio padrão das AgNP sintetizadas por aumento de escala.

Concentração de AgNO <sub>3</sub> (mM)	Halos de inibição (mm)*	
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	-	-
1,5	-	-
2	-	-
5	-	-
10	12,0 ±0,2	10,0 ±0,1
20†	7,3±0,1	8,3±0,1
30†	6,0±0,1	8,7±0,1
40†	6,5±0,1	7,5±0,0
50†	6,3±0,1	7,8±0,0
60†	6,3±0,0	8,5±0,1
70†	5,8±0,0	7,8±0,0
80†	6,8±0,0	8,0±0,1
90†	8,0±0,0	8,8±0,1
100†	8,8±0,1	8,8±0,0

\* zona de inibição corrigida (diâmetro da área de inibição - diâmetro do poço), medidas em triplicata. †Ocorrência da precipitação de prata metálica.

Figura 35 – Comparação dos halos de inibição entre as bactérias *E.coli* e *S.aureus* para as AgNPs em diferentes concentrações de AgNO<sub>3</sub>.



Fonte: do autor.

O crescimento de *E.coli* e *S.aureus* não foram afetados para as concentrações de 1, 1,5, 2 e 5 mM de AgNO<sub>3</sub> utilizadas na síntese das AgNPs, pois o halo de inibição ao redor dessas amostras não foi observado. Entretanto, halos de inibição variaram de 5,8 a 12,0 mm para *E.coli* e de 7,5 a 10 mm para *S.aureus* e foram observados claramente em torno das amostras com concentrações de AgNO<sub>3</sub> acima de 10 mM, mesmo ocorrendo a precipitação de prata iônica. De acordo com a literatura, a propriedade antimicrobiana da prata está relacionada à quantidade de prata e a taxa de prata livre (LANSDOWN, 2002;

CARTELLANO et al., 2007), o que pode justificar que as menores concentrações utilizadas de  $\text{AgNO}_3$  (1 a 5 mM) não foram ideais para que ocorresse a inibição do crescimento bacteriano.

AgNPs sintetizadas com diferentes estabilizantes por Litvin e Minaev (2013) também apresentaram atividade antimicrobiana, a qual foi observada pela formação de halos de inibição que variaram de  $6,3 \pm 1,0$  a  $13,5 \pm 0,4$  mm para *E.coli* e halos de  $8,2 \pm 0,2$  a  $23,1 \pm 0,6$  mm para *S.aureus*. Mathew e Kuriakose (2013) também observaram que as AgNPs recobertas como soroalbumina bovina apresentaram atividade antimicrobiana para *E.coli* (24 mm de halo), *S.aureus* (26 mm de halo) entre outras bactérias, e que a medida dos halos de inibição são eficientes indicadores deste parâmetro.

Segundo a literatura, a atividade antimicrobiana das AgNPs é resultado da interação dos íons prata com três componentes principais das células bacterianas: a camada peptidoglicana e membrana plasmática, DNA e proteínas bacterianas, particularmente enzimas (CHALOUPKA, MALAN e SEIFALIAN, 2010). A prata no seu estado metálico é inerte mas se reage com a umidade de tecido ou fluidos celulares ela fica ionizada. A prata ionizada é altamente reativa, uma vez que se liga à proteínas e traz alterações estruturais à célula bacteriana no que se refere à parede celular e membrana celular conduzindo a célula à deformação e morte (LANSDOWN, 2002; CARTELLANO et al., 2007). O mecanismo da prata está ligado com sua interação com compostos com grupamentos tióis encontrados nas enzimas responsáveis pela cadeia transportadora de elétrons das células bacterianas. A prata liga-se à parede celular bacteriana e membrana celular e inibe os processos de respiração (KLASEN, 2000).

Mesmo com a precipitação de prata na forma iônica (20 a 100 mM) foi possível observar a inibição do crescimento bacteriano e segundo a literatura, a atividade antimicrobiana da prata iônica também é possível. Os autores comentam que o mecanismo de ação da prata iônica ainda não está propriamente entendido mas o efeito pode ser observado pelas alterações estruturais e morfológicas das bactérias. É sugerido que quando moléculas de DNA estão em estado relaxado a replicação do DNA pode ser facilmente conduzida. Mas quando o DNA está na forma condensada ele perde a capacidade de replicação. E, quando a prata iônica penetra na célula bacteriana está forma condensada é assumida e portanto há a morte da célula. E o mecanismo de que os metais pesados reagem com proteínas atacando os grupos tióis e as proteínas anativando-as, também é sugerido (LIAU et al., 1997; FENG et al., 2000).

A solução de AgNP que apresentou maior atividade antimicrobiana foi a com concentração de 10 mM de  $\text{AgNO}_3$  para as duas bactérias estudadas. E, portanto, esta concentração foi a aplicada para a sequência das investigações deste estudo. Acima de 10 mM de  $\text{AgNO}_3$  obteve-se uma precipitação de prata iônica, o que é indesejável para a obtenção de nanopartículas.

#### 4.5.2 Concentrações mínimas inibitória (CMI) e bactericida (CMB)

A susceptibilidade bacteriana das AgNPs foi avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI), também denominada de concentração mínima bacteriostática e concentração mínima bactericida (CMB). Geralmente, o método de concentração mínima é utilizado para se quantificar o teor necessário do antimicrobiano para inibir ou matar um microrganismo. Considera-se CMI a menor concentração de uma substância capaz de inibir o crescimento microbiano e CMB, a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9% (CLSI, 2008).

Na Tabela 10 são apresentados os resultados das CMI e CMB para as soluções de AgNPs. Uma menor CMI corresponde a uma alta eficiência bacteriana. Concentrações de AgNPs que variaram de 2 a 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram incubadas com as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *S. TYPHIMURIUM* em meio de cultura Mueller-Hinton (MH).

O crescimento microbiano foi observado através da inspeção visual da turbidez do meio de cultura. Esta técnica foi usada também por Sambhy et al. (2006), e os autores relacionam a falta de turbidez corresponde a um crescimento bacteriano muito baixo (efeito bacteriostático) ou morte bacteriana (efeito bactericida).

Observou-se turbidez a partir da concentração de 14  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AgNP para *E.coli* e *S. TYPHIMURIUM*, ambas Gram-negativas. E, para *S.aureus*, que se trata da bactéria Gram-positiva, a turbidez foi observada na concentração de 7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para estabelecer se as AgNP possuem efeito bacteriostático ou bactericida, spots de 10  $\mu\text{L}$  das soluções que não apresentaram crescimento bacteriano na CMI foram dispostos em placas com agar MH. O agar MH foi utilizado para as bactérias Gram-positivas e agar MacConkey para as Gram-negativas. As placas foram incubadas a  $36\pm 1$  °C por 24 h, e as colônias foram contadas.

Tabela 10 – Comparação da atividade antimicrobiana (CMI e CMB) das AgNPs.

AgNP ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	<i>E.coli</i> ATCC 25922		<i>S.aureus</i> ATCC 02923		<i>S.aureus</i> ATCC 25923		<i>S.</i> <i>TYPHIMURIU</i> <i>M</i> ATCC 14028	
	CMI	CMB** (UFC.mL <sup>-1</sup> )	CMI	CMB (UFC.mL <sup>-1</sup> )	CMI	CMB (UFC.mL <sup>-1</sup> )	CMI	CMB (UFC.mL <sup>-1</sup> )
2	+	ND*	+	ND	+	ND	+	ND
3	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND
5	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND
7	+	ND	-	ND	-	$6.10^4$	+	$>3.10^5$
9	+	ND	-	ND	-	$2.10^3$	+	$2.10^4$
10	+	ND	-	ND	-	$2.10^2$	+	$7.10^3$
12	+	ND	-	ND	-	<b>0</b>	+	<b>0</b>
14	-	$1.10^3$	-	ND	-	ND	-	ND
16	-	$7.10^2$	-	ND	-	ND	-	ND
18	-	2	-	ND	-	ND	-	ND
20	-	<b>0</b>	-	ND	-	ND	-	ND

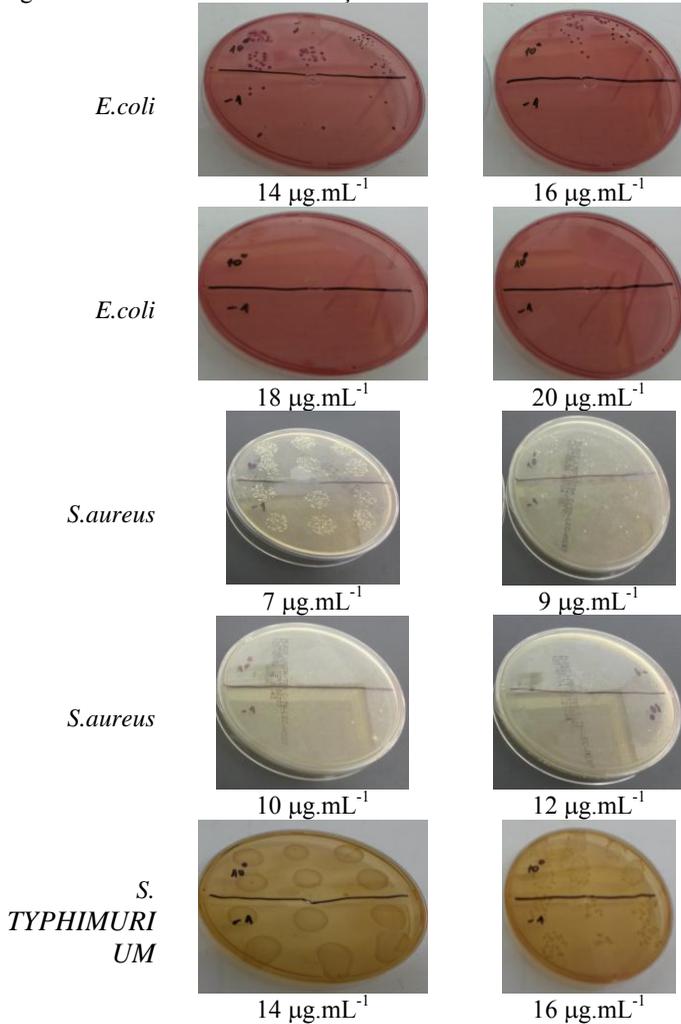
(+): Crescimento do microrganismo. (-) Inibição do crescimento do microrganismo.  
\*ND – Não determinado. \*\* valores médios das contagens de seis *spots* nas diluições bacterianas de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ .

Como a CMI para *S.aureus* foi a mesma para ambas cepas utilizadas (ATCC 02923 e 25923), optou-se por utilizar somente a cepa ATCC 25923 por questões de disponibilidade em estoque para utilização. Segundo Sambhy et al. (2006), colônias bacterianas indicam a presença de bactéria viável nas alíquotas que foram plaqueadas e, portanto, o efeito é bacteriostático. Ausência de crescimento de colônias caracteriza o efeito bactericida. A CMB, através da contagem de colônias é apresentada tanto na Tabela 9. E a redução da quantidade de colônias com o aumento da concentração de AgNP pode ser observado na Figura 36.

As bactérias Gram-negativas se mostraram mais resistentes à ação das AgNPs sintetizadas em nosso estudo, o que apresenta-se em desacordo com a teoria que considera a estrutura celular de tais bactérias, por terem a camada peptidoglicano mais fina que as Gram-positivas, logo as Gram-negativas deveriam apresentar menor

resistência. Nossos resultados demonstram a possibilidade de que outro mecanismo seja o fator limitante para a ação das AgNP de maneira mais eficiente para as Gram-positivas, o qual deverá ser melhor avaliado em trabalhos futuros.

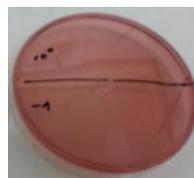
Figura 36 – Ensaio de Concentrações Mínima Inibitória e Bactericida.



*S.*  
*TYPHIMURI*  
*UM*



18 µg.mL<sup>-1</sup>



20 µg.mL<sup>-1</sup>

Fonte: do autor.

Os mecanismos da ação inibitória nas AgNPs apresentados por Sondi e Salopek-Sondi (2004) estão relacionados com a liberação de íons Ag das nanopartículas, e esses diminuem a habilidade da replicação do DNA da célula bacteriana e favorecem a perda de proteínas celulares. Esses Ag<sup>+</sup> ligam-se a grupos funcionais de proteínas (tióis), resultando na desnaturação protéica. Morones et al. (2005) e Feng et al. (2000) estudaram que as nanopartículas tendem a reagir com proteínas que contêm grupamentos derivados do enxofre no interior das células, assim como os compostos que contêm fósforo tal como DNA. Estes seriam os sítios preferenciais para as reações com as AgNPs. As mudanças na morfologia apresentadas na membrana da bactéria, é um possível dano causado pelas nanopartículas que reagem como DNA, afetando os processos respiratórios da bactéria, e divisão celular, finalmente causando a morte da célula.

Kim et al. (2011) e Fayaz et al. (2010) afirmam que AgNPs tem menor efeito antimicrobiano nas bactérias Gram-positivas que nas bactérias Gram-negativas, pelo fato das diferenças na parede celular dessas bactérias. Esses autores ainda afirmam a teoria de que pelo fato das bactérias Gram-positivas possuírem uma camada de peptídeoglicano mais espessa, composta por uma rede tridimensional de peptídeos a estrutura é mais rígida e as AgNPs tem maiores dificuldades de penetração, ainda mais quando se trata de AgNP com superfície carregada negativamente. Kim et al. (2011) também comprovam que mudanças na superfície celular bacteriana Gram-negativa acontecem pelo aumento de permeabilidade da prata nas células, e que nessas mudanças morfológicas, a superfície celular apresenta fragmentos formados pelos danos causados na membrana. Esses fragmentos, portanto, podem ser produtos derivados da perda do conteúdo citoplasmático nas células danificadas. Estudos mostraram que a inibição das bactérias Gram-positivas é muito dificultada quando as AgNPs são aplicadas sozinhas tendo superfície carregada

negativamente, e portanto, é sugerido o uso cooperativo de antibióticos (FAYAZ et al., 2010).

Em se tratando de cargas superficiais, a literatura relata que a atração eletrostática entre células bacterianas que possuem superfície carregada negativamente e, nanopartículas que possuem cargas positivas na superfície, é o fator crucial para a atividade da AgNP como material bactericida (EL-BADAWY ET AL., 2011; KHAN E TAL. 2011; SOO-HWAN ET AL., 2011; SILVA ET AL., 2014). A barreira de energia potencial foi levantada como a hipótese de atuar como um fator limitante para a atividade antimicrobiana das AgNP (VECITIS et al., 2010; EL BADAWY et al., 2011). Entre a superfície biológica e AgNP, tal barreira, necessita ser removida no sentido das partículas poderem interagir quimicamente com os receptores das moléculas dentro do envelope celular (parede celular e/ou membrana celular) e/ou com o conteúdo celular seguido da permeação das nanopartículas para dentro da célula (EL BADAWY et al., 2011).

O efeito de adesão de AgNP na superfície das bactérias depende de alguns fatores importantes: composição da superfície da célula bacteriana e das AgNPs, além dos fatores do meio como força iônica e pH (ABBASNEZHAD, GRAY E FOGHT, 2008). A carga superficial negativa das bactérias é originada da ionização de grupos carboxila, fosfato ou amino grupos e a adsorção de íons da solução. Além disso, outras macromoléculas estão presentes na parede celular e membranas, por exemplo: proteínas, fosfolípidios, ácido teicóico, ácido teicurônico, ácido murâmico e lipopolissacarídeos também contribuem para a carga global bacteriana (POORTINGA et al., 2002; KLODZINSKA ET AL., 2010; EL-BADAWY ET AL., 2011), e de acordo com alguns estudos essas macromoléculas tem papel significativo na adesão de compostos na superfície bacteriana e também ajuda na diferenciação dos microrganismos (TSUNEDA et al., 2004; EBOIGBODIN et al., 2006). É apresentado, por alguns autores, que a bactéria Gram-negativa tem carga superficial negativa maior que as bactérias Gram-positivas, essas diferenças foram detectadas através da medida do potencial zeta (SONOHARA et al., 1995).

Klodzinska et al. (2010) realizaram as medidas de potencial zeta para *E.coli* e *S.aureus* e encontraram os maiores valores para *E.coli* e, conseqüentemente, os dados de distribuição de potencial zeta foram representados por um único pico, que representou uma perfil de distribuição de cargas uniformes na superfície da bactéria Gram-negativa. Uma situação oposta foi observada para as espécies de *S.aureus*, caracterizadas por um potencial zeta relativamente baixo. Os autores afirmam que tal observação é consistente com a tendência

natural do *S.aureus* para formação de *clusters*. Estas espécies de bactérias formam aglomerados instáveis, os quais são representados por vários picos na distribuição de potencial zeta. E, portanto, apresentam um perfil de distribuição de cargas não uniforme.

Silva et al. (2014) recobriram AgNPs com diferentes substâncias, dentre elas citrato de sódio, o qual confere a carga negativa à AgNP (-20,08 mV) e a força de interação com a *E.coli* (-11 mV) foi considerada baixa. AgNPs positivas (+28,8 mV) apresentaram alta atração com a bactéria e as AgNP recobertas por poli(vinil pirrolidona) (-7,49 mV) conferiram uma baixa carga negativa na superfície, e assim apresentou alta repulsão. Abbaszadegan et al. (2015) sintetizaram três diferentes AgNPs por diferentes métodos, promovendo três diferentes cargas elétricas de superfície (positiva, neutra e negativa). A atividade antimicrobiana dessas nanopartículas foram testadas contra as bactérias Gram-positivas (*S.aureus*, *S.mutants* e *S.pyogenes*) e Gram-negativas (*E.coli* e *P.vulgaris*). Os autores afirmaram que as AgNPs carregadas positivamente foram efetivas contra as bactérias estudadas. Em contraste, para as AgNPs neutras e carregadas negativamente, apresentaram os menores halos de inibição e maiores concentrações mínimas inibitórias indicando um potencial antimicrobiano inferior comparado com as nanopartículas positivas.

Khan, Mukherjee, Chandrasekaran (2012) sintetizaram AgNPs e avaliaram a atividade antimicrobiana contra *Aeromonas punctata*, as quais exibiram superfície carregada negativamente em pH 9, deste modo, há um alto grau de repulsão entre as AgNP carregadas negativamente e as células bacterianas, a qual forma uma barreira eletrostática que limita as interações célula-partícula reduzindo a adsorção. Ao reduzir o pH o potencial zeta gradualmente muda para positivo, a barreira eletrostática é reduzida a qual aumenta a possibilidade das interações célula-partícula e a favorece a força eletrostática de atração das AgNPs na superfície negativa da bactéria.

Uma questão que necessita ser discutida é a forma de como as AgNPs atuam como material biocida contra bactérias Gram-negativas, no caso a *E.coli* e Gram-positivas, no caso de *S.aureus*, já que a literatura é ambígua nesses mecanismos no que se relaciona à interação desses microrganismos com AgNP carregadas negativamente como as obtidas neste trabalho.

Estudos relatam que a carga positiva presente na superfície das AgNPs pode representar as pequenas quantidades de íons Ag liberados da superfície das nanopartículas (MORONES ET AL., 2005; YEN, HSU E TSAI, 2009; AHAMED, ALSALHI E SIDDIQUI, 2010; SHAMELI ET AL. 2012). Neste caso, Magaña et al. (2008) modificaram

Montmorillonita com prata, e os íons prata carregados positivamente favoreceram a morte celular da *E.coli* pela interação eletrostática entre bactéria e partícula. Segundo Maneerung, Tokura e Rujiravanit (2008) esses íons prata causam o efeito prolongado da atividade antimicrobiana. Sondi e Salopek-Sondi (2004) afirmam que o efeito antimicrobiano das AgNP nas bactérias Gram-negativas depende da concentração de Ag nas nanopartículas. O aumento na concentração de AgNP (10, 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) causaram um atraso no crescimento de *E.coli*. Tal atraso também foi relacionado pelos autores à utilização de meio de cultura em meio líquido. As células bacterianas da *E.coli* apresentaram mudanças e grandes danos, os quais foram caracterizados como o aparecimento de cavidades na parede celular. Soo-Hwan et al. (2011) afirmam que AgNPs carregadas negativamente acumulam na membrana bacteriana aumentando a permeabilidade. E, Sondi e Salopek-Sondi (2004) confirmaram por análise de TEM que as nanopartículas se acumularam na membrana celular, enquanto que algumas penetraram com êxito na célula. Além de que a perda de material intracelular e coagulação de AgNP na superfície da bactéria também foi observada. Este processo é governado pela interação das nanopartículas com substâncias intracelulares das células destruídas, causando sua agregação das AgNPs. Amro et al (2000) apresentaram que depleção de metal pode causar a formação de cavidades irregulares na membrana externa, modificando a permeabilidade da membrana, a qual é causada pela progressiva liberação dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana. Yen, Hsu e Tsai (2009) afirmam que o potencial zeta da superfície pode impactar a extensão de aglomeração das nanopartículas e a ligação destas com as proteínas celulares bacterianas.

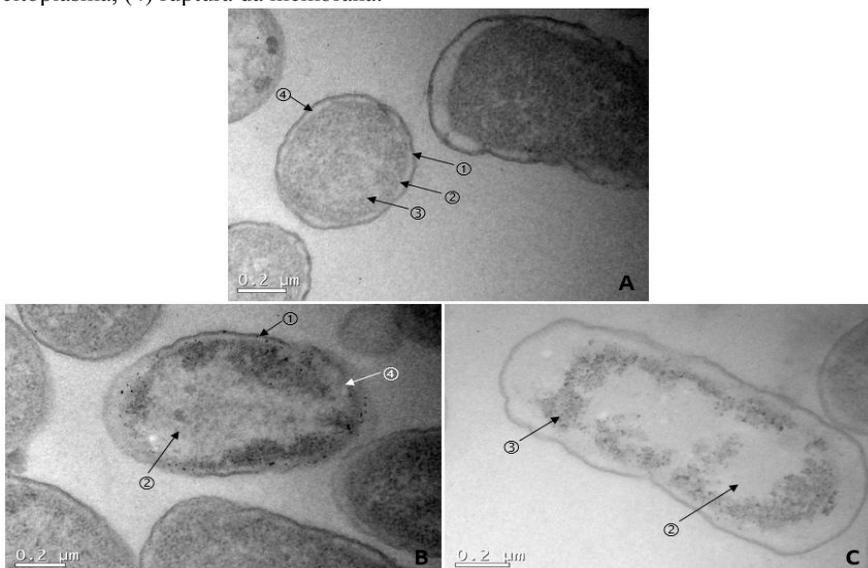
Em relação ao efeito antimicrobiano das AgNPs em *S.aureus*, bactéria Gram-positiva, Mirzajani et al. (2011) apresentam, através da análise de TEM, a destruição do peptidoglicano que constitui a parede celular bacteriana desta Gram-positiva depois do tratamento com AgNPs. O estudo realizado por esses autores indicou que a porção de peptídeo do peptidoglicano que foi tratado com AgNPs sofreu variação estrutural, no caso dos filamentos de glicano. Esses filamentos de glicano do peptidoglicano foram destruídos e ocorreu a liberação de ácido murâmico no meio de cultura (ácido murâmico é um indicador de biomassa bacteriana). Com tais informações fornecidas por esses autores, as AgNPs puderam fazer a conexão com ambos os lados das porções de peptídeo e glicano e gerar cavidades na parede celular bacteriana. As AgNPs atacam a ligação  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 do N-acetilglucosamina e filamentos glicano de ácido N-acetilmurâmico, destruindo as ligações e liberando-os para o meio. Os autores concluem que, o fator principal

para a inibição do crescimento bacteriano, é a formação de cavidades na membrana celular da bactéria, permitindo a penetração das AgNP nas células. Acredita-se que tal mecanismo fundamenta a obtenção dos nossos resultados no sentido da obtenção de maior eficiência antimicrobiana das AgNP ocorreu para o *S. aureus* (Gram-positiva).

Portanto, as AgNP sintetizadas em nosso estudo são carregadas negativamente como caracterizado através da medida do potencial zeta (-35,4 mV). Enquanto o mecanismo de interação entre essas nanopartículas e a interação entre Gram-negativas e Gram-negativas não está muito claro, pois há poucos resultados semelhantes aos nossos na literatura, mesmo tendo superfície negativamente carregadas, as AgNP de alguma maneira interagem com os elementos de constituição da membrana bacteriana, causando mudanças estruturais nas células bacterianas. Está claro que as bactérias tratadas com AgNP apresentam mudanças significativas e danos na membrana, as quais são reconhecidas pela análise de TEM (Figuras 37-39), e que as AgNP se acumularam próxima à parede celular. Tal acúmulo de AgNP permitiu maior desestruturação da parede celular das bactérias.

Figura 37 – Células bacterianas de *E.coli*.

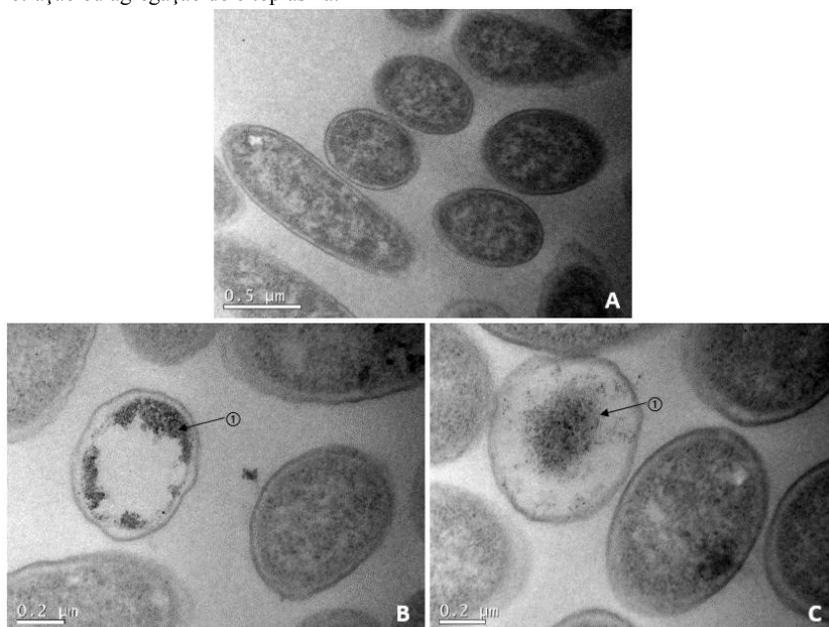
(A) Células não tratadas com AgNP: (1) parede celular, (2) membrana celular, (3) citoplasma, (4) espaço periplásmico. (B) e (C) Células tratadas com AgNP: (1) AgNP na membrana (2) retração do citoplasma, (3) agregação do citoplasma, (4) ruptura da membrana.



Fonte: do autor.

Figura 38 – Células bacterianas de *S. TYPHIMURIUM*.

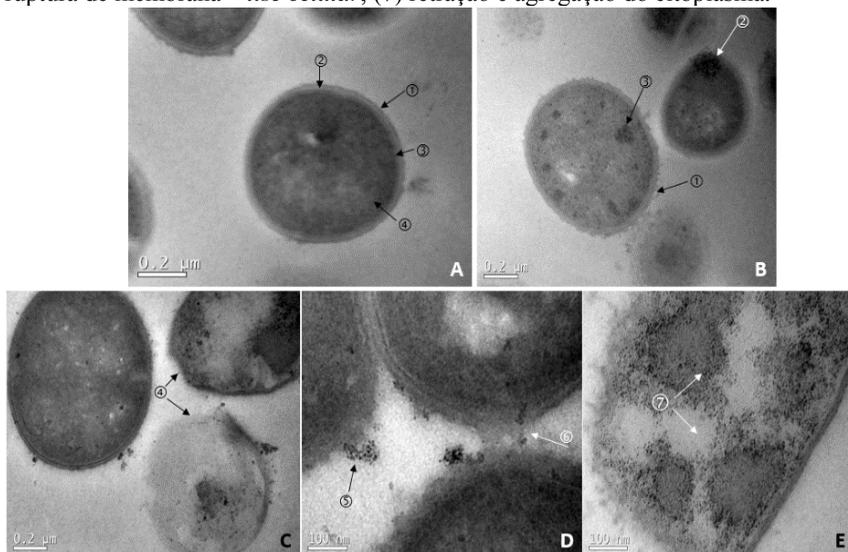
(A) Células não tratadas com AgNP (B) e (C) Células tratadas com AgNP: (1) e (2) retração ou agregação do citoplasma.



Fonte: do autor.

Figura 39 – Células bacterianas de *S. aureus*.

(A) Células não tratadas com AgNP: (1) parede celular, (2) peptidoglicano, (3) membrana plasmática, (4) citoplasma. (B) a (E) Células tratadas com AgNP: (1) membrana filamentosa, (2) AgNP através da membrana, (3) AgNP agregadas no citoplasma, (4) ruptura da membrana, (5) agregado de AgNP, (6) ruptura de membrana – *lise celular*, (7) retração e agregação do citoplasma.



Fonte: do autor.

Além do que, a perda de substâncias intracelulares (Figura 39 D, por exemplo), retração/agregação do citoplasma e a agregação das nanopartículas na superfície e interior da bactéria (Figura 38 C e 39 B) podem ser observados. Tais mudanças na membrana bacteriana podem ser reconhecidas como a formação de cavidades segundo Sondi e Salopek-Sondi (2004), que relatam que esta morfologia exibe um aumento significativo na permeabilidade, fazendo com que as células bacterianas sejam incapazes de regular corretamente o transporte através da membrana plasmática e, finalmente, causando a morte celular.

Como pode-se observar nas imagens de TEM, as AgNP se acumularam em torno das células bacterianas, e, portanto, pode-se reconhecer que o dano é mais susceptível nas Gram-positivas, pois as CMI foi menor para essas bactérias, e os danos celulares são mais evidentes.

## 4.6 OBTENÇÃO DO NANOCOMPÓSITO POLIESTIRENO/AgNP

A etapa de obtenção do nanocompósito PS/Ag foi dividida em duas fases: inicialmente realizou-se a etapa da polimerização em massa para obtenção de Filmes de PS/Ag compreendendo os testes preliminares para a verificação da eficiência da atividade antimicrobiana das AgNPs ao serem incorporadas no polímero. E, na segunda fase, foram obtidos os nanocompósitos EPS/Ag via polimerização em suspensão. Em ambas as fases as AgNPs foram incorporadas no monômero, via reação de hidrofobização apresentada nos itens 3.3 e 4.2.

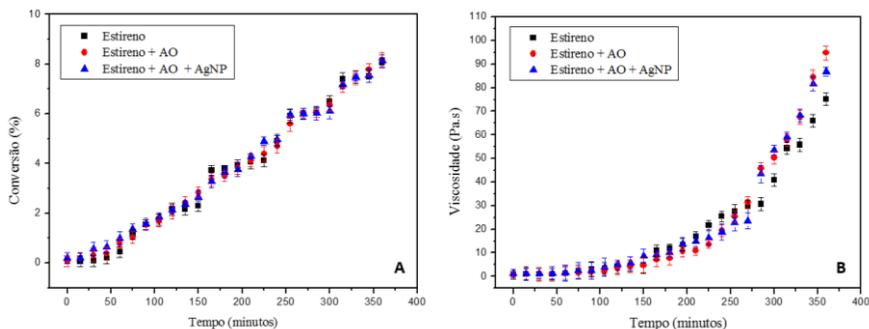
### 4.6.1 Polimerização em massa – Filmes

Antes da obtenção dos filmes de PS/Ag, a polimerização em massa foi realizada considerando no sistema somente estireno, AgNPs e ácido oleico (AO). Devido à mudanças na viscosidade, pela adição do AO, verificou-se a necessidade de analisar a cinética de polimerização a 90 °C a fim de verificar se a influência do AO na cinética de polimerização do estireno.

Ao longo do tempo de polimerização de 6h, todas as amostras apresentaram-se como fluidos newtonianos, e neste caso a tensão cisalhante varia linearmente com a taxa de cisalhamento, conforme equação (5). Caso haja uma área entre as curvas ascendentes e descendentes de tensão por taxa de cisalhamento, denomina-se esta área de histerese, e diz-se que o fluido é dependente do tempo (MALKIN; ISAYEV, 2006). Os valores das viscosidades foram obtidos através da equação (5), pelos dados de tensão de cisalhamento (Pa) *versus* taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ ). A Figura 40 apresenta os resultados da evolução da conversão e viscosidade do meio em função do tempo de polimerização, para sistemas estirênicos adicionados de AO e AO + AgNP.

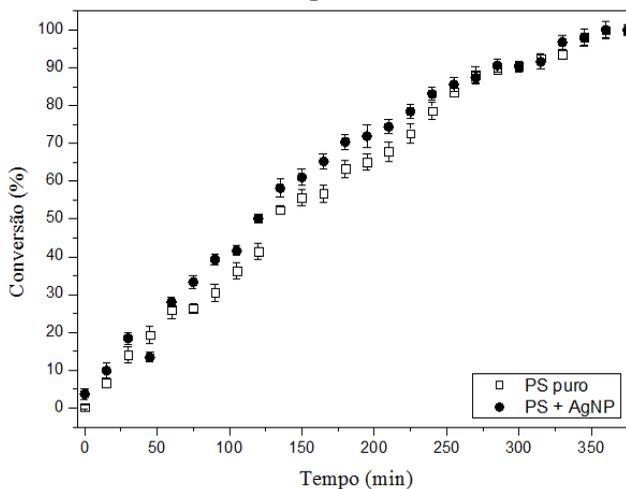
Não houve diferença significativa em termos de conversão global para os três sistemas estudados a 90 °C por 6h, mesmo a partir de 280 minutos em que observou-se um aumento significativo da viscosidade quando utilizou-se AO e AgNP. E, portanto, analisou-se a influência das AgNPs na reação de polimerização em massa do poliestireno através da realização de reações cinéticas. A Figura 41 apresenta a cinética de conversão da polimerização em massa obtida através da técnica de gravimetria para a obtenção dos filmes de poliestireno com e sem AgNP, conforme descrito no item 3.9.7 considerando a proporção das AgNP de 1:2 conforme Tabela 5.

Figura 40 – Conversão e Viscosidade do sistema de polimerização em massa (polimerização térmica). (A) Perfil de conversão, (B) Perfil de viscosidade.



Fonte: do autor.

Figura 41 – Cinética da polimerização em massa do PS puro e aditivado com AgNP.



Fonte: do autor.

A reação de polimerização do estireno é altamente exotérmica e, como decorrer da reação, a viscosidade do meio reacional aumenta rapidamente, reduzindo o coeficiente de transferência de calor. E, portanto, o aumento na viscosidade também causa o aumento da taxa de reação devido ao efeito gel. A conversão do monômero estireno através da polimerização em massa na presença de AgNP foi maior quando o estireno puro foi polimerizado, durante 240 minutos de reação. Depois deste período de tempo, que corresponde a partir de 255 minutos com

85% da conversão atingida, a adição das AgNP não causou diferença significativa na reação de cinética do poliestireno. A Tabela E1 (Apêndice E) apresenta os intervalos de tempo em que as amostras foram tomadas e a conversão atingida em cada um dos poliestirenos obtidos.

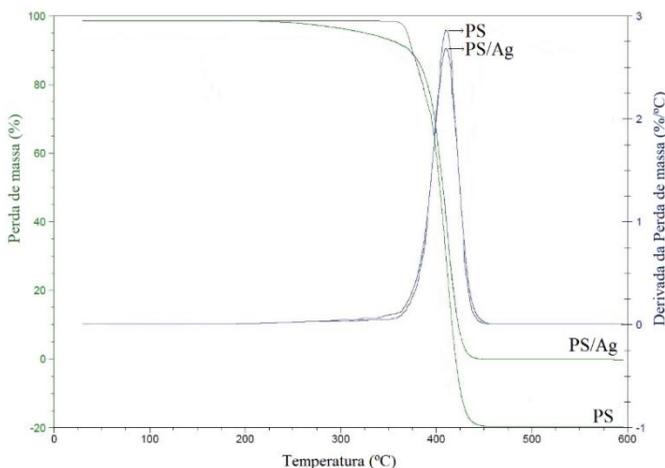
Em seguida, procedeu-se com os experimentos para a obtenção dos filmes, os quais foram obtidos a partir do procedimento descrito no item 3.5.2. Os filmes de PS puro foram obtidos com uma espessura de  $0,47 \pm 0,08$  mm e os filmes de PS aditivado com AgNP, na proporção 1:2 (Tabela 5), apresentaram espessura de  $0,42 \pm 0,07$  mm. A concentração de prata incorporada tanto no estireno quanto no filme foi determinada por espectroscopia de absorção atômica, conforme descrito no item 3.9.13, e obteve-se a concentração de  $5 \pm 0,07$  g de Ag/100g de estireno e  $0,08 \pm 0,01$  g de Ag/100 g de material polimérico.

Tais filmes foram caracterizados através das análises termogravimétricas (TGA), calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia de infravermelho (FTIR) e atividade antimicrobiana. Os resultados dessas caracterizações são descritos a seguir.

As curvas de Termogravimetria e suas derivadas para o PS puro e com AgNP são apresentadas na Figura 42. A degradação térmica dos filmes ocorreu na faixa de temperatura de 200 a 450 °C. É possível observar que na curva de TGA dos filmes de PS/AgNP há dois comportamentos de perda de massa. A primeira perda de massa ocorreu na faixa de temperatura de 200 a 300 °C e a segunda na faixa de 350 a 600 °C. Esta última corresponde a temperatura de degradação do PS puro e é correspondente à posição dos picos da DTG (413 °C).

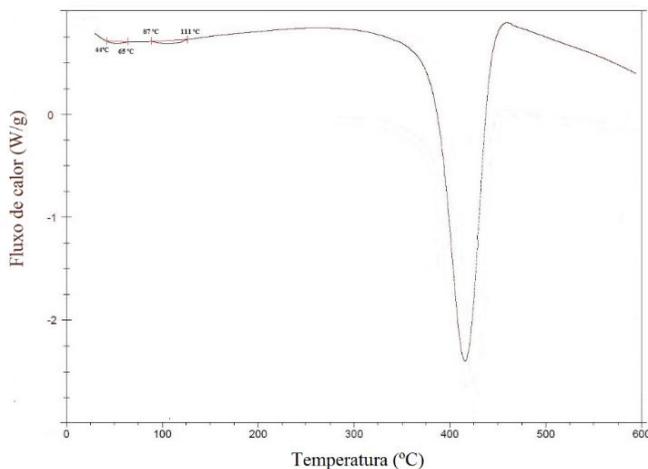
No caso do poliestireno no estado sólido, à temperatura ambiente, cadeias poliméricas individuais não podem migrar umas para as outras. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) para o poliestireno é de aproximadamente 100 °C. Acima desta temperatura, a livre rotação nas ligações da cadeia principal ocorre e o polímero torna-se plástico. O movimento completo (translação) das cadeias poliméricas individuais permanece inibido até aproximadamente 250 °C. Este é considerado o *melting point* ( $T_m$ ), na qual as cadeias poliméricas apresentam propriedades de fluido e o polímero torna-se um líquido viscoso ou *melt*. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) dos filmes de PS/AgNP foi medida por calorimetria diferencial de varredura (DSC) conforme apresentado na Figura 43. A curva de DSC para o filme de PS/AgNP apresentou duas transições. A primeira transição ocorreu a cerca de 52 °C que possivelmente corresponde à incorporação de AgNP modificadas com ácido oleico em poliestireno. E a segunda transição ocorreu em cerca de 106 °C que possivelmente corresponde à  $T_g$  do PS.

Figura 42 – Decomposição térmica dos filmes de PS e PS/Ag.



Fonte: do autor.

Figura 43 – Termograma de DSC dos filmes de PS/Ag.



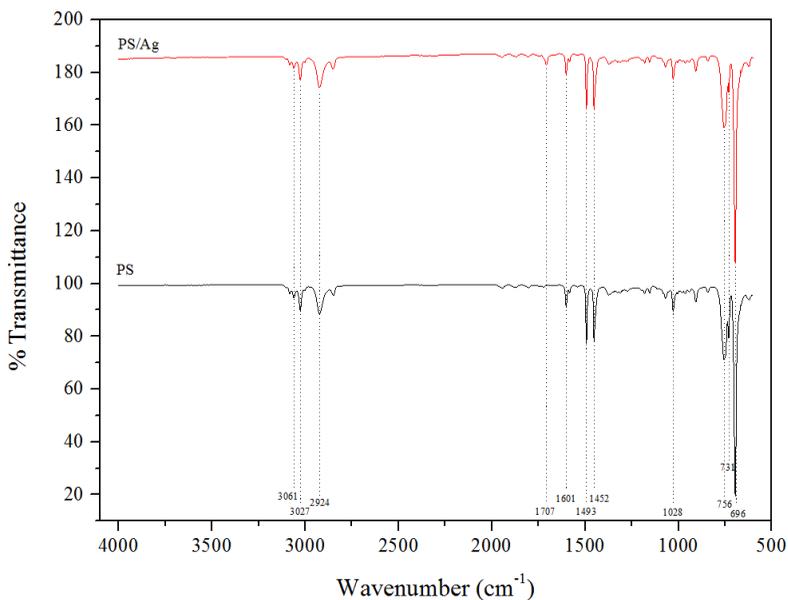
Fonte: do autor.

Cai et al (2014), sintetizaram microesferas de poliestireno sulfonado com nanopartículas de prata e encontraram uma perda de massa acentuada do material em temperaturas de 400 e 450 °C. Neves et al. (2011) ao sintetizar poliestireno com nanopartículas magnéticas também observaram duas perdas de massa do material, a primeira na faixa de 130 a 300 °C e a segunda, em 350 a 750°C. A primeira perda de

massa sugerem que é o reflexo das moléculas de ácido oleico adsorvido na superfície das nanopartículas. Tal teoria vem de encontro com nossos resultados, e de acordo com a literatura, menores temperaturas de Tg obtidas para o filme com AgNP, podem estar relacionadas à modificação da superfície da AgNP por ácido oleico o qual causa maior mobilidade do PS devido a fraca interação interfacial entre as AgNP e o polímero (plastificação) (PANDIS et al. 2011). A adição de AgNP em matrizes poliméricas pode diminuir (aumentar a Tg), acelerar (diminuição Tg) ou quase não ter impacto na dinâmica das cadeias de polímero, dependendo da força de interações (MBHELE et al., 2003). Nas temperaturas maiores que 415 °C ocorreu a completa decomposição da matriz polimérica (Figura 42).

Na Figura 44 são apresentados os espectros de FTIR dos filmes de PS e PS/AgNP, as regiões observadas são descritas na Tabela 11.

Figura 44 – Espectros de Infravermelho dos filmes de PS e PS/AgNP.



Fonte: do autor.

Tabela 11 - Bandas de absorção identificados na Figura 44<sup>a</sup>.

Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3100 cm <sup>-1</sup> (três picos)	v =C-H aromático.
3061 e 3027	δ axial C-H de anel aromático
2924	δα e δs de C-H <sub>2</sub>
1707	v C=O (ácido oleico)
1601	δα C=C de anel aromático
1493, 1452, 756	δ C-H de anel aromático
1028	δ =C – H aromático
696	δ C-C do anel fora do plano

v: estiramento, δ: deformação angular no plano, s: simétrico, a: assimétrico.

O filme de PS/Ag apresentou uma banda em 1707 cm<sup>-1</sup>, que pode ser atribuído ao estiramento da carbonila do ácido oleico que foi utilizando como agente de transferência entre as fases, recobrando a superfície das nanopartículas. E a região a 731 cm<sup>-1</sup> a vibração da ligação C-H para o anel monosubstituído no caso do poliestireno, que, segundo Barbosa (2007), independente do padrão de substituição do anel, as bandas nesta região são devidas à deformação fora do plano do próprio esqueleto carbônico. Ainda, segundo Barbosa (2007) a região a 731 cm<sup>-1</sup>, no caso do ácido oleico refere-se à deformação angular no plano do CH<sub>2</sub>. A interação entre a superfície das AgNP e o poliestireno nessas regiões (~1700 e ~755 cm<sup>-1</sup>) também foram confirmadas nos estudos de Betancourt-Galindo et al. (2012) e Wang et al. (2008).

A eficiência da atividade antimicrobiana dos filmes de poliestireno com AgNP foram avaliados contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *S. TYPHIMURIUM* e medida pelo método de contagem de colônias através do teste de contato entre o material polimérico e as cepas bacterianas como descrito no item 3.9.14.3, e, portanto, os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Atividade antimicrobiana dos filmes de PS e PS/AgNP\*.

Filmes	Cepas	Unidades formadoras de colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )		
		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S. TYPHIMURIUM</i>
PS		3000 ± 2,4 <sup>a</sup>	370 ± 1,2 <sup>a</sup>	200000 ± 3,2 <sup>a</sup>
PS/AgNP		230 ± 1,6 <sup>b</sup>	70 ± 1,7 <sup>b</sup>	36700 ± 2,1 <sup>b</sup>

\* valores médios das contagens de seis *spots* nas diluições bacterianas de 10<sup>-1</sup>. Valores dentro da coluna distribuídos com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,01) por teste de separação de médias de Tukey.

A redução bacteriana foi determinada em função do número de colônias durante o período de 24h, tempo de incubação. Foi possível notar que os filmes de PS aditivados com AgNPs apresentaram uma redução de uma unidade logarítmica em relação às três bactérias estudadas. A maior redução do crescimento bacteriano se deu contra *S. aureus*, seguindo a tendência da atividade antimicrobiana das soluções de AgNP apresentadas no item 4.5.2. Tais resultados indicaram que a baixa concentração de AgNP incorporadas no filme foi eficiente para a redução do crescimento bacteriano.

Zapata et al. (2011) estudaram a incorporação de AgNP em polietileno e observaram que as nanopartículas em concentração de 2% foram eficientes na redução do número de colônias de *E.coli*. Betancourt-Galindo et al. (2012) estudaram a incorporação de AgNP via polimerização em miniemulsão em poliestireno, e observaram que as concentrações de 0,17 e 1,23 % foram eficientes na redução do crescimento de *E.coli* e *S.aureus*.

A partir de tais constatações, tanto experimentais quanto da literatura, a incorporação das AgNP em PS foi eficaz na ação antimicrobiana a partir das reações de polimerização em massa, e, portanto, deu-se seguimento ao estudo com a incorporação das AgNP em estireno para a elaboração de EPS antimicrobiano a partir das reações de polimerização em suspensão.

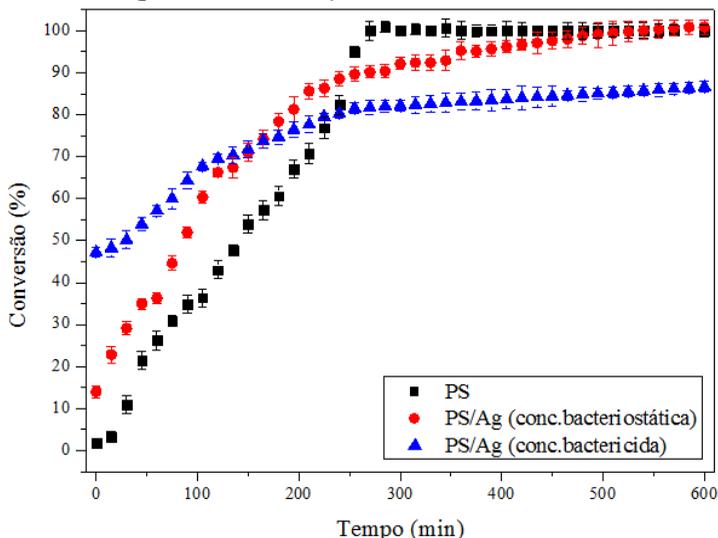
#### 4.6.2 Polimerização em suspensão – PS e EPS

Nesta etapa de obtenção de poliestireno expansível e aditivado com AgNPs via polimerização em suspensão considerou-se o processo de incorporação das nanopartículas diretamente no monômero via reação de hidrofobização conforme item 4.2 considerando proporcionalmente o aumento de escala em volume (item 4.3). A incorporação das AgNP no monômero levou em consideração as concentrações bacteriostática ( $14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e bactericida ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtidas no estudo microbiológico (item 4.5.2).

Para o estudo da influência da adição das AgNP, tanto nas concentrações bacteriostática quanto bactericida, sobre a cinética de polimerização em suspensão do estireno foi considerada a hipótese de que esta se assemelha à da polimerização em massa, e tais experimentos foram conduzidos conforme item 3.9.8 (Tabela 5). Os dados cinéticos são apresentados na Figura 45 e os intervalos de tempo em que as

amostras foram tomadas e a conversão atingida em cada um deles são apresentados no Tabela F1 (Apêndice F).

Figura 45 – Comportamento cinético experimental da polimerização do estireno com AgNP nas concentrações bacteriostática e bactericida.



Fonte: do autor.

Tendo em vista os resultados da Figura 45, a incorporação de AgNP no sistema de polimerização em suspensão do estireno alterou a cinética de polimerização. A taxa de reação do PS puro é mais rápida, visto que atinge a conversão completa em 270 minutos. A reação PS/Ag demora mais para atingir a conversão completa, e portanto, a taxa de polimerização é menor. A conversão do sistema com a adição de AgNP na concentração bacteriostática atingiu 100% em 540 minutos e apresentou a etapa do efeito gel foi prolongada. Com a adição de AgNP na concentração bactericida, a taxa de polimerização do estireno diminuiu ainda mais, de modo que em 6 horas de reação, o sistema atingiu 86% de conversão. Aplicando a concentração bactericida de AgNP, não foi possível obter partículas de EPS, pois há uma forte desestabilização do sistema de polimerização em suspensão. Tal instabilidade pode ser observada na Figura 45C.

A diminuição da taxa de polimerização com a adição de AgNP também foi observada por Yeum, Sun e Deng (2005) durante a polimerização de poli(vinil acetato). Os autores atribuíram duas possibilidades para a redução da taxa de polimerização quando as AgNP estão presentes: a primeira, no sentido de que as AgNP podem adsorver

nas moléculas de polímero vivo, e então reduzindo a taxa de difusão deste; e a segunda, que as AgNP podem funcionar como um sequestrador de iniciador. Soriano-Corral e Morales (2011), observaram a diminuição da taxa de polimerização com a adição de AgNP na concentração de 1% (p/p) e afirmam que este comportamento possivelmente pode ser atribuído a interação física entre as nanopartículas de prata e os radicais livres presentes no meio reacional. Este comportamento passa a ser indicativo da diminuição na concentração de radicais livres no estágio inicial da reação, a quais pode ser diretamente associada com a interação entre os radicais livres, gerados pela decomposição do BPO, e as AgNPs, o que tem efeito significativo na conversão monomérica. Tal fenômeno deve ser estudado com mais profundidade para melhor entendimento, já que com a aplicação da concentração bactericida de AgNP a estabilidade do sistema é afetada consideravelmente, havendo necessidade de estudo dos componentes da formulação do sistema de polimerização em suspensão.

O EPS e EPS/AgNP foram obtidos neste estudo de acordo com o procedimento apresentado nos itens 3.7 e 3.8, são apresentados na Figura 46 e a concentração de AgNP aplicada foi a bacteriostática. O produto final foi caracterizado através da quantificação de prata incorporada no material polimérico por espectroscopia de absorção atômica (AAS), tamanho de partícula através de análise granulométrica, análise de monômero residual, massa molecular por viscosimetria, microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC), e atividade antimicrobiana através de teste de contato.

Figura 46 – EPS e EPS/AgNP obtidos via polimerização em suspensão. A) EPS puro, B) EPS/AgNP – concentração bacteriostática, C) EPS/AgNP – concentração bactericida.



Fonte: do autor.

A concentração de prata incorporada tanto no monômero quanto no EPS foi determinada por espectroscopia de absorção atômica, conforme descrito no item 3.9.13, e obteve-se a concentração de  $19 \pm 0,11$  g de Ag/100g de estireno e  $0,51 \pm 0,04$  g de Ag/100 g de material polimérico.

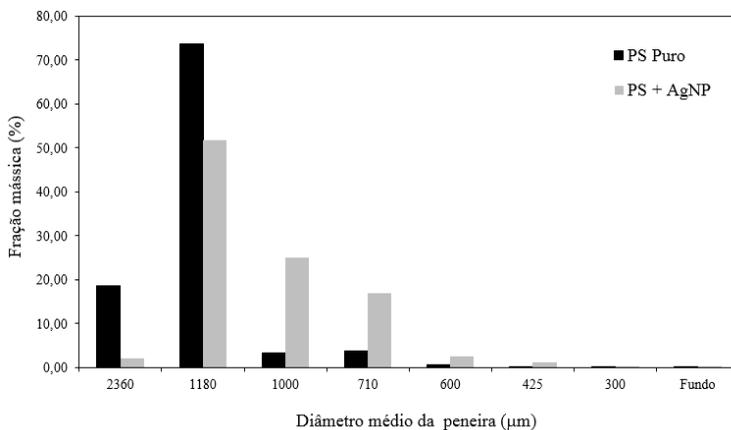
A partir da concentração incorporada de prata na matriz polimérica, observou-se a necessidade de avaliação da influência das AgNP na distribuição do tamanho de partícula do polímero. Este parâmetro é um fator importante na reação de polimerização em suspensão, já que o tamanho das partículas através da análise granulométrica fornece os diâmetros médios e a distribuição de tamanho, os quais determinam a aplicação do material produzido. Como o produto final é obtido na forma de partículas esféricas com larga faixa de distribuição de tamanhos (50 – 2000  $\mu\text{m}$ ), estas devem ser classificadas em frações com dimensões específicas, conforme aplicação final (GONÇALVES, 2003). Para a aplicação do poliestireno expansível, a faixa de interesse da distribuição de tamanho de partícula (DTP) está entre 700 – 1180  $\mu\text{m}$ . As reações de polimerização em suspensão foram conduzidas para o estireno puro e com AgNP na concentração bacteriostática conforme item 3.9.9.

A Figura 47 apresenta os histogramas de distribuição de tamanhos de partículas do PS puro e aditivado com AgNP na concentração bacteriostática. A maior fração mássica tanto para o PS puro quanto para o PS/AgNP foi obtida no tamanho 1180  $\mu\text{m}$  com, 74 % e 52% de partículas, respectivamente. Com a adição AgNP ao material polimérico, ocorreu um espalhamento representativo das frações mássicas também em 1000 e 710  $\mu\text{m}$  e neste caso, 94% do material polimérico antimicrobiano produzido ficou dentro da faixa desejada.

A avaliação do diâmetro médio de Sauter, que fornece a média ponderal do diâmetro, e da dispersão das partículas é apresentada na Tabela 13. A adição da AgNP influenciou significativamente a redução do diâmetro médio das partículas poliméricas, não apresentando alteração na dispersão das partículas.

A adição de AgNP no início da reação faz com que ocorra a redução do diâmetro e da dispersão desse diâmetro das partículas, possivelmente pela necessidade que se teve em adicionar uma maior quantidade de estabilizante PVP, pois a partir de 50% de conversão, o efeito gel ficou acentuado (Figura 44), e para evitar a coalescência do sistema utilizou-se 20 g de PVP em relação à massa de água do sistema (Tabela 4).

Figura 47 – Histogramas de distribuição do tamanho de partículas do PS puro e aditivado com AgNP.



Fonte: do autor.

Tabela 13 – Diâmetro médio de Sauter e dispersão das partículas de PS puro e aditivado com AgNP\*.

Polímeros	Diâmetro médio de Sautner (µm)	Dispersão das partículas (d <sub>32</sub> )(adimensional) <sub>4</sub> <sup>a</sup>
PS puro	1460 ± 0,92 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,0 2 <sup>a</sup>
PS / AgNP	1256 ± 1,03 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,0

\*valores médios de triplicatas. Valores dentro da linha distribuídos com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,01) por teste de separação de médias de Tukey.

Tendo em vista a obtenção do PS/AgNP dentro da faixa desejada comercialmente de tamanho de partícula e, que a aplicação do material visa a produção de embalagem para o acondicionamento de pescados, o material passou pela caracterização do teor residual de monômero (estireno), seguindo a Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999 da ANVISA que determina o limite de composição em 0,25 % de estireno no produto final. Para esta avaliação utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa conforme item 3.9.12, a partir de curva de calibração construída a partir das matrizes poliméricas, a qual é apresentada no Apêndice G. Os teores de monômero residual dos polímeros estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Teores de monômero residual no PS e PS/AgNP\*.

Polímeros	PS puro	PS/AgNP
% de estireno	$0,17 \pm 0,03^a$	$0,22 \pm 0,08^a$

\* valores médios de triplicatas. Valores dentro da linha distribuídos com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ) por teste de separação de médias de Tukey.

A quantidade de monômero residual determinada, tanto do PS puro quanto do PS/AgNP, estão de acordo com a legislação vigente, mostrando a viabilidade da polimerização do estireno aditivado de AgNP.

Outro parâmetro importante para a aplicação comercial do produto polimérico é o valor da massa molecular média, a qual foi determinada a partir da análise viscosimétrica conforme item 3.9.10 e curvas de calibração apresentadas no Apêndice G, e, portanto, os valores das massas moleculares dos produtos obtidos a partir das reações de polimerização em suspensão são apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Massas molares viscosimétricas para os materiais poliméricos obtidos\*.

Polímeros	PS puro	PS/AgNP
Mn ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$172874,96 \pm 1,45^a$	$191964,58 \pm 1,$

\* valores médios de triplicatas. Valores dentro da coluna distribuídos com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ) por teste de separação de médias de Tukey.

Percebe-se que as massas moleculares obtidas para os produtos de reação para a obtenção do poliestireno situam-se na faixa adotada pela indústria de EPS, que vai de 150 000 a 250 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (BISHOP, 1971). Ou seja, a incorporação de AgNP na reação permite a produção de polímeros com aplicabilidade comercial.

Os valores de massas molares foram diferentes significativamente e maior quando adicionadas as AgNP no PS, e o fenômeno apresentado vem de encontro com o estudo de Yeum, Sun e Deng (2005) na proposição de que as AgNP podem funcionar como um sequestrador de iniciador. E neste caso, com menores concentrações de iniciador no meio reacional, a taxa de polimerização é mais lenta e as gotas colidem mais. Com a adição de AgNP no sistema, o efeito gel é mais pronunciado (Figura 45), tal efeito leva à diminuição na taxa de terminação das cadeias em crescimento. Esta limitação difusional passa a ser a responsável pelo aumento significativo da massa molecular média do poliestireno aditivado com AgNP.

As pérolas poliméricas de PS e PS/AgNP foram analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada à técnica EDX para a identificação da prata conforme item 3.9.6 e as microscopias são apresentadas na Figura 48. Na Figura 48 A-C, são apresentadas as pérolas de PS puro obtidas a partir da polimerização em suspensão, apresentaram superfície lisa, tal superfície foi modificada com a adição de AgNP. A Figura 48 E-G, apresenta regiões esféricas vazias e não foi possível visualizar qualquer estrutura de nanopartículas na superfície, no entanto, a partir da fratura de uma amostra, Figura 48 I-J, foi possível a visualização de tais AgNP. As regiões esféricas vazias também foram observadas no EPS/AgNP (Figura 48, H) quando comparadas com o EPS puro (Figura 48, D).

As estruturas esféricas vazias podem terem ocorrido devido à incorporação de água nas partículas de forma mais pronunciada durante a fase do efeito gel. Tais regiões foram observadas também por Neves et al. (2011) em PS adicionado de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , e podem ser formadas devido à encapsulação de microgotas de água durante a reação de polimerização. Diferentes diâmetros dessas regiões esféricas vazias estão relacionados às microgotas de água encapsuladas que estão rodeadas por nanopartículas superficialmente modificadas por ácido oleico. Na partícula polimérica fraturada (Figura 48, I), foi possível observar diferentes diâmetros das regiões esféricas vazias e que o material aditivado com AgNP se torna mais poroso, isso pode interferir, de alguma forma, as propriedades mecânica do material. Tais caracterizações não fazem parte do escopo deste estudo e por isso não foram conduzidas mas são necessárias e deverão ser realizadas futuramente.

A análise de EDX realizada na superfície do PS/AgNP, para identificar os elementos presentes na amostra, é apresentada na Figura 48, K e se pode constatar somente a presença de um composto orgânico pela presença do elemento carbono. Portanto, não foi possível determinar a presença da prata no polímero. É provável que a baixa concentração das AgNPs no PS, influenciou negativamente na detecção da prata.

Figura 48 – Micrografias das pérolas de PS (A-C), PS/AgNP (E-G, I-J)), EPS (D) e EPS/AgNP (H) e análise de EDX para PS/AgNP (K).

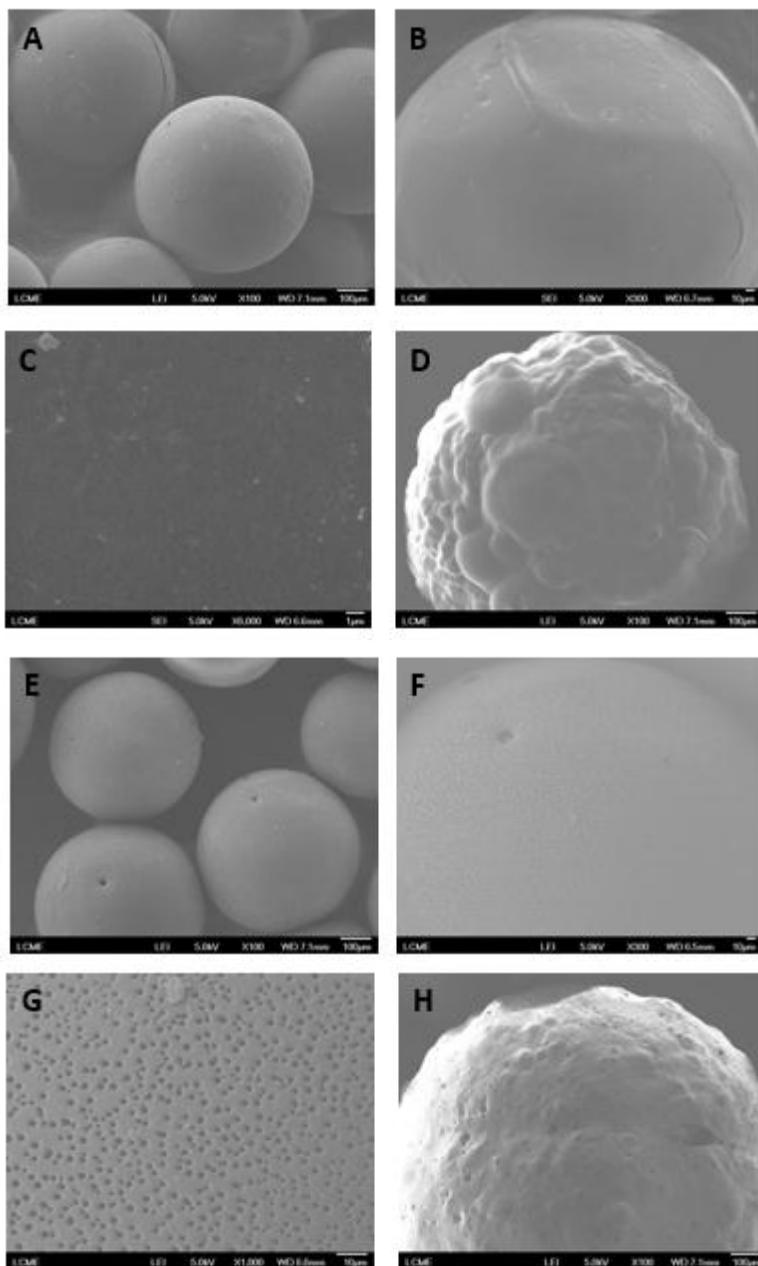
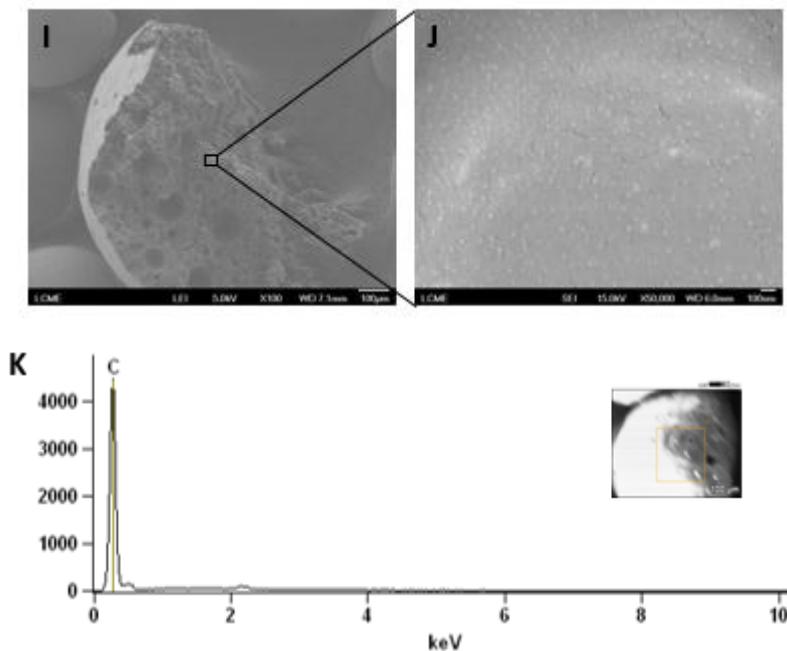


Figura 48 – Micrografias das pérolas de PS (A-C), PS/AgNP (E-G, I-J)), EPS (D) e EPS/AgNP (H) e análise de EDX para PS/AgNP (K) (continuação).



Fonte: do autor.

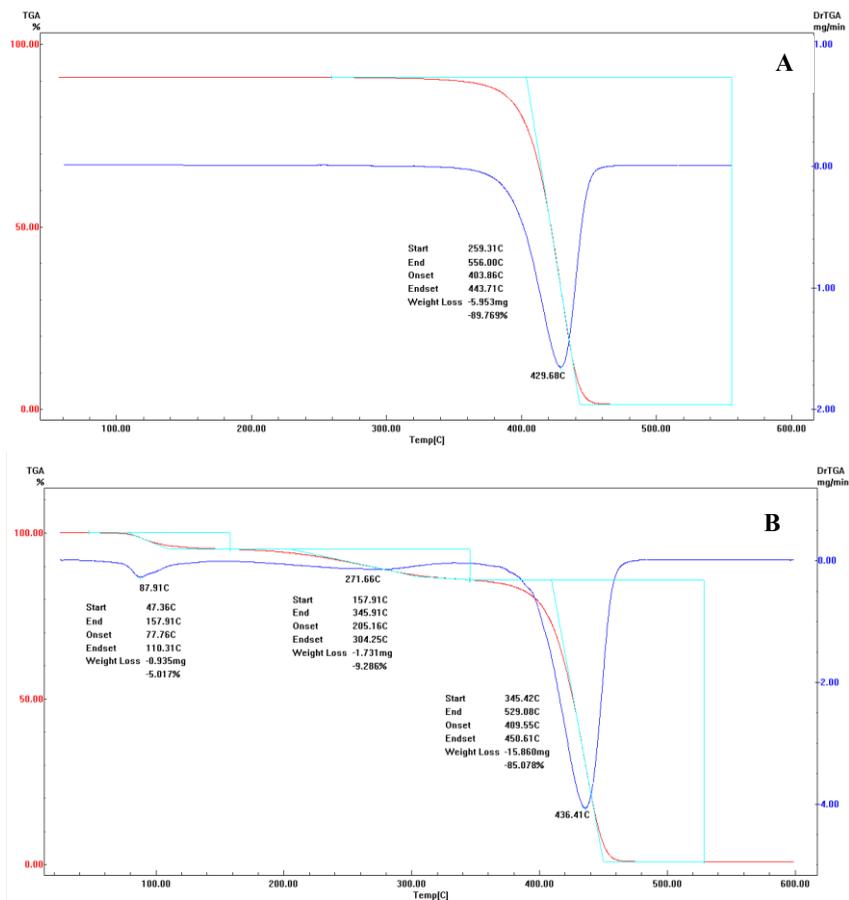
As análises termogravimétricas foram realizadas nos materiais poliméricos, conforme item 3.9.11 e os resultados estão apresentados na Figura 49.

Para o PS puro (Figura 49, A) pode-se observar uma única perda de massa significativa, em aproximadamente 404 °C a 444 °C que pode ser atribuída à decomposição do material orgânico polimérico. Para o polímero aditivado com AgNP na concentração bacteriostática (Figura 49, B) tal perda referente à degradação do poliestireno foi observada na faixa de 409 °C a 450 °C. Tais resultados aproximaram-se do estudo de Cai et al. (2014) que sintetizaram microesferas de poliestirenos recobertas por AgNP.

Quando as AgNP são adicionadas ao poliestireno na concentração bacteriostática, observou-se dois comportamentos (78 a 110 °C e 205 a 304 °C) de perda de massa em temperaturas menores a 400 °C. De acordo com Yan et al. (2009) apud Neves et al. (2011) a primeira perda de massa reflete o ácido oleico adsorvido fisicamente na nanopartícula,

enquanto que a segunda perda pode ser relacionada a degradação do ácido oleico adsorvido quimicamente na superfície das nanopartículas.

Figura 49 – Resultados de TGA. A) PS puro e B) PS/AgNP.



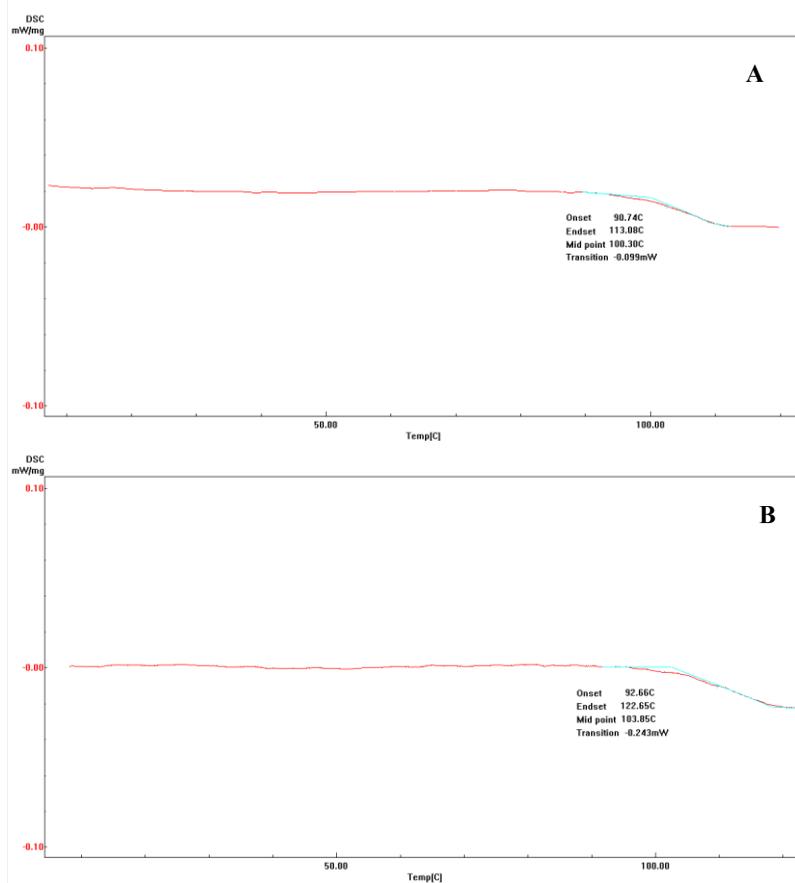
Fonte: do autor.

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) foi determinada por calorimetria diferencial de varredura (DSC), conforme o item 3.9.11 e os resultados estão apresentados na Figura 49.

Conforme Figura 50, A o PS puro apresentou  $T_g$  a 100,30 °C e para o PS/AgNP (Figura 50, B) a  $T_g$  encontrada foi de 103,85 °C. Tais resultados indicam que a adição de AgNP no poliestireno não interferiu

na formação do polímero pois a Tg encontra-se na faixa de temperatura para tal material polimérico.

Figura 50 – Termogramas obtidos por DSC: A) PS puro; B) PS/AgNP.



Fonte: do autor.

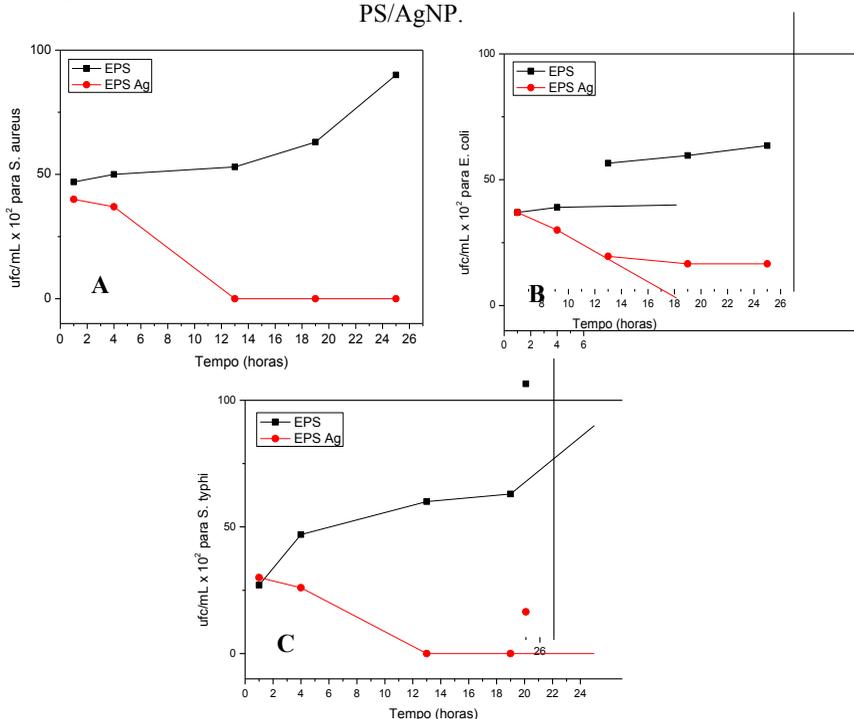
E, finalmente, as propriedades antimicrobianas do poliestireno expansível aditivado com AgNP foi avaliado conforme item 3.9.14.3 através de teste de contato com as cepas *E.coli*, *S.aureus* e *S. TYPHIMURIUM*.

Pelo fato, da aplicação das AgNP serem na concentração bacteriostática, fez-se necessário o acompanhamento da cinética do

crescimento bacteriano durante 25 h para a verificação de qual seria o tempo necessário de contato entre o microrganismo e o material antimicrobiano para que ocorresse perda da viabilidade bacteriana.

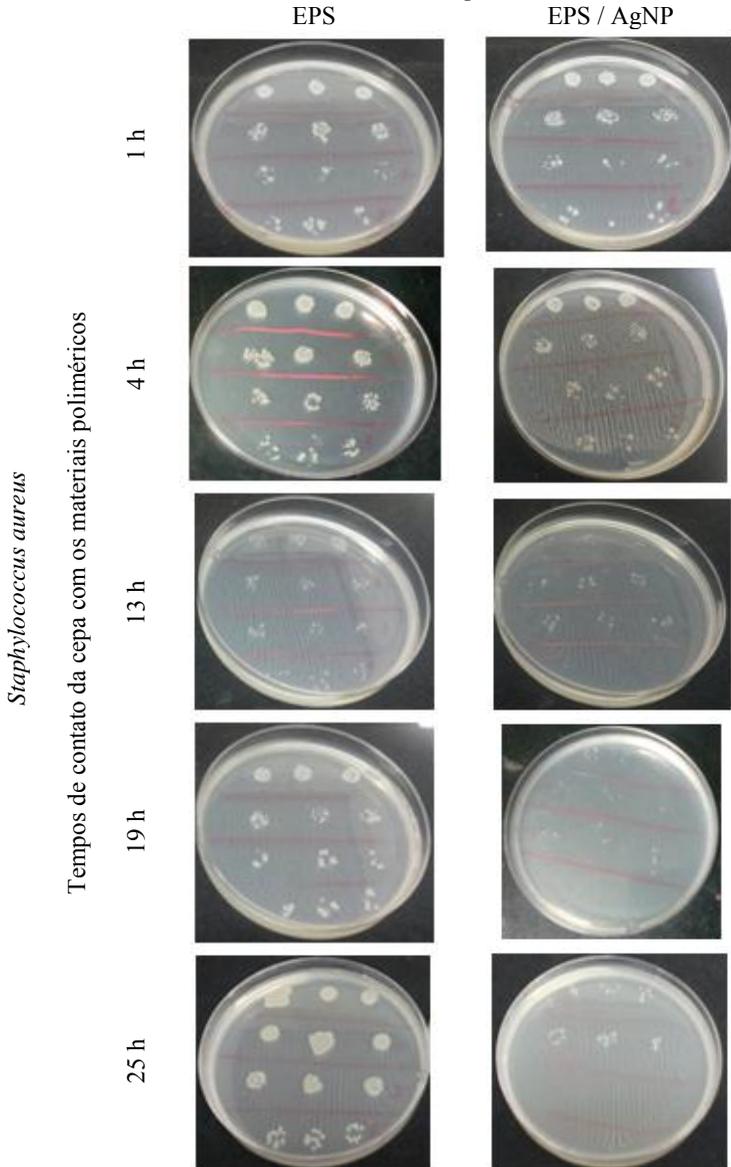
Os resultados são apresentados na Figura 51 e é possível observar que ocorreu crescimento de colônias ao longo do tempo quando utilizou-se o EPS puro. Para o EPS/AgNP foi possível observar a redução no número de colônias formadas durante o tempo para as bactérias estudadas (Figuras 52 a 54).

Figura 51 – Cinética da atividade bacteriana em contato com o PS puro e PS/AgNP.



Fonte: do autor.

Figura 52 – Contagem de colônias de *S.aureus* do teste de contato entre cepas bacterianas e material polimérico.



Fonte: do autor.





Para todos os microrganismos testados a total redução de colônias se deu no período de 13 h de contato entre as cepas bacteriana e o material EPS aditivado com AgNPs.

Portanto, para a aplicação industrial do EPS antimicrobiano como embalagem primária ou secundária, o produto a ser acondicionado deverá permanecer no mínimo 13h em contato com a embalagem antimicrobiana para garantir que nenhuma colônia bacteriana de *E.coli*, *S.aureus* e *S.typhi* se desenvolva.



## CONCLUSÕES

O estudo realizado sobre o desenvolvimento do processo de síntese de nanopartículas de prata, de maneira otimizada e a incorporação dessas em poliestireno expansível permitiu concluir que o material polimérico antimicrobiano produzido possui aplicação industrial, como uso em embalagens primária ou secundária. A obtenção de poliestireno expansível antimicrobiano, como uma proposta inédita, foi possível de ser realizada. Tal ineditismo consiste na incorporação de nanopartículas de prata *in situ* na polimerização em suspensão do estireno.

O trabalho desenvolvido permitiu explorar rotas otimizadas de sínteses de nanopartículas de prata (AgNP), desenvolver o processo de incorporação de AgNP *in situ* na polimerização em suspensão do estireno, estabelecer as condições cinéticas de tal polimerização e obter o poliestireno expansível antimicrobiano como produto final.

Dentre as rotas de sínteses de nanopartículas de prata estudadas, utilizando dois diferentes agentes redutores inorgânicos (citrato de sódio e borohidreto de sódio), selecionou-se a rota de síntese adequada através da seleção da região ótima das condições experimentais e planejamentos experimentais. E, portanto, a aplicação do NaBH<sub>4</sub> como agente redutor apresentou maior eficiência na síntese para a obtenção de nanopartículas de prata com menores tamanhos, apesar de alguns sistemas apresentarem polidispersidade > 50%. Esta condição, de altas polidispersidades para as AgNP em alguns sistemas, é plausível no sentido de que, apesar do NaBH<sub>4</sub> funcionar como redutor, atua também como estabilizante, mas com baixa eficiência.

A adição de um segundo estabilizante se fez necessário e portanto, estudou-se, a partir do mecanismo de nucleação durante a síntese de AgNP, a utilização de citrato de sódio, SDS e PVA como estabilizantes. E, justamente, o citrato de sódio demonstrou resultados positivos ao ser aplicado na síntese de AgNP neste trabalho. Provavelmente por ser responsável por uma estabilização eletrostática, a qual é de natureza da nucleação das AgNP.

A transferência das AgNP do meio aquoso para o meio orgânico (estireno), foi possível através da hidrofobização das nanopartículas, usando o ácido oléico como agente de transferência via solvente,

diretamente para o estireno. Entretanto, o ácido oléico não necessariamente precisa ser o estabilizante das AgNP durante a síntese. No caso, deste trabalho, o ácido oléico apresentou-se efetivo, como agente de transferência de fase das AgNP, após indução em presença de ácido fosfórico 0,1M.

Após transferir as AgNP diretamente para o estireno, este foi polimerizado via polimerização em massa e, em suspensão para a obtenção de poliestireno expansível. A adição de AgNP não causou diferença significativa na reação cinética em massa do poliestireno, já na polimerização em suspensão a taxa de reação do poliestireno com AgNP é mais lenta para atingir a conversão completa, e portanto, a taxa de polimerização é menor.

Estudos em relação à atividade antimicrobiana das AgNP foram realizadas e permitiram estabelecer as concentrações bacteriostáticas e bactericidas ideais para a incorporação no monômero contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *S. TYPHIMURIUM*. Ao utilizar a concentração bacteriostática de AgNP na polimerização em suspensão do estireno, a conversão atingiu 100% em 540 minutos e a etapa gel foi prolongada. Aplicando a concentração bactericida da AgNP, a taxa de polimerização foi ainda menor, de modo que o sistema, em 540 minutos, atingiu 86% de conversão e neste caso ocorreu forte desestabilização da reação, não sendo possível a obtenção de partículas poliméricas. 94% do material polimérico antimicrobiano produzido ficou dentro da faixa desejada, assim como, a massa molecular ( $191\,964,58 \pm 1,62 \text{ g.mol}^{-1}$ ) para aplicação industrial. A quantidade de monômero residual apresentaram-se de acordo com a legislação vigente ( $0,22 \pm 0,08 \%$ ), assim como, a concentração de prata incorporada no material polimérico ( $0,51 \pm 0,04 \text{ g de Ag/100g de material polimérico}$ ). Portanto, o poliestireno expansível antimicrobiano foi obtido com condições dentro dos parâmetros industriais de aplicação nos parâmetros de distribuição de tamanho de partícula, massa molecular e monômero residual e quantidade de prata.

A morfologia do material polimérico obtido, observada através de microscopia eletrônica de varredura, permitiu observar que a adição das AgNPs ao poliestireno causou certa interferência na estrutura do material apresentando regiões esféricas vazias, deixando o material mais poroso. As características termogravimétricas e temperatura de transição vítrea do material polimérico não foram influenciadas, significativamente, pela adição de AgNP, indicando que a concentração

aplicada de AgNP não interferiu na degradação térmica e formação do polímero.

O processo desenvolvido de incorporação de AgNP, na concentração bacteriostática, *in situ* na polimerização de suspensão do estireno, assim como o poliestireno expansível antimicrobiano obtido, estão aptos a serem aplicados industrialmente. O poliestireno expansível antimicrobiano obtido foi eficiente para a redução do crescimento de colônias bacterianas de *E.coli*, *S. aureus* e *S. TYPHIMURIUM* a partir de 13 horas de contato.

Adaptações aos processos são necessárias, dessa forma, como sugestões para trabalhos futuros ficam a necessidade de estudo das condições reacionais do sistema de polimerização em suspensão do estireno aplicando a concentração bactericida de nanopartículas de prata, já que esta causou a instabilidade do sistema de polimerização. E, estudos de migração de prata da embalagem para o produto armazenado também se fazem necessários assim como a caracterização das propriedades físicas do poliestireno expansível antimicrobiano, para a definição do tipo de aplicação da embalagem (primária e/ou secundária). Além do mecanismo de ação das AgNP nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



## REFERÊNCIAS

ABBASNEZHAD, H.; GRAY, M.R.; FOGHT, J.M. Two different mechanisms for adhesion of Gram-negative bacterium, *Pseudomonas fluorescens* LP6a, to an oil–water interface. *Colloids Surf. B*, v.62, p. 36-41, 2008.

AHMADIVAND, A.; GOLMOHAMMADI, S. Surface plasmon resonances and plasmon hybridization in compositional Al/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> nanorings at the UV spectrum to the near infrared region (NIR). *Optics & Laser Technology*, v.66, pp. 9-14, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999: Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 maio 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001: Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 26 maio 2015.

AHAMED, M.; ALSALHI, M.S.; SIDDIQUI, M.K.J. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*, v.411, p. 1841-1848, 2010.

AMRO, N.A.; KOTRA, L.P.; WADU-MESTHRIGE, K. BULYCHEV, A.; MOBASHERY, S.; LIU, G. High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the *Escherichiacoli* Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. *Langmuir*, v. 16, p. 2789-2796, 2000.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Reviwe of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. v.3, pp. 113-126, 2002.

AZEREDO, H. M. C. Review – Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, v. 42, pp. 1240-1253, 2009.

BALAN, L.; MALVAL, J-P; SCHNEIDER, R.; BURGET, D. Silver nanoparticles: new synthesis, characterization and photophysical properties. *Materials Chemistry and Physics*, v.104, p.417-421, 2007.

BETANCOURT-GALINDO, R.; MIRANDA, C.C.; URBINA, B.A.P.; CASTAÑEDA-FACIO, A.; SÁNCHEZ-VALDÉS, S.; PADILLA, J.M.; CERDA, L.A.G.; PERERA, Y.A., RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, O.S. (2012) Encapsulation of Silver Nanoparticle in a Polystyrene Matrix by Miniemulsion Polymerization and Its Antimicrobial Activity. International Scholarly Research Network Nanotechnology, p. 1-5.

BINAEIAN E, RASHIDI AM, ATTAR H (2012) Toxicity study of two different synthesized silver nanoparticles on bacteria *Vibrio fischeri*. World Academy of Science, Engineering and Technology 67: 1219-1225.

BIESENBERGER, J.A.; SEBASTIAN, D.H. **Principles of polymer science**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1983.

BISHOP, R.B. Practical Polymerization for Polystyrene. Cahners Publishing Cp., Inc., Massachusetts, 1971.

BOBER, P.; STEJSKAL, J.; TRCHOVÁ, M.; PROKES, J. Polyaniline-silver composites prepared by the oxidation of aniline with mixed oxidants, silver nitrate and ammonium peroxydisulfate: The control of silver content. Polymer, v.52, p. 5947-5952, 2011.

BROMBERG L; CHEN L; CHANG EP; WANG S; HATTON TA Reactive Silver and Cobalt Nanoparticles Modified with Fatty Acid Ligands Functionalized by Imidazole Derivatives. Chem. Mater., v. 22, p. 5383-5391, 2010.

CARDOSO, V.S. et al. Collagen-based silver nanoparticles for biological applications: synthesis and characterization, Journal of Nanobiotechnology, v. 12, p. 36-45, 2014.

CARO, C.; CATILLO, P.M.; KLIPPSTEEN, R.; POZO, D. ZADERENKO, A.P. Silver nanoparticles sensing and imaging applications. Silver nanoparticles: In-Tech, 2010.

CHALOUPKA, K.; MALAN, Y. e SEIFALIAN, A.M. Nanosilver as a new generation of nanoproducts in biomedical applications. Trends in Biotechnology, n.28, 580-588,2010.

CHANDA, M. **Introduction to polymer science and chemistry**. A problem solving approach. CRC: USA, 2006.

CHEN, X.; PARKER, S.G.; ZOU, G.; SU, W.; ZHANG, Q.  $\beta$ -Cyclodextrin-Functionalized Silver Nanoparticles for the Naked Eye Detection of Aromatic Isomers. *ACS Nano*, v. 4, n.11, p.6387-6394, 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement.** CLSI document M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COSTA, L.A. Síntese e caracterização do Poliestireno Expansível: Emprego Conjunto de Água e Pentano como Agentes de Expansão. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2006.

DOWDING, P. J.; VINCENT, B. Suspension polymerisation to form polymer beads. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 161, pp. 259-269, 2000.

DALLAS, P.; SHARMA, V.K. e ZBORIL, R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.166, p. 119-135, 2011.

DAVIES, R.L. e ETRIS, S.F. The development and functions of silver in water purifications and disease control. *Catalysis Today*, v.36, n.1, p.107-114, 1997.

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, p. 1-24, 2011.

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

EBOIGBODIN, K.E.; NEWTON, J.R.A.; ROUTH, A.F.; BIGGS, C.A. Bacterial quorum sensing and cell surface electrokinetic properties *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.73, p. 669-675, 2006.

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

EL-SHISHTAWY, R.; ASIRI, A.M.; AL-OTAIBI, M.M. Synthesis and spectroscopic studies of stable aqueous dispersion of silver nanoparticles. *Spectrochimia Acta Part A*, v. 79, p. 1505-1510, 2011.

ESKIN, N.A.M. e ROBINSON, D.S. Food Shelf Life Stability. Chemical, Biochemical and Microbiological Changes. CRC: USA, 2001.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.*, v.35, pp. 209-213, 2006.

FABREGA, J.; FAWCETT, S.R.; RENSHAW, J.C.; LEAD, J.R. Silver nanoparticle impact on bacterial growth: Effect of pH, concentration, and organic matter. *Environmental Science Technologies*, v.43, p. 7285-7290, 2009.

FAYAZ, A.M.; BALAJI, K.; GIRILAL, M.; YADAV, R.; KALAICHELVAN, P.T.; VENKETESAN, R. 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, p. 103-109, 2010.

FENG, Q.L. et al. A mechanist study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Pathology*, v.52, n.4, p. 622-628, 2000.

GAETH, R. "Production of porous materials from film-forming organic thermoplastics masses" Patent n. US26811321, 1954.

GARCIA, Marcus Vinicius Dias. Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. Dissertação de Mestrado: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2011.

GAZZETTA UFFICIALE DELL'IT "UNIONE EUROPEA. REGOLAMENTO (CE) N. 1441/2007, del 5 dicembre 2007: Criteri

microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/oj/direct-access.html>>. Acesso em: 26 maio 2015.

GONÇALVES, O.H. **Síntese e caracterização do poliestireno expansível: Emprego de água como agente de expansão**. 2003. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

GUZMÁN, M.G., DILLE, F e GODET, S. Synthesis of silver nanoparticle by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2:3, 104-111, 2009.

HATAKEYAMA, T. e QUINN, F.X. *Thermal Analysis: Fundamentals and Applications to Polymer Science*. Wiley: England, 1999.

HORMOZI-NEZHAD, M.R.; JALALI-HERAVI, M.; ROBATJAZI, H.; EBRAHIMI-NAJAFABADI, H. Controlling aspect ratio of colloidal silver nanorods using response surface methodology. *Colloids and Surfaces A: Physicochem.Eng.Aspects*, 393, 46-52, 2012.

HAN, J. H. **Antimicrobial food packaging**. Chapter 4. *Novel food packaging techniques*. CRC: USA, 2003.

HOTCHKISS, J.H. Safety considerations in active packaging. In: ROONEY, M.L. *Active food packaging*. Glasgow: Chapman & Hall, 1995. p. 238-255.

INNOVA. Ficha de informação de segurança de produtos químicos – Estireno monômero estabilizado (2004). Disponível em: <<http://www.higieneocupacional.com.br/download/estireno-innova.pdf>> Acesso: 28 jan. 2015.

JAHANZAD, F., SAJJADI, S., BROOKS, B. W. Characteristic Intervals in Suspension Polymerization Reactors: An Experimental and Modelling Study, *Chem. Eng. Sci.*, v.60, pp. 5574-5589, 2005.

KAPOOR, S. Preparation, characterization, and surface modification of silver particles. *Langmuir*, v. 14, p. 1021-1025, 1998.

KEATING, M.; CHEN, Y.; LARMOUR, I.A.; FAULDS, K.; GRAHAM, D. Growth and surface-enhanced Raman scattering of Ag nanoparticle assembly in agarose gel. *Measurement Science and Technology*, 23, p.1-9, 2012.

KHAN, S.S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Studies in interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.87, p. 129-138, 2011.

KHAN, S.S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Impact of exopolysaccharides on the stability of silver nanoparticles in water. *Water Research*, v.45, p. 5184-5190, 2011b.

KHAN, S.S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Adsorptive removal of silver nanoparticles (SNPs) from aqueous solution by *Aeromonas punctate* and its adsorption isotherm and kinetics. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, v.92, p. 156-160, 2012.

KHATAEE, A. R.; FATHINIA, M.; ABER, S.; ZAREI, M. Optimization of photocatalytic treatment of dye solution on supported TiO<sub>2</sub> nanoparticles by central composite design: intermediates identification. *J Hazard Mater*, 181(1-3), p. 886-97, 2010.

KIPARISSIDES, C. Polymerization Reactor Modeling: A Review of Recent Developments and Future Directions, *Chem. Eng. Science*, v. 51, pp. 1637-1659, 1996.

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J-H; PARK, S.J.; LEE, H.J.; KIM, S.H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C-Y.; KIM, Y-K.; LEE, Y-S.; JEONG, D.H.; CHO, M-H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 3, p.95-101, 2007.

KLASEN, H.J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. Part I early uses. *Burns*, v. 30, p. 1-9, 2000.

KLODT, R.; GOUGEON, B. "Particle Foam Based on Expandable Polystyrene (EPS)", in *Modern Styrenic Polymers.: Polystyrenes and Styrenic Copolymers*. New York: Ed. John Wiley & Sons, 2003.

KUMAR, S., GANVIR, V., SATYANAND, C., KUMAR, R., GANDHI, K. S. Alternative Mechanisms of Drop Breakup in Stirred Vessels, *Chem. Eng. Sci.*, v.53, pp. 3269-3280, 1998.

KUMBHAR, A.S.; CHUMANOV, G. Encapsulation of silver nanoparticles into polystyrene microspheres. *Chemistry of Materials*, v. 21, pp. 2835-2839, 2009.

KVÍTEK, L.; PANÁČEK, A.; SOUKUPOVÁ, J.; KOLÁR, M.; VECEROVÁ, R.; PRUCEK, R.; HOLECOVÁ, M.; ZBORIL, R. Effect of surfactants and polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *Journal Physical Chemistry C*, v. 112, p. 5825-5834, 2008.

LEVIN, C. S.; HOFMANN, C.; ALI, T. A.; KELLY, A. T.; MOROSAN, E.; NORDLANDER, P.; WHITMIRE, K.; HALAS, N. J. Magnetic – plasmonic Core-shell nanoparticles. *ACS Nano*, v.3, pp. 1379-1388, 2009.

LI, D.; CHEN, S.; ZHAO, S.; HOU, X.; MA, H.; YANG, X. A study of phase transfer processes of Ag nanoparticles. *Applied Surface Science*, v. 200, p. 62-67, 2002.

LI, W.R.; XIE, X.B.; SHI, Q.S.; ZENG, H.Y.; OU-YANG, Y.S.; CHEN, Y.B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 85, p. 1115-1122, 2010.

LIAU, S.Y. et al. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationships to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p. 279-283, 1997. gold-

LINK, S.; WANG, Z.L.; EL-SAYER, M.A. Alloy formation of silver nanoparticles and the dependence of the plasmon absorption on their composition. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 103, p. 3529-3533, 1999.

LITVIN, V.A.; MINAEV, B.F. Spectroscopy study of silver nanoparticles fabrication using synthetic humic substances and their antimicrobial activity. *Spectrochimia Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 108, p. 115-122, 2013.

LUO, Y. Preparation of silver nanoparticles by heating a quarternary ammonium polyelectrolyte-AgNO<sub>3</sub> aqueous solution in basic conditions. *Indian Journal of Chemistry*, vol. 46A, p. 1266-1269, 2007.

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, pp. 166-179, 2007.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymer*, v.72, p. 43-51, 2008.

MAGAÑA, S.M.; QUINTANA, P.; AGUILAR, D.H.; TOLEDO, J.A.; ÁNGELES-CHÁVEZ, C.; CÓRTEZ, M.A.; LEÓN, L.; FREILE-PELEGRÍN, Y. LÓPEZ, T.; TORRES SÁNCHEZ, R.M. Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 281, p. 192-199, 2008.

MARSH, K.; BUGUSU, B. Food packaging – Roles, Materials and Environmental Issues. *Journal of Food Science*, v. 72, pp. 39-55, 2007

MASCIOLI, C. M. **Otimização do processo de polimerização do estireno: a distribuição de tamanho das partículas do poliestireno.** 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

MATHEW, T. V.; KURIAKOSE, S. Studies on the antimicrobial properties of colloidal silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 101, pp. 14-18, 2013.

MELO JR., M.A.; SANTOS, L.S.S.; GONÇALVES, M. do C.; NOGUEIRA, A.F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, v.35, n.9, p. 1872-1878, 2012.

METAK, A. M.; AJAAL, T. T. Investigation on polymer based nano-silver as food packaging materials. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, v. 7, pp. 772-778, 2013.

MIRZAJANI, F.; GHASSEMPOUR, A.; ALIAHMADI, A.; ESMAEILI, M.A. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology*, v. 162, p. 542-549, 2011.

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

NARSIMHAN, G.; GUPTA, J. P.; RAMKRISHNA, D. - A model for transitional breakage probability of droplets in agitated lean liquid-liquid dispersions. *Chem. Engng. Sci.*, v.14, pp.257-265, 1979.

NASSAR, M.A. e YOUSSEF, A.M. Mechanical and antibacterial properties of recycled carton paper coated by PS/Ag nanocomposites for packaging. *Carbohydrate Polymers*, 89, 269-274, 2012.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação em sanitização de embalagens. Comunicado Técnico EMBRAPA, São Carlos, v.99, p.1-4, 2008.

OBAIDAT, I. M.; ISSA, B.; HAIK, Y. Magnetic properties of magnetic nanoparticles for eficiente hyperthermia. *Nanomaterials*, v.5, pp. 63-89, 2015.

ODIAN, G. **Principles of polymerization**. 4<sup>a</sup> ed. Wiley-Interscience: USA, 2004.

OLIVEIRA, M.M.; CASTRO, E.G.; CANESTRARO, C.D.; ZANCHET, D.; UGARTE, D.; ROMAN, L.S.; ZARBIN, A.J.G.A simple two-phase route to silver nanoparticle/polyaniline structures. *The Journal of Physical Chemistry B*, v.110, p. 17063-17069, 2006.

ORIAKHI, C.O. Polymer Nanocomposition Approach to Advanced Materials. *Journal of Chemical Education*, v.77, p.1138-1142, 2000.

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(6), p. 1712-1720, 2007.

PARK, Y-S; DMYTRUK, A.; DMYTRUK, I.; KASUYA, A. TAKEDA, M.; OHUCHI, N.; OKAMOTO, Y.; KAJI, N., TOKESHI, M.; BABA, Y. Size-selective growth and stabilization of small CdSe nanoparticles in aqueous solution. *ACS Nano*, v. 4, pp. 121-128, 2010.

PATAKFALVI, R.; VIRÁNYI, Z.; DÉKÁNY, I. Kinetics of silver nanoparticles growth in aqueous polymer solutions. *Colloid Polymers Science*, v. 283, p. 299-305, 2004.

PAULA, M. M. S.; FRANCO, C. V.; BALDIN, M. C.; RODRIGUES, L.; BARICHELLO, T.; SAVI, G. D.; BELLATO, L. F.; FIORI, M.A.; SILVA, L. Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly- $\{\text{styrene-acrylic acid}\}$  with silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, pp. 647-650, 2009.

PETICA, A.; GAVRILIU, S.; LLUNGU, M.; BURUNTEA, N.; PANZARU, C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering B*, v. 152, p. 22-27, 2008.

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

POORTINGA, A.T.; BOS, R.; NORDE, W.; BUSSCHER, H.J. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surf.Sci.Rep.*, v.47, p.1-32, 2002.

PRATHNA, T.C.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Studies on aggregation behavior of silver nanoparticles in aqueous matrices: Effect of surface functionalization and matrix composition. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, v.390, p. 216-224, 2011.

RAO, Y. S.; KOTAKADI, V. S.; PRASAD, T.N.V.K.V.; REDDY, A.V.; SAI GOPAL, D.V.R. Green synthesis and spectral characterization of silver nanoparticles from Lakshmi tulasi (*Ocimum sanctum*) leaf extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 103, p. 153-159, 2013.

ROMER, I.; WHITE, T.A.; BAALOUSHA, M.; CHIPMAN, K.; VIANT, M.R.; LEAD, J.R. Aggregation and dispersion of silver

nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. *Journal of Chromatography A*, v.1218, p. 4226-4233, 2011.

RUSSEL, A.D. e HUGO, W.B. Antimicrobial Activity and Action of Silver. *Progress in Medicinal Chemistry*, v.31, p. 351-370, 1994.

SAMBHY, V.; MACBRIDE, M.M; PETERSON, B.R.; SEN, A. Silver bromide nanoparticle/polymer composite: Dual action tunable antimicrobial materials. *JACS*, v.128, p. 9798-9808, 2006.

SARKAR, A.; CHADHA, R.; BISWAS, N.; MUKHERJEE, T.; KAPOOR, S. Phase-transfer and film formation of silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.332, p. 224-230, 2009.

SATHISHKUMAR, M.; SNEHA, K.; WON, S.W.; CHO, C.-W.; KIM, S.; YUN, Y.-S. *Cinnamon zeylanicum* bark extract and power mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.73, p. 332-338, 2009.

SEO, D.; YOON, W.; PARK, S. KIM, J.; KIM, J. The preparation of hydrophobic silver nanoparticles via solvent exchange method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, v. 313-314, p. 158-161, 2008.

SHAMELI, K.; AHMAD, M. B.; AL-MULLA, E. A. J.; SHABANZADEH, P.; BAGHERI, S. Antibacterial effect of silver nanoparticles on talc composites. *Res. Chem. Intermed*, v.42, pp. 251-263, 2015.

SILVA, T.; POKHREL, L.R.; DUBEY, B.; TOLAYMAT, T.M.; MAIER, K.J.; LIU, X. Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Science of the Total Environment*, v.468-469, p. 968-976, 2014.

SMITHA, S.L.; NISSAMUDEEN, K.M.; PHILIP, D.; GOPCHANDRAN, K.G. Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochimia Acta Part A*, 71, p. 186-190, 2008.

SOLOMON, S. D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A.V.; RUTKOWSKY, S.A.; BORITZ, C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, v. 84, n. 2, p. 322-325, 2007.

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

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, p. 177-182, 2004.

SONG, K.C.; LEE, S.M.; PARK, T.S.; LEE, B.S. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean J. Chem. Eng.*, v.26(1), p.153-155, 2009.

SOO-HWAN, K.; LEE, H-S.; RYU, D-S.; CHOI, S-J; LEE, D-S. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 39, pp. 77-85, 2011.

STASTNY, F.; BUCHHOLZ, K. "Production of Porous shaped articles from thermoplastic materials" Patent n. US2744291, 1956.

STASTNY, F. "Production of porous shaped articles from thermoplastics substances" Patent n. US2787809, 1957.

TILLMANN, P. Stability of Silver Nanoparticles in Aqueous and Organic Media. NNIN REU Research Accomplishments, p. 140-141, 2004.

TSUNEDA, S.; AIKAWA, H., HAYASHI, H.; HIRATA, A. Significance of cell electrokinetic properties determined by soft-particle analysis in bacterial adhesion onto a solid surface. *J. Colloid Interface Sci*, v.279, p. 410-417, 2004.

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

VAIDYANATHAN, R., GOPALRAM, S., KALISHWARALAL, K., DEEPAK, V., PANDIAN, S. R. K., e GURUNATHAN, S. Enhanced silver nanoparticle synthesis by optimization of nitrate reductase activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), p. 335-341, 2010.

VAN HYNING, D. L.; ZUKOSKI, C.F. Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles. *Langmuir*, v.14, p. 7034-7046, 1998.

WANG, D.; AN, J.; LUO, Q.; LI, M. A convenient approach to synthesize stable silver nanoparticles and silver/polystyrene nanocomposite particles. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 110, pp. 3038-3046, 2008.

WOJTYSIAK, S. e KUDELSKI, A. Influence of oxygen on the process of formation of silver nanoparticles during citrate/borohydride synthesis of silver sols. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.410, p.45-51, 2012.

WU, X.; GAO, Y.; DONG, C-M. Polymer/gold hybrid nanoparticles: from synthesis to cancer theranostic applications. *RSC Adv.*, v.5, pp. 13787-13796, 2015.

YANG, B., TAKAHASHI, K., TAKEISHI, M. Styrene Drop Size Distribution in an Aqueous Solution of Poly(vinyl alcohol), *Ind. Engng. Chem. Res.*, v.39, pp. 2085-2090, 2000.

YEUM, J.; DENG, Y. Synthesis of high molecular weight poly(methyl methacrylate) microspheres by suspension polymerization in the presence of silver nanoparticles. *Colloid Polymer Science*, v. 283, p. 1172-1179, 2005.

YUAN, H. G., KALFAS, G., RAY, W. H., 1991, Suspension Polymerization – A Review. *JMS – Rev. Macrom. Chem. Phys.*, pp. 215-259, 1991.

YU, P.; HUANG, J.; TANG, J. Observation of coalescence process of silver nanospheres during shape transformation to nanoprisms. *Nanoscale Research Letters*, v. 6, p. 46-53, 2011.

ZAN, L.; TIAN, L.; LIU, Z.; PENG, Z. A new polystyrene-TiO<sub>2</sub> nanocomposite film and its photocatalytic degradation. *Applied Catalysis A: General*, v. 264, p. 237-242, 2004.

ZETA-METER, Inc. Zeta Potential: A complete course in 5 minutes. Disponível em: <<http://www.zeta-meter.com/5min.pdf>>. Acesso em: 08/01/2013.

ZIELINSKA, A., SKWAREK, E., ZALESKA, A., GAZDA, M., e HUPKA, J. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Procedia Chemistry*, 1(2), 1560-1566, 2009.

## **APÊNDICES**



## APÊNDICE A – Síntese AgNP com Na<sub>3</sub>Cit

Tabela A1 - Planejamento central composto com as Variáveis independentes e respostas experimentais e preditas para tamanho de partícula na síntese de AgNP usando citrato de sódio como redutor.

Experimento	Fator					Resposta Experimental					Resposta Predita					
	Agitação (rpm)	Vazão (×10 <sup>3</sup> )(kg.s <sup>-1</sup> )	Aquecimento depois da síntese (s)	Temperatura (°C)	Na <sub>3</sub> Cit (mM)	Tamanho de partícula (nm)	PI*	CV* (%)	Tamanho de partícula (nm)	PI*	CV* (%)	Err <sub>o</sub> (%)	Tamanho de partícula (nm)	PI*	CV* (%)	Err <sub>o</sub> (%)
1	800	13,2	10	50	4	256,00±3,68	1,00	1,4	208,40±3,05	1,00	1,5	18,6	208,40±3,05	1,00	1,5	18,6
2	800	13,2	10	80	2	825,00±9,12	1,00	1,1	708,50±2,51	1,00	0,4	14,2	708,50±2,51	1,00	0,4	14,2
3	800	13,2	30	50	2	300,00±3,54	1,00	1,2	216,60±3,11	1,00	1,4	27,8	216,60±3,11	1,00	1,4	27,8
4	800	13,2	30	80	4	116,00±5,13	1,02	4,4	150,70±5,58	1,00	3,7	29,9	150,70±5,58	1,00	3,7	29,9
5	800	25,6	10	50	2	242,00±7,75	1,00	3,2	196,30±2,69	1,00	1,4	18,9	196,30±2,69	1,00	1,4	18,9
6	800	25,6	10	80	4	244,00±4,89	1,00	2,0	304,10±2,87	1,00	0,9	24,6	304,10±2,87	1,00	0,9	24,6
7	800	25,6	30	50	4	274,00±2,65	1,00	1,0	393,90±3,54	1,00	0,9	43,7	393,90±3,54	1,00	0,9	43,7
8	800	25,6	30	80	2	312,00±5,02	1,00	1,6	280,50±4,94	1,00	1,8	10,1	280,50±4,94	1,00	1,8	10,1
9	1400	13,2	10	50	2	210,00±4,09	1,00	1,9	248,50±2,54	1,00	1,0	18,3	248,50±2,54	1,00	1,0	18,3
10	1400	13,2	10	80	4	398,00±3,11	1,00	0,8	336,40±4,98	1,00	1,5	15,5	336,40±4,98	1,00	1,5	15,5
11	1400	13,2	30	50	4	208,00±5,57	1,01	2,7	162,10±4,14	1,00	2,5	22,1	162,10±4,14	1,00	2,5	22,1
12	1400	13,2	30	80	2	454,00±5,14	1,00	1,1	400,80±4,58	1,00	1,1	11,7	400,80±4,58	1,00	1,1	11,7

Tabela - Continuação.

Experimento	Fatores experimentais				Resposta Experimental		Resposta Predita					
	Agitação (rpm)	Vazão( $\times 10^3$ )(kg.s <sup>-1</sup> )	Aquecimento depois da síntese (s)	Temperatura (°C)	Na <sub>3</sub> Cit (mM)	Tamanho de partícula (nm) <sup>a</sup>	PI*	CV* (%)	Tamanho de partícula (nm) <sup>a</sup>	PI*	CV* (%)	Erro (%)
13	1400	25,6	10	50	4	290,00±6,95	1,00	2,4	201,70±5,04	1,00	2,5	30,4
14	1400	25,6	10	80	2	265,00±5,47	1,00	2,1	217,20±3,68	1,00	1,5	18,0
15	1400	25,6	30	50	2	298,00±6,01	1,00	2,0	253,90±5,08	1,00	2,0	14,8
16	1400	25,6	30	80	4	206,00±2,99	1,00	1,5	169,40±2,06	1,00	1,2	17,8
17	500	19,4	20	70	3	289,00±4,66	1,00	1,6	306,60±5,01	1,00	1,6	6,1
18	1700	19,4	20	70	3	203,00±7,58	1,00	3,7	180,10±4,58	1,00	2,5	2,5
19	1100	6,2	20	70	3	249,00±7,06	1,00	2,8	209,50±4,44	1,00	2,1	15,9
20	1100	31,7	20	70	3	197,00±5,33	1,00	2,7	231,60±5,61	1,00	2,4	17,6
21	1100	19,4	0	70	3	301,00±8,45	1,00	2,8	292,40±2,98	1,00	1,0	2,8
22	1100	19,4	40	70	3	203,00±3,55	1,00	1,8	240,50±2,11	1,00	0,9	18,5
23	1100	19,4	20	40	3	257,00±3,77	1,00	1,5	241,50±3,07	1,00	1,3	6,0
24	<b>1100</b>	<b>19,4</b>	<b>20</b>	<b>100</b>	<b>3</b>	<b>22,10±0,38</b>	<b>1,00</b>	<b>1,7</b>	<b>28,70±0,42</b>	<b>1,00</b>	<b>1,4</b>	<b>29,8</b>
25	1100	19,4	20	70	1	317,00±9,95	1,00	3,1	353,00±5,44	1,00	0,5	11,4
26	1100	19,4	20	70	5	509,00±6,79	1,00	1,3	548,20±3,65	1,00	0,7	7,7
27	1100	19,4	20	70	3	185,00±5,21	1,00	2,8	197,90±4,70	1,00	2,4	7,0

\* Média do índice de polidispersidade e coeficiente de variação. <sup>a</sup> valores médios ± desvio padrão.

Tabela A2 - Dados complementares referente às soluções coloidais de nanopartículas de prata sintetizadas por citrato de sódio.

<b>Medidas complementares</b>				
<b>Experimento</b>	<b>Cor da solução após síntese</b>	<b>pH</b>	<b>Tamanho médio de partícula (nm)</b>	<b>Polidispersidade</b>
24	amarelo	6,72±0,04	58,5±1,59	0,838±0,067



## APÊNDICE B – Síntese AgNP com NaBH<sub>4</sub>

Tabela B1 – Planejamento central composto com as variáveis independentes e suas respostas experimentais e previstas para tamanho de partícula da síntese das AgNP por NaBH<sub>4</sub>.

Experimentos	Fatores experimentais				Resposta Experimental			Resposta predita			
	Agitação (rpm)	Vazão(×10 <sup>-5</sup> )(kg.s <sup>-1</sup> )	Temperatura para síntese (°C)	Concentração de borohidreto (mM)	Tamanho de partícula (nm) <sup>a</sup>	IP*	CV* (%)	Tamanho de partícula (nm) <sup>a</sup>	IP*	CV* (%)	Erro (%)
2	800	13,2	5	4	23,11±2,01	1,00	8,7	28,91±1,65	1,00	5,7	25,1
3	800	13,2	25	2	31,42±1,89	1,00	6,0	37,42±1,98	1,00	5,3	19,1
4	800	13,2	25	4	16,11±1,55	1,00	9,6	11,33±2,03	1,03	18,0	29,8
5	800	25,6	5	2	69,82±1,67	1,00	2,4	91,61±2,11	1,00	2,3	31,2
6	800	25,6	5	4	14,21±2,05	1,02	14,4	16,20±1,79	1,01	11,0	14,1
7	800	25,6	25	2	83,08±2,11	1,00	2,5	75,65±1,88	1,00	2,5	8,9
8	800	25,6	25	4	13,45±1,46	1,01	10,9	12,87±1,95	1,02	15,2	4,5
9	1400	13,2	5	2	52,20±1,78	1,00	3,4	64,68±1,34	1,00	2,1	23,7
10	1400	13,2	5	4	26,50±1,84	1,00	6,9	28,89±1,65	1,00	5,7	8,7
11	1400	13,2	25	2	68,80±1,48	1,00	2,1	51,77±1,33	1,00	2,6	24,8
12	1400	13,2	25	4	13,71±1,82	1,01	13,3	16,28±1,92	1,01	11,8	18,2
13	1400	25,6	5	2	75,19±1,91	1,00	2,5	64,87±1,76	1,00	2,7	13,7

Tabela – Continuação.

Experimentos	Fatores experimentais				Resposta Experimental		Resposta predita				
	Agitação (rpm)	Vazão( $\times 10^3$ )( $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Temperatura para síntese ( $^{\circ}\text{C}$ )	Concentração de borohidreto (mM)	Tamanho de partícula	IP*	CV*	Tamanho de partícula	IP*	CV*	Erro
					(nm) <sup>a</sup>	(%)	(nm) <sup>a</sup>	(%)	(%)	(%)	
14	1400	25,6	5	4	41,52 $\pm$ 2,07	1,00	5,0	44,80 $\pm$ 1,43	1,00	3,2	7,9
15	1400	25,6	25	2	45,45 $\pm$ 1,73	1,00	3,8	57,11 $\pm$ 1,53	1,00	2,7	25,8
16	1400	25,6	25	4	43,01 $\pm$ 1,49	1,00	3,5	41,42 $\pm$ 1,95	1,00	4,7	3,7
17	500	19,4	15	3	63,27 $\pm$ 1,54	1,00	2,4	65,50 $\pm$ 1,79	1,00	2,7	3,6
18	1700	19,4	15	3	85,14 $\pm$ 1,56	1,00	1,8	88,58 $\pm$ 1,73	1,00	1,9	3,9
19	1100	6,2	15	3	11,30 $\pm$ 1,67	1,02	14,8	15,39 $\pm$ 1,92	1,01	12,5	35,4
20	1100	31,7	15	3	17,97 $\pm$ 2,08	1,01	11,6	19,64 $\pm$ 1,66	1,00	8,5	9,5
21	1100	19,4	0	3	51,19 $\pm$ 1,94	1,00	3,8	62,51 $\pm$ 2,05	1,00	3,3	22,3
<b>22</b>	<b>1100</b>	<b>19,4</b>	<b>35</b>	<b>3</b>	<b>24,44<math>\pm</math>1,02</b>	<b>1,00</b>	<b>4,2</b>	<b>25,03<math>\pm</math>1,41</b>	<b>1,00</b>	<b>5,6</b>	<b>2,5</b>
24	1100	19,4	15	5	15,58 $\pm$ 1,49	1,00	9,6	10,65 $\pm$ 1,90	1,03	17,9	31,6
25	1100	19,4	15	3	32,56 $\pm$ 1,98	1,00	6,1	43,56 $\pm$ 2,15	1,00	4,9	33,8
26	1100	19,4	15	3	61,14 $\pm$ 2,17	1,00	3,5	62,88 $\pm$ 2,10	1,00	3,3	2,8

\* Média do índice de polidispersidade e coeficiente de variação. <sup>a</sup> valores médios  $\pm$  desvio padrão.

Tabela B2 - Medidas complementares das soluções de nanopartículas de prata sintetizadas com borohidreto\*.

Medidas complementares							
Experimentos	Cor da solução	pH	Z-médio (nm)	Polidispersidade	A <sub>máx</sub> <sup>1</sup>	λ <sub>máx</sub> <sup>2</sup> (nm)	FWHH <sup>3</sup> (nm)
2	Cinza	9,24±0,45	23,11±1,22	0,25±0,03	0,50±0,01	309,5±1,0	127,87±1,11
3	Amarelo	9,43±0,66	31,42±2,01	0,79±0,10	0,79±0,02	397,0±0,6	65,88±1,34
4	Cinza	9,56±0,44	16,12±2,30	0,65±0,05	0,49±0,03	389,0±0,7	128,73±1,03
5	Amarelo	9,26±0,17	69,81±1,45	0,18±0,11	0,73±0,01	400,0±1,1	73,85±1,18
6	Cinza	9,29±0,43	14,24±4,71	0,53±0,04	0,49±0,04	385,5±0,2	123,08±1,06
7	Amarelo	9,49±0,82	80,02±3,00	0,21±0,11	0,73±0,01	399,5±1,5	69,65±0,99
8	Cinza	9,58±0,65	13,40±2,10	0,60±0,11	0,52±0,02	309,5±0,5	119,00±1,62
9	Amarelo	9,33±0,32	52,20±3,12	0,26±0,08	0,68±0,02	397,5±0,2	94,16±1,80
10	Cinza	9,17±0,43	26,50±3,08	0,18±0,05	0,47±0,03	388,5±1,3	135,54±1,07
11	Amarelo	9,29±0,22	68,83±2,54	0,21±0,08	0,79±0,06	397,0±1,0	66,16±1,66
12	Cinza	9,63±0,34	13,78±3,01	0,59±0,10	0,52±0,01	388,5±2,0	119,14±1,80
13	Amarelo	9,34±0,65	75,18±4,89	0,19±0,12	0,82±0,02	398,0±2,7	69,71±1,04
14	Cinza	9,25±0,54	41,51±4,01	0,24±0,20	0,51±0,07	388,5±1,6	121,45±0,89
15	Amarelo	9,46±0,88	45,44±3,90	0,47±0,08	0,77±0,04	397,5±0,2	66,78±1,28
16	Cinza	9,64±0,45	53,00±2,80	0,57±0,20	0,51±0,04	388,5±2,2	128,09±1,04

Tabela B2 - Continuação.

Medidas complementares							
Experimentos	Cor da solução	pH	Z-médio (nm)	Polidispersidade	$A_{\text{máx}}^1$	$\lambda_{\text{máx}}^2$ (nm)	FWHH <sup>3</sup> (nm)
17	Laranja	9,37±0,22	73,29±4,02	0,15±0,11	0,55±0,02	394,5±0,9	115,45±1,20
18	Amarelo	9,37±0,55	85,17±3,08	0,14±0,04	0,78±0,01	399,0±3,1	73,57±1,87
19	Cinza	9,56±0,34	11,33±1,99	0,54±0,05	0,57±0,02	390,0±0,6	117,41±1,02
20	Amarelo	9,52±0,54	17,97±1,87	0,68±0,08	0,72±0,01	391,5±2,4	86,61±0,90
21	Amarelo	8,96±0,78	26,10±1,03	0,21±0,04	0,85±0,11	397,5±2,7	74,75±0,96
22	<b>Amarelo</b>	<b>9,60±0,23</b>	<b>24,40±1,55</b>	<b>0,14±0,02</b>	<b>0,92±0,04</b>	<b>394,0±1,8</b>	<b>61,40±1,03</b>
24	Cinza	9,37±0,13	15,51±3,09	0,64±0,09	0,51±0,02	392,5±0,5	121,8±1,80
25	Laranja	9,60±0,18	32,53±2,11	0,22±0,10	0,69±0,01	388,5±1,4	88,94±1,05
26	<b>Amarelo</b>	<b>9,59±0,70</b>	<b>31,10±1,60</b>	<b>0,19±0,09</b>	<b>0,91±0,04</b>	<b>394,5±1,5</b>	<b>47,12±1,01</b>

\* Condições selecionadas pelo planejamento experimental são apresentadas em negrito.

<sup>1</sup> valor máximo de absorção óptica.

<sup>2</sup> comprimento de onda no máximo de absorção.

<sup>3</sup> largura à meia-altura referente ao valor máximo de absorção óptica.

## APÊNDICE C – Estudo da estabilidade das AgNps

Tabela C1 - Planejamento experimental referente à adição de citrato de sódio como estabilizante na síntese de AgNP ( $R^2 = 0,9375$ )

Experimentos	Fatores		Valores					
	Relação molar $\text{NaBH}_4$ : $\text{AgNO}_3$	Concentração estabilizante (g/L)	Citrato de sódio			Polidispersidade <sup>a</sup>		
			IP*	CV* (%)	Polidispersidade <sup>a</sup> Valores Preditos	IP*	CV* (%)	Polidispersidade <sup>a</sup> Valores Experimentais
1	1	0,25	1,00	4,0	0,12±0,01	1,00	4,9	3,2
2	1	2,20	1,32	56,8	0,62±0,33	1,28	52,9	9,7
3	5	0,25	1,17	41,6	0,23±0,10	1,18	42,5	7,8
4	5	2,20	1,17	40,8	0,18±0,09	1,23	47,5	16,55
5	0,2	1,50	1,28	52,8	0,67±0,10	1,02	15,4	3,47
6	6	1,50	1,53	73,0	0,27±0,07	1,07	27,6	15,02
7	3	0,12	1,03	17,9	0,17±0,09	1,30	54,9	1,15
8	3	2,88	1,58	76,4	0,32±0,05	1,03	16,3	3,6
9	3	1,50	1,06	24,4	0,29±0,11	1,13	35,6	5,3
10	3	1,50	1,12	34,7	0,29±0,03	1,01	8,4	2,4

\* Média do índice de polidispersidade e coeficiente de variação. <sup>a</sup> valores médios ± desvio padrão.

Tabela C2 - Planejamento experimental referente à adição de SDS como estabilizante na síntese de AgNP ( $R^2 = 0,9548$ ).

Experimentos	Fatores		Valores						
	Relação molar $\text{NaBH}_4$ : $\text{AgNO}_3$	Concentração estabilizante (g/L)	SDS		Polidispersi				
			Polidispersidade Valores Experimentais	IP* (%)	CV* (%)	Polidispersidade Valores Preditos	IP* (%)	CV* (%)	Erro (%)
1		0,25	0,41±0,19	1,21	46,2	0,48±0,09	1,04	20,6	17,4
2		2,20	0,35±0,09	1,06	25,3	0,35±0,11	1,10	31,9	1,1
3		0,25	0,49±0,04	1,00	7,3	0,51±0,16	1,09	31,6	3,3
4		2,20	0,29±0,01	1,03	4,1	0,28±0,04	1,02	15,6	3,1
5	0,2	1,50	0,50±0,10	1,04	20,3	0,54±0,11	1,04	20,8	7,9
6		1,50	0,21±0,09	1,19	43,7	0,22±0,07	1,11	34,2	6,3
7		0,12	0,51±0,20	1,15	38,9	0,43±0,10	1,06	23,6	15,1
8		2,88	0,15±0,01	1,01	10,3	0,20±0,09	1,19	43,6	38,3
9		1,50	0,15±0,07	1,23	48,7	0,19±0,02	1,01	10,0	22,7
10		1,50	0,16±0,07	1,21	46,2	0,19±0,05	1,08	28,6	19,6

\* Média do índice de polidispersidade e coeficiente de variação. <sup>a</sup> valores médios ± desvio padrão.

Tabela C3 - Planejamento experimental referente à adição de PVA como estabilizantes na síntese de AgNP ( $R^2 = 0,9251$ ).

Experimentos	Fatores		PVA						
	Relação molar NaBH <sub>4</sub> : AgNO <sub>3</sub>	Concentração estabilizante (g/L)	Valores			PVA			
			Polidispersidade Valores Experimentais	IP*	CV*	Polidispersidade Valores Preditos	IP*	CV*	Erro (%)
1	1	0,25	0,49±0,10	1,04	20,9	0,48±0,16	1,11	33,7	1,8
2	1	2,20	0,17±0,04	1,06	24,1	0,16±0,03	1,03	18,5	7,6
3	5	0,25	0,55±0,11	1,04	20,7	0,46±0,11	1,06	23,9	14,8
4	5	2,20	0,21±0,09	1,23	47,8	0,25±0,02	1,00	7,17	21,2
5	0,2	1,50	0,62±0,02	1,00	3,6	0,59±0,13	1,04	21,0	3,1
6	6	1,50	0,38±0,02	1,00	3,9	0,32±0,10	1,11	32,6	16,1
7	3	0,12	0,28±0,07	1,06	23,9	0,27±0,02	1,00	6,2	2,5
8	3	2,88	<b>0,19±0,01</b>	<b>1,00</b>	<b>5,5</b>	<b>0,20±0,01</b>	<b>1,00</b>	<b>4,5</b>	<b>1,5</b>
9	3	1,50	0,25±0,04	1,02	15,8	0,21±0,10	1,25	50,5	15,8
10	3	1,50	0,24±0,09	1,03	35,8	0,21±0,01	1,00	5,3	14,8

\* Média do índice de polidispersidade e coeficiente de variação. <sup>a</sup> valores médios ± desvio padrão.

Tabela C4. Medidas complementares das AgNP sintetizadas com NaBH<sub>4</sub> e citrato de sódio\*.  
**Medidas complementares**

Experimentos	pH	Conduti- vidade elétrica (mV)	Z-médio (nm)	Polidis- persidade (%)	Potencial Zeta (mV)	$\lambda_{\text{máx}}^1$ (nm)	$A_{\text{máx}}^2$	<b>FWHH<sup>3</sup></b> (nm)
<b>Controle</b>	9,60±0,10	-133,5±0,9	112,0±1,0	25,2±0,9	-25,9±0,5	386±1,0	1,45±0,65	88,9±0,9
<b>1</b>	<b>9,82±0,21</b>	<b>-131,9±0,8</b>	<b>58,5±0,8</b>	<b>12,6±0,3</b>	<b>-35,8±0,6</b>	<b>393±1,0</b>	<b>1,49±0,10</b>	<b>70,3±0,5</b>
<b>2</b>	9,65±0,08	-123,4±1,0	37,8±1,1	56,7±1,0	-19,0±0,8	390±0,5	1,21±0,30	90,5±1,0
<b>3</b>	10,06±0,63	-145,8±1,1	69,4±0,9	25,5±1,1	-18,7±0,4	389±0,8	1,44±0,10	77,8±0,4
<b>4</b>	<b>10,06±0,42</b>	<b>-142,1±0,7</b>	<b>74,1±1,2</b>	<b>22,8±0,6</b>	<b>-23,0±0,5</b>	<b>393±1,0</b>	<b>1,24±0,52</b>	<b>74,0±0,6</b>
<b>5</b>	8,77±0,23	-78,70±1,0	111,0±1,0	69,1±0,5	-15,7±1,0	399±0,7	1,03±0,41	75,7±1,2
<b>6</b>	10,03±0,84	-144,3±1,2	79,9±1,0	23,3±1,5	-31,1±0,7	392±0,8	1,31±0,73	75,6±1,0
<b>7</b>	<b>9,93±0,22</b>	<b>-138,0±0,9</b>	<b>28,8±0,7</b>	<b>17,3±0,4</b>	<b>-28,6±0,4</b>	<b>391±0,6</b>	<b>1,54±0,50</b>	<b>74,9±0,8</b>
<b>8</b>	9,86±0,91	-134,1±0,8	141,0±1,5	33,1±1,0	-34,1±1,1	400±1,2	0,69±1,00	68,7±1,6
<b>9</b>	9,86±0,70	-134,1±1,0	63,6±1,5	28,3±0,3	-6,29±1,0	392±1,0	1,33±1,11	77,1±1,4
<b>10</b>	9,87±0,65	-134,6±1,2	76,8±1,2	29,1±0,6	-10,7±1,2	396±0,5	1,25±1,07	64,6±0,3

\* Condições selecionadas pelo planejamento experimental são apresentadas em negrito; <sup>1</sup> comprimento de onda no máximo de absorção; <sup>2</sup> valor máximo de absorção; <sup>3</sup> largura à meia-altura referente ao valor máximo de absorção óptica

Tabela C5. Medidas complementares das soluções de AgNP sintetizadas com NaBH<sub>4</sub> e SDS\*.

		Medidas complementares						
Experimentos	pH	Condutividade elétrica (mV)	Z-médio (nm)	Polidispersidade (%)	Potencial Zeta (mV)	A <sub>máx</sub> <sup>1</sup>	λ <sub>máx</sub> <sup>2</sup> (nm)	FWHH <sup>3</sup> (nm)
Controle	9,60±0,10	-133,5±0,9	112,0±1,0	25,2±0,9	-25,9±0,5	386±1,0	1,45±0,650	88,9±0,9
1	9,11±0,89	-104,9±0,6	155,0±2,0	40,9±1,2	-22,3±0,3	394±0,8	2,22±0,980	60,2±1,1
2	9,23±0,54	-113,6±0,5	115,0±1,8	35,1±0,7	-27,7±1,2	395±0,5	2,79±0,326	67,8±0,5
3	9,59±0,12	-136,4±0,8	9,8±0,9	49,0±0,8	-27,2±0,4	386±1,1	2,22±0,301	83,3±0,3
4	<b>9,66±0,15</b>	<b>-138,0±0,4</b>	<b>74,0±0,1</b>	<b>20,0±0,4</b>	<b>-30,5±0,8</b>	<b>393±0,6</b>	<b>2,63±0,180</b>	<b>81,4±0,4</b>
5	9,04±0,17	-102,9±0,9	197,0±1,6	50,3±1,0	-15,0±0,3	400±0,8	1,14±0,134	74,2±0,3
6	9,72±0,21	-144,5±0,2	52,2±0,9	29,6±0,3	-22,3±1,1	392±0,2	2,65±0,197	77,4±1,1
7	9,56±0,45	-133,0±0,3	11,4±0,3	50,9±0,5	-25,6±0,4	388±0,4	2,49±0,150	71,6±1,0
8	9,54±0,88	-132,0±0,5	43,0±0,9	24,6±0,1	-15,8±0,8	393±0,7	2,82±0,702	72,6±1,4
9	9,55±0,82	-132,2±0,7	59,4±0,7	25,4±0,6	-20,8±0,5	392±1,1	2,83±0,544	72,4±0,6
10	9,48±0,90	-129,0±0,5	47,4±0,3	25,8±1,1	-23,7±1,3	394±1,2	2,86±0,509	70,1±0,8

\* Condições selecionadas pelo planejamento experimental são apresentadas em negrito; valor máximo de absorção;

<sup>2</sup> comprimento de onda no máximo de absorção, <sup>3</sup> largura à meia-altura referente ao valor máximo de absorção óptica

Tabela C6. Medidas complementares das soluções de AgNP sintetizadas com NaBH<sub>4</sub> e PVA\*.

Experimentos	Medidas complementares							
	pH	Condutividade elétrica (mV)	Z-médio (nm)	Polidispersidade (%)	Potencia I Zeta (mV)	A <sub>máx</sub> <sup>1</sup>	λ <sub>máx</sub> <sup>2</sup> (nm)	FWHH <sup>3</sup> (nm)
<b>Controle</b>	9,60±0,10	-133,5±0,9	112±1,0	25,2±0,9	-25,9±0,5	386±1,0	1,45±0,650	88,9±0,9
<b>1</b>	9,11±0,88	-116,5±1,0	440±2,1	49,2±1,2	-17,7±0,9	397±0,9	2,61±0,743	86,9±1,1
<b>2</b>	9,62±0,51	-146,8±1,2	55,3±1,6	47,0±1,5	-17,9±1,4	399±1,1	2,78±0,299	72,5±0,7
<b>3</b>	9,51±0,23	-140,9±0,8	89,6±1,2	54,6±0,5	-17,2±1,3	401±1,2	2,75±0,309	76,4±1,2
<b>4</b>	7,54±0,90	-21,6±0,6	65,0±0,8	30,7±0,7	-20,5±1,9	398±0,7	2,71±0,205	73,4±0,5
<b>5</b>	9,52±0,65	-143,3±0,5	73,3±0,6	61,8±0,8	-15,0±1,1	393±0,8	2,58±0,511	85,3±1,4
<b>6</b>	9,41±0,11	-134,4±1,3	79,6±0,4	38,4±1,5	-22,3±0,8	398±0,7	2,74±0,444	74,5±0,7
<b>7</b>	9,28±0,37	-127,8±1,0	70,3±0,9	48,0±1,3	-15,6±0,5	399±1,0	2,77±0,397	74,3±1,5
<b>8</b>	<b>9,43±0,40</b>	<b>-135,5±0,9</b>	<b>23,7±0,3</b>	<b>29,2±0,8</b>	<b>-25,8±0,7</b>	<b>400±0,9</b>	<b>2,76±0,208</b>	<b>75,4±0,6</b>
<b>9</b>	9,28±0,31	-127,1±0,9	98,7±0,7	34,7±1,3	-20,8±0,8	400±0,6	2,86±0,567	75,6±1,3
<b>10</b>	9,40±0,91	-135,7±1,4	49,2±0,3	34,3±1,2	-23,7±1,2	399±0,5	2,80±0,299	74,7±1,0

\* Condições selecionadas pelo planejamento experimental são apresentadas em negrito; <sup>1</sup>valor máximo de absorção óptica; <sup>2</sup>comprimento de onda no máximo de absorção; <sup>3</sup> largura à meia-altura referente ao valor máximo de absorção óptica

## APÊNDICE D – Estudo da hidrofobização das AgNps

Tabela D1. Planejamento experimental referente às condições de transferência de fase das AgNP.

Fatores		Valores						
Volume ácido oléico (mL)	Volume ácido fosfórico (mL)	Densidade óptica Valores Experimentais <sup>a</sup>	IP*	CV* (%)	Densidade óptica Valores Preditos <sup>a</sup>	IP*	CV** (%)	Erro (%)
1	0,3	0,805±0,102	1,02	12,7	1,05±0,09	1,01	8,4	30,3
2	0,3	1,103±0,077	1,01	7,0	1,12±0,09	1,01	8,1	1,6
5	0,1	1,175±0,051	1,00	4,3	1,19±0,04	1,00	3,5	1,7
7	2,1	0,737±0,094	1,02	12,7	0,51±0,07	1,02	14,4	31,2
9	2,1	0,356±0,106	1,09	29,8	0,26±0,05	1,03	18,3	26,1

\* Média do índice de polidispersidade e coeficiente de variação. <sup>a</sup> valores médios ± desvio padrão.



## APÊNDICE E – Cinética de polimerização em massa do PS puro e aditivado com AgNP

Tabela E1 - Cinética da polimerização em massa do poliestireno puro e com AgNP.

Tempo de reação (min)	Conversão (%) <sup>a</sup> AgNP	
	PS puro	PS ± 1,47
0	0,23 ± 0,50	3,72± 1,94
15	6,59 ± 1,23	9,88± 1,52
30	14,09 ± 2,13	18,44± 1,25
45	19,33 ± 2,20	13,42± 1,35
60	26,00 ± 2,29	28,01± 1,72
75	26,37 ± 1,11	33,31± 1,35
90	30,53 ± 2,23	39,28± 1,29
105	36,25 ± 2,16	41,60± 1,02
120	41,34 ± 2,13	50,13± 2,37
135	52,36 ± 1,23	58,17± 2,17
150	55,73 ± 2,16	61,04± 2,01
165	56,71 ± 2,20	65,20± 2,01
180	63,25 ± 2,21	70,39± 2,92
195	65,13 ± 2,20	71,92± 1,86
210	67,89 ± 2,54	74,38± 1,94
225	72,60 ± 2,52	78,44± 1,70
240	78,63 ± 2,35	83,04± 1,76
255	83,66 ± 1,30	85,60± 1,44
270	88,13 ± 2,28	87,39± 1,66
285	89,52 ± 1,26	90,59± 1,39
300	90,37 ± 1,12	90,37± 1,94
315	92,55 ± 1,23	91,54± 1,85
330	93,47 ± 1,12	96,78± 2,37
345	98,02 ± 2,13	98,03 ± 2,18
360	100,01 ± 2,12	100,02± 1,38
375	100,04 ± 1,55	100,00

<sup>a</sup> valores médios ± desvio padrão.



## APÊNDICE F – Cinética de polimerização em massa do PS puro e aditivado com AgNP nas concentrações bacteriostática e bactericida

Tabela F1 - Cinética da polimerização do poliestireno puro e com AgNP.

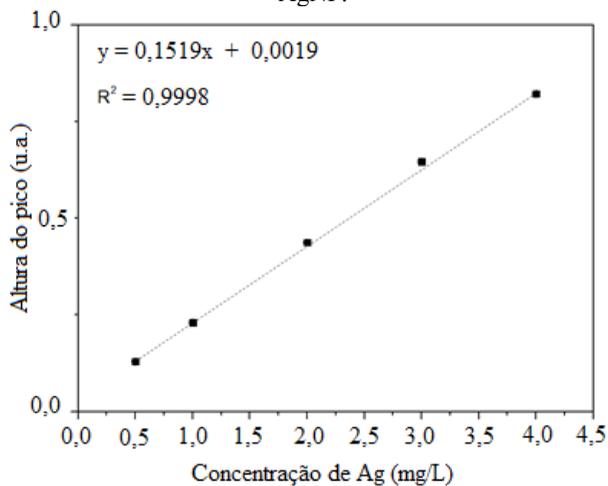
Tempo de reação (min)	Conversão (%) <sup>a</sup>		
	PS puro	PS + AgNP (bacteriostática)	PS + AgNP (bactericida)
0	1,83 ± 0,50	14,00 ± 1,47	47,22 ± 1,12
15	3,27 ± 1,23	22,86 ± 1,94	48,26 ± 2,13
30	10,84 ± 2,13	29,09 ± 1,52	50,20 ± 2,12
45	21,39 ± 2,19	34,97 ± 1,25	53,88 ± 1,55
60	26,21 ± 2,29	36,28 ± 1,35	57,18 ± 1,25
75	30,93 ± 1,11	44,58 ± 1,72	59,98 ± 2,35
90	34,87 ± 2,23	51,91 ± 1,35	64,29 ± 2,01
105	36,41 ± 2,16	60,36 ± 1,29	67,75 ± 1,03
120	43,01 ± 2,13	66,25 ± 1,02	69,58 ± 1,04
135	47,63 ± 1,23	67,42 ± 2,37	70,38 ± 2,00
150	53,97 ± 2,16	70,98 ± 2,17	71,75 ± 2,01
165	57,27 ± 2,19	74,17 ± 2,01	73,67 ± 1,75
180	60,65 ± 2,21	78,39 ± 2,02	74,69 ± 1,64
195	67,03 ± 2,20	81,35 ± 2,92	76,45 ± 1,96
210	70,77 ± 2,54	85,60 ± 1,86	77,67 ± 1,95
225	76,91 ± 2,52	86,33 ± 1,94	79,57 ± 0,89
240	82,36 ± 2,35	88,56 ± 1,70	80,27 ± 1,00
255	94,90 ± 1,30	89,64 ± 1,76	81,54 ± 1,25
270	100,05 ± 2,28	90,17 ± 1,44	81,68 ± 1,66
285	100,04 ± 1,26	90,38 ± 1,66	82,05 ± 1,48
300	100,08 ± 1,12	92,19 ± 1,38	82,16 ± 1,36
315	100,06 ± 1,23	92,42 ± 1,94	82,41 ± 1,98
330	100,06 ± 1,12	92,46 ± 1,84	82,64 ± 1,97
345	100,04 ± 2,13	92,94 ± 2,37	82,86 ± 2,30
360	100,02 ± 2,12	95,25 ± 2,18	83,08 ± 2,01
375	100,00 ± 1,55	95,12 ± 1,38	83,31 ± 2,12
390	100,00 ± 1,25	95,67 ± 1,75	83,53 ± 2,54
405	100,01 ± 2,35	96,19 ± 1,47	83,75 ± 2,35
420	100,02 ± 2,01	96,68 ± 1,28	83,98 ± 2,87
435	100,01 ± 1,02	97,15 ± 2,47	84,19 ± 2,34
450	100,01 ± 1,02	97,58 ± 2,02	84,42 ± 2,31
465	100,02 ± 2,00	97,99 ± 1,95	84,64 ± 1,23
480	100,01 ± 2,01	98,76 ± 2,02	84,87 ± 1,65
495	100,01 ± 1,75	99,12 ± 2,98	85,09 ± 1,25
510	100,09 ± 1,64	99,46 ± 2,92	85,31 ± 1,25
525	100,09 ± 1,96	99,78 ± 2,47	85,54 ± 1,36
540	100,01 ± 1,95	100,08 ± 2,19	85,76 ± 1,24
555	100,00 ± 1,53	100,07 ± 2,18	85,98 ± 1,59
570	100,00 ± 1,25	100,06 ± 1,85	86,21 ± 1,36
585	100,00 ± 1,30	100,02 ± 1,75	86,43 ± 1,29
600	100,00 ± 1,45	100,02 ± 1,66	86,65 ± 1,29

<sup>a</sup> valores médios ± desvio padrão.



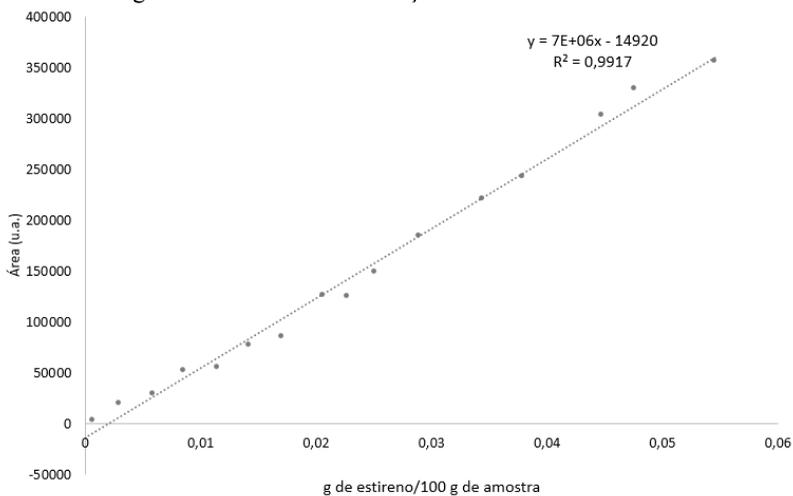
## APÊNDICE G – Curvas de calibração

Figura G1 – Curva de calibração das condições experimentais otimizadas das AgNP.



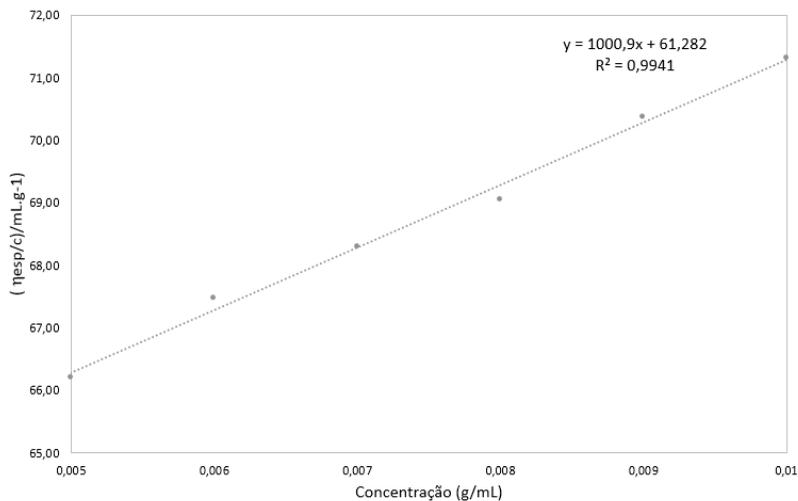
Fonte: do autor.

Figura G2 – Curva de calibração de monômero estireno.



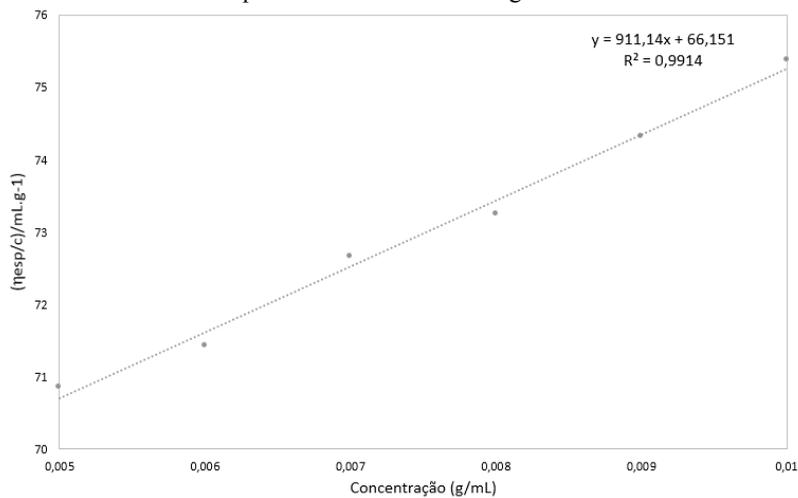
Fonte: do autor.

Figura G3 – Curva de calibração para a determinação das massas moleculares por viscosimetria do PS puro.



Fonte: do autor.

Figura G4 – Curva de calibração para a determinação das massas moleculares por viscosimetria do PS/AgNP.



Fonte: do autor.