



PATRICIA FERNANDA ANDRADE

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS ANTIMICROBIANOS**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

PATRICIA FERNANDA ANDRADE

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS ANTIMICROBIANOS**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DO CARMO GONÇALVES

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM
CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR PATRICIA
FERNANDA ANDRADE, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA DO CARMO
GONÇALVES.**

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

An24p Andrade, Patricia Fernanda, 1977-
Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e de nanocompósitos
poliméricos antimicrobianos / Patricia Fernanda Andrade. – Campinas, SP : [s.n.],
2013.

Orientador: Maria do Carmo Gonçalves.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nanopartículas de prata. 2. Materiais nanocompósitos poliméricos. 3.
Atividade antimicrobiana. 4. Morfologia. I. Gonçalves, Maria do Carmo. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preparation and characterization of silver nanoparticles and
antimicrobial polymer nanocomposites

Palavras-chave em inglês:

Silver nanoparticles

Materials nanocomposite membranes

Antimicrobial activity

Morphology

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Maria do Carmo Gonçalves [Orientador]

Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Dario Windmüller

Camila Alves de Rezende

Italo Odone Mazali

Data de defesa: 03-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Química

Dedico este trabalho aos meus pais Fernando Andrade (in memoriam) e Maria de Lourdes, por me apoiarem nos momentos mais difíceis da minha trajetória pessoal e profissional, aos meus irmãos e sobrinhos, pelos quais tenho muito carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar e proteger durante toda minha vida, dando-me forças para não desanimar, para persistir e por tornar tudo possível.

À minha família, pelo constante apoio, sempre respeitando e incentivando minhas escolhas e decisões.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria do Carmo Gonçalves, pela orientação deste trabalho, a quem devo grande parte desta vitória. Sou imensamente grata pelo conhecimento que recebi, tanto profissional como pessoal, pelas oportunidades que me foram dadas nestes anos de trabalho, pelas críticas sempre construtivas, pela paciência em muitos momentos difíceis e por ter acreditado que eu podia chegar até aqui. Nunca me esquecerei da forma como me acolheu quando cheguei nesta cidade.

À CAPES pela bolsa concedida, sem a qual a realização deste trabalho seria impossível.

A todos os órgãos de fomento à pesquisa (FAPESP, CAPES) e aos projetos que forneceram infra-estrutura, sem a qual não realizaria este trabalho

Aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado nos momentos difíceis, cujas lembranças ficarão guardadas com carinho em minha memória. Em especial: Larissa, Ana Paula Camilo, Luiz Pereira, Fernando Quites, Cintia, Marcos, Karina, Helton, Caio, Juliana Aristéia, Sebastian, Fabiana Pires e Geovana.

Aos colegas de laboratório: Miguel, Rafael Trinca, Rosalva, Lívia Mesquita, Lívia Contar, Marcelo, Laura, Márcia Favaro, Márcia Taipina, Evandro, Liliane Battitola, Liliane Samara, Igor, Douglas, Thiago Rufino.

À Faepex pelos auxílios concedidos para participação em congressos.

Aos técnicos que contribuíram para a realização de algumas atividades importantes deste trabalho: Fabi, Cláudia, Carlos Leite, Márcia, Pimpim, Daniel, Renata, Diva, Douglas e Raquel.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda pelas medidas de ICP-MS.

Aos Profs. Drs. Nelson Durán Caballero e Ljubica Tasic, gostaria de agradecê-los, pela boa recepção no seu laboratório, bem como pela permissão para utilização de toda a estrutura física para realização dos ensaios microbiológicos e medidas de DLS.

Ao Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves que me deu a honra de poder desenvolver um trabalho em conjunto com a pós-doc Andreia Fonseca de Faria e sua aluna de doutorado Ana Carolina, trabalho este que foi fruto de uma patente e duas futuras publicações.

Ao Prof. Dr. Juliano Alves Bonancin pelas contribuições em artigos e tese.

Ao Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior (UNESP-Araraquara), pelas contribuições e ideias iniciais em trabalhar com as nanopartículas de prata estabilizadas com β -ciclodextrina.

À Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari (USP-Ribeirão Preto), pela disponibilidade em iniciar os ensaios microbiológicos com os materiais apresentados nesta tese.

À Andreia Fonseca de Faria, gostaria de agradecer por ter dado continuidade aos ensaios microbiológicos, pelas grandes contribuições científicas durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Ronei Jesus Poppi pelas medidas de Raman.

A todos que não constam nesta nota, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

1. Dados Pessoais

Nome: Patricia Fernanda Andrade

e-mail: patyazulo@hotmail.com

2. Formação acadêmica

2.1. Doutorado em Química

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Título da tese: Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e de nanocompósitos poliméricos antimicrobianos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Gonçalves

Período: 2009-2013

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2.2. Mestrado em Química

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

Título da dissertação: Síntese e caracterização de compósitos de carbono obtidos a partir de borra de petróleo,

Orientadora: Profa. Dra. Ledjane Silva Barreto.

Período: 2005-2008

2.3. Curso de Especialização em Ciências da Natureza

Instituição: Universidade Portiguar.

Orientadora: MSc. Djalma Andrade

Período: 2006

2.4. Graduação em Química

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

Período: 1999-2004

2.5. Ensino Médio

Instituição: Centro Federal de Educação Tecnológica de Sergipe

Período: 1993-1997

3. Participação em disciplinas

Estágio docente na disciplina Físico-Química Experimental (QF-632) – 2º semestre de 2012, sob supervisão do prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

4. Produção científica

4.1. Artigos

Conductive carbon-clay nanocomposites from petroleum oily sludge, Patricia Fernanda Andrade, Thiago Figueiredo Azevedo, Iara F Gimenez, Antonio Gomes Souza Filho, Ledjane Silva Barreto, *Journal of hazardous materials*, 167, 879-884, 2009.

Study on the composition of mineral scales in oil Wells, Karina Araújo Kodel, Patrícia Fernanda Andrade, João Vinícius Batista Valença, Divanizia do Nascimento Souza, *Journal of Petroleum Science & Engineering*, 81, 1-6, 2012.

A simple method to synthesize fluorescent modified gold nanoparticles using tryptamine as the reducing and capping agent, Marcos Alberto de Carvalho, Patrícia Fernanda Andrade, Fabiana Cristina Andrade Corbi, Maria do Carmo Gonçalves, André Luiz Barboza Formiga, Ítalo Odone Mazali, Juliano Alves Bonacin, Pedro Paulo Corbi *Synthetic Metals*, 185-186, 61-65, 2013.

Structural and morphological investigations of β -cyclodextrin-coated silver nanoparticles, Patricia Fernanda Andrade, Andreia Fonseca de Faria, Douglas Soares da Silva, Juliano Alves Bonacin, Maria do Carmo Gonçalves, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, em revisão.

4.2. Trabalhos apresentados em congressos

4.2.1. Andrade, P. F., Favaro, M. M., Santos, F. J., Jafellici, M. J., Gonçalves, M. C. **Preparation and characterization of poly(lactic acid)/silver nanocomposites.** XII International Macromolecular Colloquium and 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites, realizado no período de 7 a 10 de setembro de 2010 em Gramado - RS.

4.2.2. Andrade, P. F., Gonçalves, M. C. **Nanopartículas de prata/poli(vinilpirrolidona): obtenção e caracterização.** 19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência de Materiais – CBECiMAT, realizado no período de 21 a 25 de novembro de 2010 em Campos do Jordão - SP.

4.2.3. Andrade, P. F., Gonçalves, M. C. **Preparação e caracterização de membranas de acetato de celulose e nanopartículas de prata.** 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, realizado no período de 28 a 31 de maio de 2012 em Águas de Lindóia - SP.

4.2.4. Andrade, P. F., Gonçalves, M. C. **Polysulfone membranes containing silver nanoparticles.** World Polymer Congress, realizado no período de 24 a 29 de junho de 2012 em Blacksburg - Virginia - USA.

4.2.5. Andrade, P. F., Faria A. F., Gonçalves, M. C. **Biofouling reduction in cellulose acetate membranes containing silver nanoparticles.** European Polymer Congress, realizado no período de 16-21 de julho de 2013 em Pisa - Itália.

4.2.6. Andrade, P. F; Faria, A. F., da Silva, D. S., Bonacin, J. A., Gonçalves, M. C. **Characterization on the β -cyclodextrin stabilizing layer around silver nanoparticles**. XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, realizado no período de 20 a 23 de outubro de 2013 em Caxambu - MG.

4.3. Patente

Processo de obtenção de membranas poliméricas porosas antibacterianas a partir de acetato de celulose e nanopartículas de prata suportadas em óxido de grafeno, Alves, O. L., Faria, A. F., Gonçalves, M. C., Andrade, P.F; Moraes, A. C. M. Número do registro: BR1020130266396, data de depósito: 16/10/2013, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

4.4. Prêmio e Títulos

Prêmio de melhor trabalho (Painel) na área de Nanotecnologia-Materiais, intitulado **“Characterization on the β -cyclodextrin stabilizing layer around silver nanoparticles”**, autoria Patrícia Fernanda Andrade, Andreia Fonseca de Faria, Douglas Soares da Silva, Juliano Alves Bonacin, Maria do Carmo Gonçalves, apresentado durante o XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, realizado no período de 20 a 23 de outubro de 2013 em Caxambu - MG.

5. Participação em cursos

5.1. Curso de “Espectroscopia no Infravermelho Próximo: Fundamentos, Aspectos Práticos e Aplicações Analíticas”, Prof. Célio Pasquine, de 18 a 22/07/20011 no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.

5.2. Monitora do Programa UPA 2011 – Universidade de Portas Abertas, no Instituto de Química, realizado nos dias 02 e 03 de setembro de 2011.

5.3. Curso de “**Estrutura Eletrônica de Compostos de Coordenação**”, Prof.Dr. André Luiz Barboza Formiga, realizado no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas entre os dias 02 e 15 de Fevereiro de 2012, totalizando 30 h.

5.4. Curso de “**Biomateriais Poliméricos**”, ministrado por Luiz Henrique Catalani (IQ-USP) e Edvani Curti Muniz (UEM), realizado durante a 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química entre os dias 29 e 31 de maio de 2012, em Águas de Lindóia, totalizando 6 h.

5.5. Curso de “**Química e Espectroscopia de Elementos f**”, Profs. Ana de Bettencourt Dias (University of Nevada), Marco Aurelio Cebim (IQ-UNESP) e Fernando A. Sigoli, realizado no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas entre os dias 04 e 15 de Março de 2013, totalizando 30 h.

5.6. Curso de “**Microscopia de Força Atômica**”, ministrado por Luciano Paulino da Silva, realizado durante o XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, realizado no período de 20 a 23 de outubro de 2013 em Caxambu-MG, totalizando 3 h.

5.7. “V Curso Teórico-Prático de Microscopia Eletrônica de Transmissão”, realizado pelo laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), no período de 06 a 17 de janeiro de 2014 em Campinas-SP, totalizando 76 h.

RESUMO

Neste trabalho foram preparadas e caracterizadas nanopartículas de prata estabilizadas com polivinilpirrolidona (PVP) e β -ciclodextrina (β -CD), que foram incorporadas em matrizes poliméricas, para a obtenção de membranas. As nanopartículas de prata (AgNP) foram sintetizadas pelo método de redução química. Para as AgNP-PVP, foi investigada a influência da concentração do precursor (AgNO_3) e da razão molar de PVP em relação ao precursor. A partir dos resultados obtidos, foram selecionadas as melhores condições experimentais para a preparação das AgNP- β -CD. As AgNP foram caracterizadas por espectroscopias na região do ultravioleta-visível e na região do infravermelho com transformada de Fourier (UV-vis e FTIR), difração de raios X (DRX), espectroscopia de espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e análise termogravimétrica (TGA). As morfologias das AgNP-PVP e AgNP- β -CD foram investigadas visando a caracterização da camada de polímero ao redor das nanopartículas, pela técnica de imagem espectroscópica de elétrons associada à microscopia eletrônica de transmissão (ESI-TEM). As nanopartículas estabilizadas com PVP apresentaram diâmetro médio de 45 nm, quando preparadas a partir da concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e razão molar PVP/ AgNO_3 igual a 1,5. As nanopartículas estabilizadas por β -CD apresentaram diâmetro médio de 28 nm, quando preparadas nas mesmas condições indicadas para as de AgNP-PVP. O estudo morfológico da camada polimérica ao redor das AgNP-PVP e AgNP- β -CD, realizado por ESI-TEM, confirmou a maior concentração de carbono e oxigênio nessa região, sugerindo a existência de uma camada definida e coesa dos estabilizantes envolvendo as nanopartículas. Os valores de concentração mínima inibitória contra a *E. coli*, após 3 h e 2 h de incubação, foram $12,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para AgNP-PVP e AgNP- β -CD, respectivamente. As membranas de polissulfona (PSf) e acetato de celulose (CA), contendo AgNP-PVP e AgNP- β -CD, respectivamente, foram obtidas pelo método de inversão de fases, tendo como variável a quantidade de AgNP adicionada às matrizes poliméricas.

Todas as membranas foram caracterizadas por UV-vis, DRX, FTIR, microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FESEM), TEM, calorimetria diferencial de varredura (DSC), TGA, ângulo de contato e fluxo de água. A incorporação de nanopartículas de prata nas membranas de PSf e CA foi realizada utilizando diferentes metodologias, que influenciaram tanto o diâmetro médio das nanopartículas, quanto a morfologia e sua distribuição na matriz polimérica. A incorporação das nanopartículas nas membranas não alterou a estabilidade térmica das matrizes poliméricas, entretanto, aumentou seu caráter hidrofílico e, conseqüentemente, o fluxo de água. A membrana de PSf, contendo 2% de AgNP, apresentou 100% de inibição de crescimento bacteriano para *E. coli*, como também a membrana CA para *S. aureus* e *E. coli*. As membranas de PSf e CA, contendo 2% de AgNP, apresentaram redução na formação de biofilme para *E. coli* de $89 \pm 1\%$ e $98 \pm 3\%$, respectivamente. Estas membranas podem ser consideradas interessantes em diferentes aplicações, tais como no tratamento de água e recuperação de águas residuais.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs), stabilized with polyvinylpyrrolidone (PVP) and β -cyclodextrin (β -CD), were prepared, characterized and incorporated into polymer matrices to produce membranes in this work. The AgNPs were synthesized by the chemical reduction method. The influence of the precursor concentration and PVP molar ratio in relation to the precursor concentration (AgNO_3) was investigated for the AgNP-PVP. Based on the results, the best experimental conditions were selected for the preparation of AgNP- β -CD. The AgNPs were characterized by UV-visible and Fourier transformed infrared spectroscopies (FTIR and UV-vis), X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and thermogravimetry analysis (TGA). The morphologies of the AgNP-PVP and AgNP- β -CD were investigated by electron spectroscopy image associated to TEM (ESI-TEM) to characterize the polymer layer around the nanoparticles. The nanoparticles which were stabilized with PVP presented an average diameter of 45 nm, when prepared from the 0.01 mol L^{-1} concentration and 1.5 PVP/ AgNO_3 molar ratio. The nanoparticles which were stabilized by β -CD showed an average diameter of 28 nm, when prepared under the same conditions indicated above. The morphological study of the polymeric layer around the AgNP-PVP and AgNP- β -CD, carried out by ESI-TEM, confirmed a greater concentration of carbon and oxygen in this region, suggesting the existence of a defined and cohesive stabilizing layer surrounding the nanoparticles. The minimum inhibitory concentration values against *E. coli* after 2 to 3 hours of incubation were $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ for AgNP-PVP and AgNP- β -CD, respectively. The polysulfone (PSf) and cellulose acetate (CA) membranes, containing AgNP-PVP and AgNP- β -CD, respectively, were obtained by the phase inversion method, by varying the amount of silver nanoparticles added to the polymer matrix. All the membranes were characterized by UV-vis, XRD, FTIR, field emission scanning electron microscopy (FESEM), TEM, differential scanning calorimetry (DSC), contact angle and water flux. The incorporation of the silver nanoparticles

into the PSf and CA membranes was carried out using different methods, which influenced both the average diameter of the nanoparticles and the morphology and their distribution in the polymer matrices. The addition of nanoparticles into the membranes did not change the thermal stability of the polymer matrices, however, it did increase the hydrophilic character and consequently water flux. The PSf membranes containing 2% of silver nanoparticles showed 100% inhibition growth of *E. coli*, as well as the CA membrane that showed 100% inhibition growth for *S. aureus* and *E. coli*. The PSf and CA membranes, containing 2% of silver nanoparticles, presented a reduction in the biofilm formation for *E. coli* of $89 \pm 1\%$ and $98 \pm 3\%$, respectively. These membranes can be considered interesting materials in different applications such as in water treatment and the recovery of residual water.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxvii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	xxxv
Capítulo 1	1
1. Introdução	1
1.1. Nanopartículas metálicas	1
1.2. Nanopartículas de prata	2
1.3. Estabilidade de nanopartículas prata	6
1.3.1. Métodos de estabilização de nanopartículas de prata	9
1.3.1.1. Estabilização eletrostática.....	9
1.3.1.2. Estabilidade estérica.....	11
1.3.1.3. Estabilidade eletroestérica.....	13
1.4. Mecanismo de ação biocida das nanopartículas de prata.....	20
1.5. Membranas poliméricas	25
1.6. Nanocompósitos poliméricos com nanopartículas de prata	32
1.6.1. Polissulfonas	33
1.6.2. Acetato de celulose	35
Capítulo 2	39
2. Objetivos	39
2.1. Objetivo Geral	39
2.2. Objetivos Específicos	39
Capítulo 3	41
3. Parte Experimental	41
3.1. Materiais e Métodos	41
3.2. Preparação de AgNP utilizando PVP como estabilizante.....	42
3.3. Preparação de AgNP utilizando β -CD como estabilizante	43

3.4. Preparação das membranas de polissulfona	43
3.4.1. Membrana de PSf pura	43
3.4.2. Método de dispersão.....	44
3.4.3. Métodos <i>in situ</i>	45
3.4.3.1. Preparação pelo método <i>in situ</i> 1	45
3.4.3.2. Preparação pelo método <i>in situ</i> 2	45
3.5. Preparação das membranas de acetato de celulose (CA)	46
3.5.1. Membrana pura.....	46
3.5.2. Método de dispersão.....	46
3.5.3. Método <i>in situ</i>	47
3.6. Nomenclatura das membranas	48
3.7. Atividade antimicrobiana de AgNP-PVP e AgNP- β -CD.....	48
3.8. Curva tempo-morte para AgNP-PVP e AgNP- β -CD contra <i>E. coli</i>	49
3.9. Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas de PSf e CA.....	50
3.10. Estudo da formação do biofouling nas membranas de PSf e CA.....	51
3.11. Técnicas de caracterização.....	52
3.11.1. Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis).....	52
3.11.2. Difração de Raios X (XRD)	52
3.11.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)	53
3.11.4. Espectroscopia Raman	53
3.11.5. Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (CHN).....	53
3.11.6. Análise Termogravimétrica (TGA).....	54
3.11.7. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	54
3.11.8. Ultrassom de ponteira.....	54
3.11.9. Ângulo de Contato	54
3.11.10. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM)	55
3.11.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	55
3.11.12. Imagem espectroscópica de elétrons associada à microscopia eletrônica de transmissão (ESI-TEM)	56
3.11.13. Microscopia de Força Atômica (AFM)	57
3.11.14. Potencial zeta (ζ).....	57
3.11.15. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	57
3.11.16. Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS).....	58

3.11.17. Testes de fluxo de água das membranas de PSf e CA.....	59
3.11.17.1. Procedimento experimental	61
3.11.17.2. Determinação do fluxo permeado	62
3.11.18. Determinação de prata lixiviada durante o ensaio microbiológico...	62
3.11.19. Determinação de prata lixiviada durante o processo de filtração	62
Capítulo 4	63
Resultados e Discussão	63
4.1. Caracterização de nanopartículas de prata estabilizadas com PVP	63
4.2. Caracterização de nanopartículas de prata estabilizadas com β -CD	78
4.3. Caracterização das membranas porosas de PSf com AgNP-PVP	89
4.4. Caracterização da membrana porosas de CA com AgNP- β -CD	105
4.5. Avaliação das propriedades antimicrobianas dos nanomateriais	117
Capítulo 5	131
Conclusões	131
Capítulo 6	133
Referências Bibliográficas	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais processos comerciais de separação por membranas, que utilizam gradiente de pressão como força motriz [65].	26
Tabela 2. Características dos reagentes e polímeros utilizados neste trabalho. ..	41
Tabela 3. Razões mássicas e molares entre PVP, glicose, NaOH e AgNO ₃ utilizadas nas preparações de AgNP-PVP a partir de soluções 0,01 mol L ⁻¹ de AgNO ₃	43
Tabela 4. Abreviações para as membranas.....	48
Tabela 5. Concentrações de AgNP-PVP e AgNP-β-CD usadas no ensaio de curva de tempo-morte contra <i>E. coli</i>	50
Tabela 6. Condições operacionais das medidas de ICP-MS.	58
Tabela 7. Valores de diâmetro médio, índice de polidispersidade (PDI) e potencial ζ das AgNP-PVP.	72
Tabela 8. Valores de ângulo de contato das membranas de PSf.	103
Tabela 9. Valores de fluxo de água através das membranas de PSf.	104
Tabela 10. Valores de ângulo de contato das membranas de CA.	116
Tabela 11. Valores de fluxo de água para MCA e membranas de CA.....	117
Tabela 12. Resultados do crescimento <i>E. coli</i> (ATCC 25922) em membranas de PSf durante 12 horas. A concentração microbiana é dada em log UFC mL ⁻¹ com desvio padrão de n = 3.....	123
Tabela 13. Resultados do crescimento <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 14207) em membranas de PSf durante 12 horas. A concentração microbiana é dada em log UFC mL ⁻¹ com desvio padrão de n = 3.....	124

Tabela 14. Resultados do crescimento <i>E. coli</i> (ATCC 25922) em membranas de CA durante 12 horas. A concentração microbiana é dada em log UFC mL ⁻¹ com desvio padrão de n = 3.....	127
Tabela 15. Resultados do crescimento <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) em membranas de CA durante 12 horas. A concentração microbiana é dada em log UFC mL ⁻¹ com desvio padrão de n = 3.....	127
Tabela 16. Determinação por ICP-MS da quantidade de prata lixiviada durante o ensaio microbiológico das membranas de MCA e PSf contendo AgNP.....	129
Tabela 17. Quantidade lixiviada de prata após permeação de 1L de água deionizada através das membranas de CA e PSf contendo AgNP, determinada por ICP-MS.....	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Desenho esquemático da interação da radiação eletromagnética com uma nanoesfera metálica. (b) Oscilações de elétrons transversais e longitudinais, em um nanobastão. Adaptado da referência [12].....	3
Figura 2. Micrografias eletrônicas de transmissão de nanopartículas: (a) AuNP na forma esferas, (b) AuNP na forma de bastões e (c) AgNP na forma de nanoprismas. Fotografias das dispersões coloidais: (d) AuNP esféricas (e) AuNP na forma de bastões e (f) AgNP na forma de nanoprismas em concentrações crescentes [12].	3
Figura 3. Modelo de La Mer para a formação de um sistema coloidal monodisperso a partir das etapas de nucleação e crescimento. Adaptado da referência [18].	5
Figura 4. Energia potencial de interação partícula-partícula em função da distância de separação entre duas partículas coloidais. Adaptado da referência [23].	8
Figura 5. Mecanismos de estabilização das AgNP. Adaptado da referência [23]...	9
Figura 6. Representação esquemática da concentração de contra-íons ao redor de duas esferas carregadas eletricamente. Adaptado da referência [22].	10
Figura 7. Esquema da dupla camada em uma superfície de carga positiva [24]..	11
Figura 8. Mecanismo de estabilização estérica: (a) efeito osmótico e (b) efeito entrópico. Adaptado da referência [23].	12
Figura 9. Energia potencial de interação partícula-partícula em função da distância de separação entre duas partículas coloidais, por estabilização eletroestérica [24].	13
Figura 10. Representação da estrutura química da polivinilpirrolidona.	13

Figura 11. Complexação dos íons prata com polivinilpirrolidona [27].	14
Figura 12. Estruturas químicas e dimensões das α , β e γ -ciclodextrinas (CD). Adaptado das referências [34,35].	15
Figura 13. Estrutura química e representação da ciclodextrina em forma de cone oco, truncado, com os grupos hidroxila localizados nas aberturas do cone [35].	16
Figura 14. Esquema ilustrativo da interação entre AgNP e uma célula bacteriana [55].	21
Figura 15. Esquema da seção transversal de diferentes tipos de membranas [65].	27
Figura 16. Esquema de transferência de massa durante a formação de membranas poliméricas. J_s é o fluxo de solvente e J_{NS} é o fluxo de não solvente.	28
Figura 17. Representação esquemática dos possíveis caminhos cinéticos durante o processo de inversão de fases e a representação das morfologias resultantes [71].	29
Figura 18. Estrutura molecular da polissulfona.	33
Figura 19. Estrutura química do acetato de celulose.	36
Figura 20. Sequência de etapas envolvidas na formação de membranas pelo método de inversão de fases.	47
Figura 21. Esquema do processo de diluição seriada e de plaqueamento.	51
Figura 22. Ilustração do ângulo de contato formado entre gota do líquido sobre superfície sólida.	55

Figura 23. Representação esquemática do corte de amostras em ultramicrotomo.	56
Figura 24. Esquema do sistema de permeação utilizado.	60
Figura 25. Fotografia do sistema de permeação.	61
Figura 26. Espectros de UV-vis: (a) solução de AgNO_3 e AgNP-PVP obtidas a partir de soluções de AgNO_3 : (b) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (c) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. (e) Foto da dispersão coloidal de AgNP-PVP.....	64
Figura 27. Difrátogramas de raios X das AgNP obtidas a partir de diferentes concentrações de AgNO_3 : (a) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (b) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (c) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	66
Figura 28. Espectros de FTIR do PVP puro (a) e das nanopartículas de prata obtidas a partir de diferentes concentrações de AgNO_3 : (b) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (c) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	67
Figura 29. Esquema da reação de formação das AgNP-PVP.	67
Figura 30. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de prata estabilizadas com PVP e seus respectivos histogramas, obtidos a partir de diferentes concentrações de AgNO_3 : (a) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (b) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (c) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. O software utilizado para contagem das nanopartículas de prata foi NIS-Elements Ar.....	69
Figura 31. Espalhamento dinâmico de luz das AgNP-PVP obtidas a partir de diferentes concentrações de AgNO_3 : (a) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (b) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (c) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	71
Figura 32. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de AgNP-PVP obtidas a partir de AgNO_3 de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e diferentes razões mássicas PVP/ AgNO_3 : (a,b) 1,5; (d,e) 3,0, (g,h) 6,0. (c,f,i) Histogramas correspondentes...	73

Figura 33. (a) Imagem de campo claro de AgNP-PVP e (b) imagem filtrada em energia de 25 eV.	75
Figura 34. (a) e (b) Espectros de perda de energia de elétrons na região do carbono e oxigênio, respectivamente, (c) Imagem de campo claro de AgNP-PVP, (d) mapa elementar de carbono e (e) mapa elementar de oxigênio.	77
Figura 35. Curvas de perdas de massa e derivada da perda de massa (DTA) para: (a) PVP puro e (b) AgNP-PVP.	78
Figura 36. Espectros de UV-vis: (a) solução de β -CD; (b) solução de AgNO_3 e (c) AgNP- β -CD. Foto da dispersão coloidal de AgNP- β -CD (d).	79
Figura 37. Difratogramas de raios X de: (a) β -CD e (b) AgNP- β -CD.	80
Figura 38. Espetros de infravermelho: (a) β -CD e (b) AgNP- β -CD.	82
Figura 39. Espectros Raman: (a) solução aquosa de β -CD ($10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e (b) suspensão de AgNP- β -CD (concentração de β -CD igual a $3,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).	83
Figura 40. Curvas de perdas de massa (TG) e derivada da perda de massa (DTA) do: (a) β -CD e (b) AgNP- β -CD.	84
Figura 41. (a) Imagem de TEM e (b) histograma da distribuição de tamanho de AgNP- β -CD.	85
Figura 42. Diâmetro das AgNP- β -CD após diferentes dias de estocagem, obtidos por DLS.	86
Figura 43. Espectros de perda de energia de elétrons do: (a) carbono e (b) oxigênio. (c) Imagem de campo claro de uma nanopartícula de AgNP- β -CD, (d) mapa elementar de carbono e (e) mapa elementar de oxigênio.	87

Figura 44. Imagens de ESI-TEM de uma nanopartícula de AgNP- β -CD: (a) Imagem de campo claro e (b) imagem obtida a partir da tomografia da mesma partícula.....	88
Figura 45. Esquema ilustrativo da formação das AgNP- β -CD.....	88
Figura 46. Imagens das membranas de polissulfona: (a) MPSf, (b) MDPSf2, (c) MI1PSf2 e (d) MI2PSf2.	89
Figura 47. Difratogramas de raios X: (a) AgNP-PVP, (b) PVP, (c) MPSf, (d) MDPSf2, (e) MI1PSf2 e (f) MI2PSf2.....	91
Figura 48. Espectros de UV-vis-DRS da membrana de PSf pura e das membranas com nanopartículas de prata.	92
Figura 49. Imagens de FESEM: (a, b, c) MPSf e (d, e, f) MDPSf2. (a, d) Fratura, (b, e) superfície em contato com o substrato (c, f) superfície em contato com o ar.	93
Figura 50. Imagens de FESEM: (a, b, c) MI1PSf2 e (d, e, f) MI2PSf2. (a, d) Fratura, (b, e) superfície em contato com o substrato e (c, f) superfície em contato com o ar.....	95
Figura 51. Imagens de TEM: (a) MPSf, (b) MDPSf2, (c,d) MI1PSf2 e (e) MI2PSf2.	98
Figura 52. Esquema ilustrativo das secções transversais e da distribuição de nanopartículas de prata (partículas vermelhas) nas membranas preparadas.....	99
Figura 53. Curvas de DSC obtidas durante o segundo aquecimento para as membranas porosas de PSf. Os valores de T _g estão indicados nas curvas correspondentes.....	100
Figura 54. Curvas de perda de massa (a) e da derivada da perda de massa (b) das membranas.....	102

Figura 55. (a) Membranas porosas de CA, (b) MDCA2 e (c) MICA2.....	105
Figura 56. Difrátogramas de raios X: (a) AgNP- β -CD, (b) MCA, (c) MDCA2, (d) MICA2.	106
Figura 57. Espectros de FTIR: (a) MCA, (b) MDCA2 e (c) MICA2	107
Figura 58. Imagens de FESEM: (a, b, c) MAC, (d, e, f) MDCA2, (g, h, i) MICA2. (a, d, g) Secções transversais, (b, e, h) superfícies em contato com o substrato e (c, f, i) superfícies em contato com o ar.	109
Figura 59. (a) Curvas termogravimétricas e (b) derivada da massa das membranas de MCA, MDCA2 e MICA2	111
Figura 60. Curvas de DSC obtidas durante o segundo aquecimento para as membranas MCA, MDCA2 e MICA2.	112
Figura 61. Imagem de TEM: (a) MICA2 e (b) histograma da distribuição de tamanho de AgNP- β -CD.	114
Figura 62. Imagens de AFM: (a, b) MCA, (c, d) MDCA2 e (e, f) MICA2. Imagens topográficas das: (a, c, e) superfícies em contato com o ar e (b, d, f) imagens 3D correspondentes.....	115
Figura 63. (a) e (b) Porcentagem de inibição da <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> após 3 horas de contato com dispersões a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP-PVP e AgNP- β -CD de. (c) Fotografias das placas de BHI Agar após experimento.	119
Figura 64. Curvas de tempo morte de <i>E. coli</i> inoculada em meio ágar BHI com 10^6 - 10^8 UFC mL^{-1} de bactérias, na presença de diferentes concentrações de AgNP-PVP.....	120
Figura 65. Curvas de tempo morte de <i>E. coli</i> inoculada em meio ágar BHI com 10^6 UFC mL^{-1} de bactérias, na presença de diferentes concentrações de AgNP- β -CD.	121

Figura 66. Inibição da formação de biofilme contra *E. coli* para as membranas de MI1PSf com diferentes concentrações de nanopartículas de prata, formadas pelo método *in situ*. O gráfico resume a inibição do crescimento do biofilme após 48 h de incubação a 37 °C, em meio líquido de BHI. 125

Figura 67. Inibição da formação de biofilme contra *E. coli* para as membranas de MDCA com diferentes concentrações de nanopartículas de prata, formadas pelo método *in situ*. O gráfico resume a inibição do crescimento do biofilme após 48 h de incubação, a 37 °C, em meio líquido de BHI. 128

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AgNP - Nanopartículas de Prata

AgNP-PVP - Nanopartículas de Prata estabilizadas com Polivinilpirrolidona

AgNP- β -CD - Nanopartículas de Prata estabilizadas com β -Ciclodextrina

AFM - Microscopia de Força Atômica

AC - Acetona

CA - Acetato de Celulose

CHN - Análise Elementar: Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio

β -CD - β -Ciclodextrina

DLS - Espalhamento Dinâmico de Luz

DRS - Espectroscopia de Refletância Difusa

DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura

DCE - Duplas Camadas Elétricas

DO - Densidade Óptica

ESI - Imagem de Espectroscopia de Perda de Energia de Elétrons

EELS - Espectroscopia de Perda de Energia de Elétrons

ESI-TEM - Imagem Espectroscópica de Elétrons associada à Microscopia Eletrônica de Transmissão

FTIR - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

FWHM - Largura à Meia Altura

FESEM - Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo

ICPMS - Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado

IR - Espectroscopia Raman

MCA - Membrana de Acetato de Celulose

MPSf - Membrana de Polissulfona

MDCA - Membrana de Acetato de Celulose com incorporação da AgNP por dispersão.

MICA - Membrana de Acetato de Celulose com incorporação da AgNP por formação *in situ*.

MIC - Concentração Inibitória Mínima
NMP - N-metilpirrolidona
NPsM - Nanopartículas Metálicas
PVP - Polivinilpirrolidona
PSM - Processo de Separação por Membrana
 ζ - Potencial zeta
ROS - Espécies de Oxigênio Oxidativas
SEM - Microscopia Eletrônica de Varredura
 T_g - Temperatura de Transição Vítrea
TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGA - Análise Termogravimétrica
UV-vis - Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível
UFC - Unidade Formadora de Colônias
XRD - Difração de Raios X

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Nanopartículas metálicas

Nanopartículas metálicas (NPsM) são agregados ou aglomerados de partículas que apresentam 50% de tamanho na faixa de 1 a 100 nm. As nanopartículas possuem propriedades físicas e químicas dependentes do tamanho e da forma. Em dispositivos farmacêuticos ou médicos, a definição não deve excluir o termo “nano” para estruturas com diâmetro médio entre 100 e 1000 nm [1,2].

Normalmente, as NPsM são obtidas a partir de dispersões coloidais e, de acordo com o método aplicado durante a síntese, podem apresentar morfologias diversificadas, tais como: nanocubos, nanoprismas, nanoesferas, nanotriângulos e nanofios [3–5].

O estudo de NPsM não é recente. Em 1857, Michael Faraday relatou a primeira síntese, assim como as propriedades físicas, de soluções coloidais de ouro [6]. Esse trabalho pioneiro incentivou a posterior publicação de milhares de artigos referentes à síntese modificação e propriedades de NPsM em diversos solventes e substratos, possibilitando um entendimento das características físico-químicas destes sistemas, como também o domínio dos métodos de obtenção de nanopartículas metálicas [7].

Um marco posterior foi a publicação, por Turkevitch e colaboradores [8] em 1951, de um novo método sintético envolvendo a redução do AuCl_4^- por citrato em meio aquoso. Neste caso, o citrato atua como estabilizante, evitando a ocorrência de processos de agregação e as partículas obtidas apresentam aproximadamente 20 nm de diâmetro.

Apesar da nanotecnologia estar presente no cotidiano há milhares de anos, foi no ano de 1959 que o físico americano Richard Feynman, em sua conferência na Reunião da Sociedade Americana de Física, sugeriu a construção e a

manipulação de materiais em escala nanométrica. Essa conferência, intitulada *There's plenty of room at the bottom*, representou uma nova concepção em nanociência e nanotecnologia.

Em 1994, o método desenvolvido por Brust e colaboradores [9] somou-se ao elenco dos trabalhos que alavancaram o desenvolvimento dos estudos experimentais, por permitir a obtenção de NPsM com tamanho reduzido e estreita distribuição de tamanhos. Tal síntese foi inspirada na desenvolvida por Faraday, utilizando NaBH_4 como agente redutor e alcanotóis de cadeia longa como agentes passivantes em um meio bifásico de tolueno e água.

1.2. Nanopartículas de prata

Nas últimas décadas, um estudo intenso tem sido dedicado às nanopartículas de prata (AgNP), motivado principalmente por suas interessantes propriedades ópticas e antimicrobianas. As propriedades óticas de nanopartículas de prata, como também de metais como cobre e ouro, são devido à presença de elétrons livres na banda de condução. A ressonância de plasmon de superfície tem como característica um comprimento de onda de ressonância que depende do tamanho e da forma da partícula, bem como da constante dielétrica do meio [10,11].

A Figura 1 representa esquematicamente o fenômeno do plasmon à superfície das nanopartículas. Quando a radiação eletromagnética incide na nanoesfera metálica, é induzida a formação de dipolos que por sua vez promovem a polarização da esfera nanométrica (Figura 1a), ou seja, no momento em que o campo elétrico atua na nanoesfera, a nuvem de elétrons sofre um deslocamento em relação aos núcleos, e as cargas positivas agem simultaneamente como uma força restauradora de origem Coulombiana, fazendo com que os elétrons oscilem coerentemente. Para partículas na forma de bastões, o comprimento de onda de ressonância depende da orientação do campo elétrico. Neste caso ocorrem oscilações nas direções transversal e longitudinal (Figura 1b), gerando duas bandas de absorção no espectro [12].

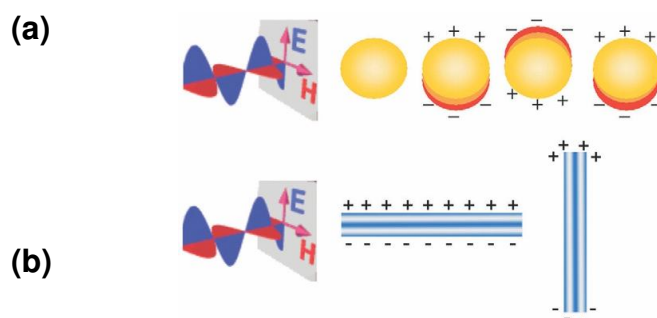


Figura 1. (a) Desenho esquemático da interação da radiação eletromagnética com uma nanoesfera metálica. (b) Oscilações de elétrons transversais e longitudinais, em um nanobastão. Adaptado da referência [12].

A dependência da oscilação da banda plasmon em relação à forma e ao tamanho das NPsM, para nanopartículas de prata na forma de nanobastão, esfera, cubo e triangular, apresentam bandas plasmônicas em 370-380 nm, 408-430 nm, 450-600 nm e 670-740 nm, respectivamente [11,13,14]. É ilustrado na Figura 2 nanopartículas de prata e ouro (AgNP e AuNP) de tamanhos e formas diferentes, juntamente com suas respectivas suspensões em diferentes concentrações.

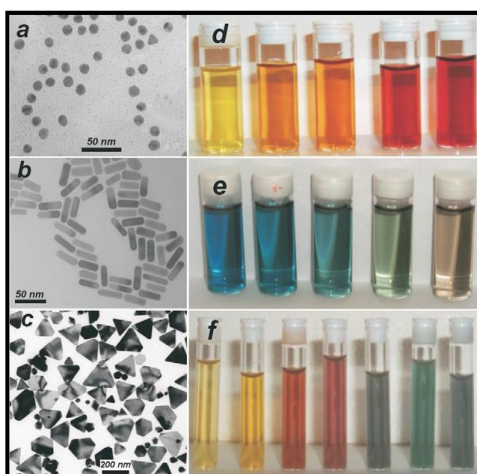


Figura 2. Micrografias eletrônicas de transmissão de nanopartículas: (a) AuNP na forma esferas, (b) AuNP na forma de bastões e (c) AgNP na forma de nanoprismas. Fotografias das dispersões coloidais: (d) AuNP esféricas (e) AuNP na forma de bastões e (f) AgNP na forma de nanoprismas em concentrações crescentes [12].

Diversos métodos para sintetizar AgNP são relatados na literatura recente. Apesar de cada método possuir características específicas, o método químico, de uma maneira geral, envolve a redução de um sal metálico apropriado na presença de estabilizantes, que podem ser polímeros ou surfactantes [15]. Esses estabilizantes, também chamados de passivantes, tem a finalidade de estabilizar cineticamente essas partículas metálicas, formando uma camada que impede seu crescimento e coalescência por um período de tempo determinado, podendo ainda funcionalizá-las. No método biológico, são utilizados microrganismos capazes de reduzir os íons Ag^+ [16]. Já o método físico consiste em reduzir os íons Ag^+ , usando radiação eletromagnética [17]. Neste último, a solução aquosa é exposta à radiação (γ ou UV), gerando elétrons hidratados, radicais primários e moléculas de hidrogênio e peróxido de hidrogênio.

O mecanismo de formação e crescimento de nanopartículas de prata coloidais varia de acordo com o sistema específico. A formação de AgNP pode ser explicada de forma geral pelo mecanismo de La Mer (Figura 3) [18]. Nesse mecanismo, quando a concentração de precursor em solução (átomos, íons ou complexos moleculares que irão formar as nanopartículas) ultrapassa certo limite, conhecido como sendo a concentração crítica de nucleação, flutuações estatísticas levam à formação de pequenos aglomerados de átomos, denominados de núcleos ou sementes. Uma vez que ocorre a nucleação, a concentração do precursor diminui, podendo ficar abaixo da concentração crítica de nucleação. A partir deste ponto, ocorre somente o crescimento dos núcleos pré-formados pela incorporação do precursor, denominando-se essa fase de etapa de crescimento. Por outro lado, quando a concentração do precursor torna-se menor que o valor crítico de crescimento, pode ocorrer também o processo de envelhecimento de Ostwald, quando a concentração de pequenas partículas coloidais é alta o suficiente para se dissolverem e reprecipitarem, e assim formarem partículas maiores, ou mesmo para crescerem por incorporação de outros núcleos (aglomeração e coalescência) [18].

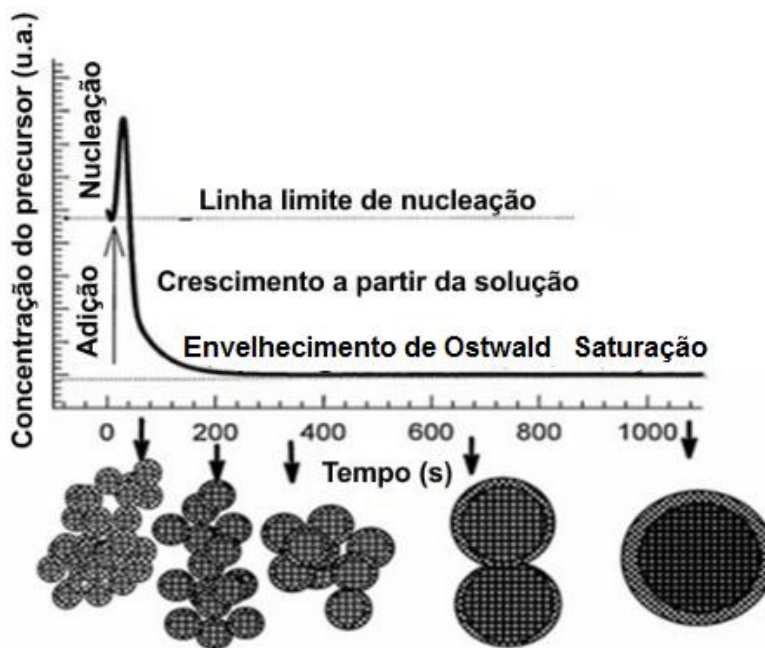


Figura 3. Modelo de La Mer para a formação de um sistema coloidal monodisperso a partir das etapas de nucleação e crescimento. Adaptado da referência [18].

Durante a nucleação, ocorre a formação de uma fase sólida e, conseqüentemente, a criação de uma nova superfície, o que gera uma mudança na energia livre global do sistema (ΔG). Considerando uma partícula esférica, equação (1):

$$\Delta G = -\frac{4}{V}\pi r^3 k_B T \ln(S) + 4\pi r^2 \gamma \quad (1)$$

onde V é o volume molecular, r é o raio do núcleo, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, S é a razão de saturação e γ é a energia livre de superfície por unidade de área de superfície.

Núcleos maiores do que o tamanho crítico irão diminuir sua energia livre com seu crescimento e formar um núcleo estável. O tamanho crítico do núcleo r^* pode ser obtido na condição: $d\Delta G/dr = 0$,

Para um dado valor de S , todas as partículas com $r > r^*$ irão crescer e as com $r < r^*$ dissolver. De acordo com a equação 2, observa-se que quanto maior o valor da razão de saturação, menor é o tamanho crítico do núcleo [19].

$$r^* = \frac{2V\gamma}{3k_B T \ln(S)} \quad (2)$$

Após os núcleos serem formados, estes crescem via adição molecular. Quando a concentração das espécies se torna menor que um valor crítico, a nucleação cessa e as partículas continuam a crescer até que se atinja a concentração de equilíbrio das espécies precipitadas. A uniformidade de tamanho é estabelecida se os núcleos forem gerados em um período curto de nucleação seguido pelo processo de crescimento.

1.3. Estabilidade de nanopartículas prata

A teoria mais utilizada na interpretação da estabilidade coloidal é a teoria DVLO, desenvolvida na década de 40 por Derjaguin, Verwey, Landau e Overbeek.

Segundo descrito por Ostwald em *World of Neglected Dimensions*, colóides são formados por uma fase dispersa (ou fase descontínua) distribuída uniformemente em um meio de dispersão (ou fase contínua), em que as partículas dispersas têm um diâmetro compreendido entre 1 nm e 1 μ m, e podem ser constituídas de átomos, íons ou moléculas [20].

Devido à enorme razão superfície/volume, partículas pequenas possuem grande energia livre interfacial, o que as torna instáveis do ponto de vista termodinâmico, favorecendo sua aglomeração em razão da energia associada à alta área superficial [20]. A estabilidade coloidal pode ser vista em termos da variação de energia livre em função da distância de separação das partículas em um sistema. A teoria estabelece que a estabilidade do sistema coloidal é determinada pela soma das forças atrativas de van der Waals e das forças repulsivas das duplas camadas elétricas (DCE) existentes entre as partículas. A teoria DLVO pode ser descrita pela equação (3):

$$V_T = V_A + V_R \quad (3)$$

V_T é a energia potencial total; V_A e V_R representam as contribuições associadas, respectivamente, às forças atrativas e repulsivas entre as partículas. Os valores de V_A e V_R são dados pelas seguintes equações:

$$V_A = -\frac{a A_H}{12D} \quad (4)$$

$$V_R = 2\pi\epsilon_0\epsilon a\zeta^2 \exp(-kD) \quad (5)$$

No caso da equação (4), A_H é a constante de Hamaker, a é o raio da partícula e D é a distância entre partículas. Na equação (5), ϵ_0 é a permissividade no vácuo, ϵ é a constante dielétrica do meio, $1/\kappa$ é espessura da dupla camada elétrica e depende da força iônica do meio e ζ é o potencial zeta.

Para duas partículas de mesma natureza, as forças de van der Waals em água ou outro solvente, são atrativas. Essa energia de atração depende da natureza da partícula e do solvente, como também da distância entre as partículas, mas independe da carga das partículas, do pH do meio e da concentração de eletrólitos na solução. Porém, a energia repulsiva, resultante da interação entre DCE com cargas superficiais idênticas, é dependente da distância entre as partículas, da magnitude de carga ou potencial de superfície, do pH e do solvente. As interações elétricas são também sensíveis à natureza e à concentração de eletrólito, porém, para uma dada carga superficial, independem da natureza da partícula [21].

A teoria DLVO propõe que uma barreira de energia, resultante da combinação das forças repulsivas e atrativas, previne duas partículas de se agregarem, como esquematizado na Figura 4. Se as partículas colidem com energia suficiente para superar essa barreira, a força atrativa prevalecerá a ponto de ocorrer uma forte adesão, que pode ser irreversível. Porém, se as partículas

possuírem uma repulsão suficientemente alta, a dispersão resistirá à floculação e o sistema coloidal será estável. Em uma condição intermediária, na qual a atração e a repulsão apresentem magnitudes dependentes da distância, ora predominam interações atrativas ora predominam interações repulsivas. Neste caso, a curva de potencial apresenta um pequeno mínimo em distâncias maiores, um máximo em distâncias médias e um mínimo em pequenas distâncias [22]. Esta teoria não é considerada para estabilização por impedimento estérico.

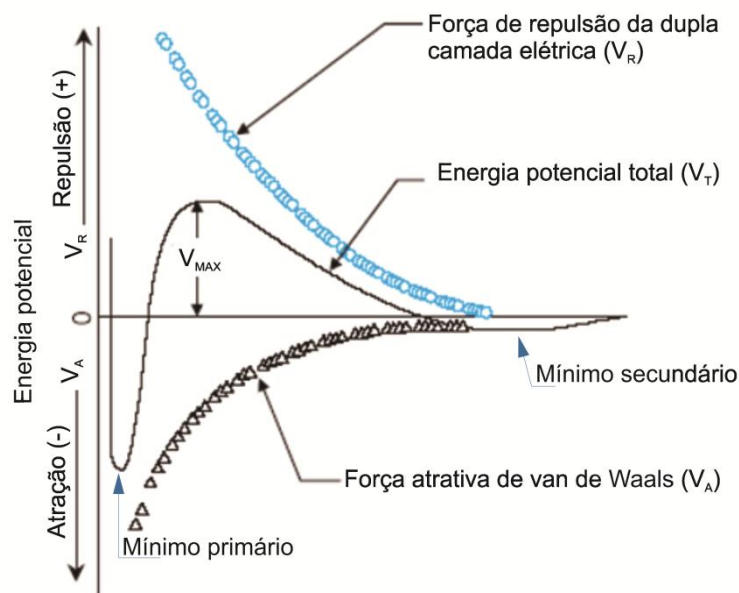


Figura 4. Energia potencial de interação partícula-partícula em função da distância de separação entre duas partículas coloidais. Adaptado da referência [23].

Estes mínimos são conhecidos como mínimo secundário e mínimo primário. As diferenças entre coagulação e floculação são devido a esses mínimos. Quando a dispersão encontra-se na região do mínimo secundário, o processo de agregação é chamado de floculação e pode ser reversível. Quando a dispersão encontra-se na região do mínimo primário, o processo de agregação é chamado de coagulação e é irreversível. Para alcançar o mínimo primário, responsável pela coagulação, o sistema precisa transpor a barreira energética representada pelo máximo na curva potencial. Este sistema é considerado metaestável, havendo um grau de estabilidade cinética [22].

1.3.1. Métodos de estabilização de nanopartículas de prata

Uma vez que entre partículas coloidais semelhantes estão presentes forças atrativas, é necessário promover forças repulsivas entre as partículas para conferir estabilidade coloidal. A estabilidade pode ser obtida por meio de três métodos: i) formação de DCE (estabilização eletrostática), ii) formação de uma camada de moléculas (polímeros ou surfactantes) adsorvidas ou ligadas quimicamente (estabilização estérica) à superfície das partículas [22] e iii) formação de uma camada composta de cadeias longas e cargas (estabilização eletroestérica). Estes são apresentados na Figura 5.



Figura 5. Mecanismos de estabilização das AgNP. Adaptado da referência [23].

1.3.1.1. Estabilização eletrostática

Uma forma efetiva de contrabalancear as atrações de van der Waals entre partículas coloidais em líquidos polares é promover a repulsão Coulombiana entre as mesmas. Em uma dispersão coloidal, íons podem ser adsorvidos à superfície das partículas formando uma camada carregada. Esse conceito é ilustrado na Figura 6 para a situação na qual a partícula possui uma distribuição equilibrada de cargas, as quais são balanceadas por cargas de sinal oposto, os contra-íons. Neste contexto, a nuvem de carga é chamada de DCE. Na estabilização eletrostática, a repulsão mútua dessa dupla camada é a que promove a estabilidade coloidal [21].

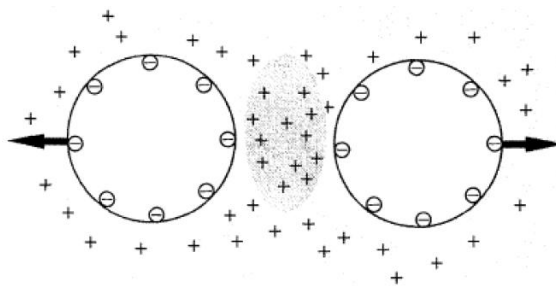


Figura 6. Representação esquemática da concentração de contra-íons ao redor de duas esferas carregadas eletricamente. Adaptado da referência [22].

Quando duas partículas carregadas se aproximam, as suas duplas camadas elétricas interagem. Como essas duplas camadas possuem os mesmos sinais, a interação entre elas será repulsiva, levando a um aumento no potencial elétrico entre as partículas. Com a aproximação entre elas, essas nuvens são comprimidas e acabam exercendo uma força para afastar as partículas. A magnitude desta força de repulsão depende da constante de força da nuvem de cargas. Quanto maior a polarizabilidade, maior será a resistência à aproximação mútua e mais difícil será a adesão que leva à agregação e floculação [21].

A dupla camada elétrica descreve a distribuição dos íons e, portanto, a intensidade dos potenciais elétricos gerados pela superfície carregada. Essa é constituída por duas regiões: uma camada externa difusa e uma camada interna compacta, conhecida como camada de Stern. O limite estabelecido pela camada Stern e camada difusa formam a dupla camada elétrica, como representado esquematicamente na Figura 7 [24].

Dentro da camada difusa há um limite onde os íons e a partícula formam uma entidade estável. Quando uma partícula se movimenta, uma fração de íons também se movimenta com a partícula, este limite é conhecido como superfície hidrodinâmica ou plano de cisalhamento. O potencial existente neste plano de cisalhamento é denominado potencial zeta, o qual é função da carga da superfície da partícula e da natureza do meio em que a partícula está dispersa [24].

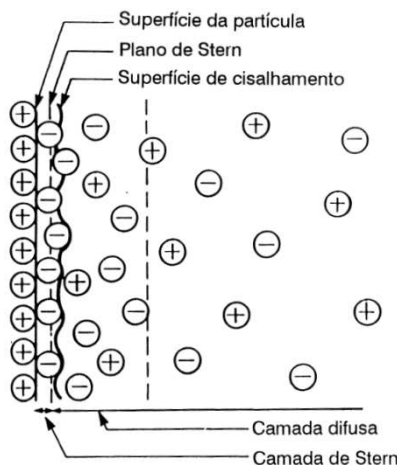


Figura 7. Esquema da dupla camada em uma superfície de carga positiva [24].

Há limitações no uso da estabilização eletrostática, que são: i) necessidade de uso de solventes polares; ii) as partículas estabilizadas eletrostaticamente são sensíveis à adição de sal e iii) perda de estabilidade em dispersões submetidas a ciclos de congelamento-descongelamento. A estabilidade é dependente da concentração da dispersão coloidal, pH do meio e natureza dos íons envolvidos. De fato, as suspensões estabilizadas eletrostaticamente são instáveis do ponto de vista termodinâmico, havendo apenas uma barreira cinética que previne a agregação [21].

1.3.1.2. Estabilidade estérica

Quando duas partículas coloidais, contendo uma camada de cadeias de polímero ou surfactante adsorvidas em sua superfície, se aproximam, as camadas começam a se interpenetrar. Esta interpenetração das cadeias pode gerar dois efeitos: um efeito osmótico, devido ao aumento na concentração local de espécies adsorvidas entre as partículas, e um efeito entrópico ou de restrição de volume livre, uma vez que as espécies dentro da zona de interação perdem graus de liberdade devido à interpenetração. A redução na entropia é desfavorável, dificultando assim a aproximação das partículas entre si, enquanto o efeito osmótico pode ser acompanhado por uma diminuição no efeito entálpico, causado pela dessolvatação das moléculas adsorvidas. Para recuperar a entropia, as

partículas devem exercer uma força repulsiva, promovendo o afastamento entre elas e permitindo assim maior liberdade de movimento, enquanto o solvente desloca-se no sentido de “re-solvatar” as partículas. Isto resulta em uma barreira de energia que retarda a aproximação das partículas e é responsável pelo mecanismo de estabilização [23]. O processo de estabilização estérica está esquematicamente ilustrado na Figura 8.

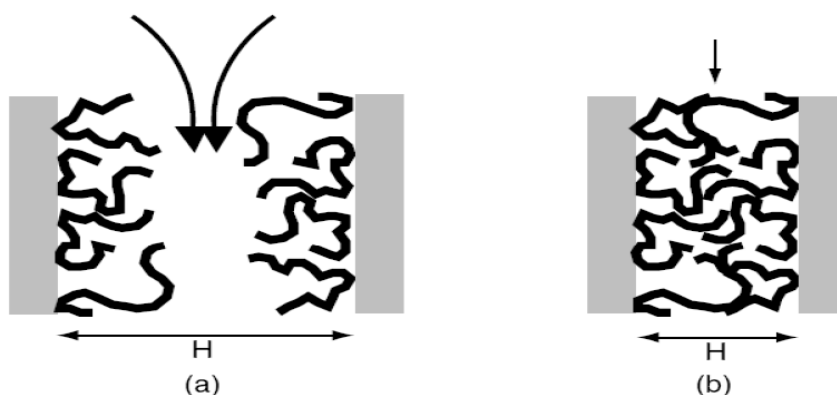


Figura 8. Mecanismo de estabilização estérica: (a) efeito osmótico e (b) efeito entrópico. Adaptado da referência [23].

O solvente desempenha um papel fundamental na estabilização de sistemas coloidais por estabilização estérica. Se a natureza do solvente for alterada de modo que esse passe a ser um melhor solvente para as espécies adsorvidas, o revestimento pode ser desorvido, resultando na floculação por depleção. Se o solvente deixa de ser um “bom solvente” e passa a ser um “mau solvente” para as cadeias adsorvidas, a espessura da camada de proteção será reduzida e as cadeias adsorvidas serão colapsadas sobre a superfície da partícula, resultando na redução da estabilidade [23]. O ideal, portanto, é atingir uma condição intermediária.

A estabilidade estérica tem vantagens sobre a estabilidade eletrostática uma vez que: i) é menos sensível à presença de eletrólitos; ii) promove a estabilização de dispersões em meio aquoso e não-aquoso; iii) promove a estabilização de dispersões contendo baixas ou altas frações volumétricas da fase dispersa e iv) permite que a floculação seja revertida [23].

1.3.1.3. Estabilidade eletroestérica

A combinação dos mecanismos eletrostático e estérico geralmente resulta em uma melhor estabilização. Essa combinação se denomina estabilização eletroestérica. O componente eletrostático pode ser originado de uma carga sobre a superfície da partícula e/ou por cargas associadas ao polímero adsorvido. Na curva de energia potencial, representada na Figura 9, a barreira de energia potencial é alta a longas distâncias e a estabilização estérica (curva V_s) previne o contato entre as partículas a curtas distâncias [25].

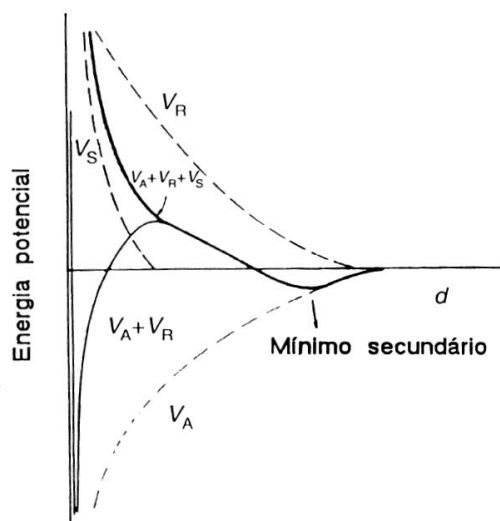


Figura 9. Energia potencial de interação partícula-partícula em função da distância de separação entre duas partículas coloidais, por estabilização eletroestérica [24].

Um material que tem sido bastante estudado como estabilizante de AgNP é o polímero polivinilpirrolidona (PVP), cuja estrutura está apresentada na Figura 10.

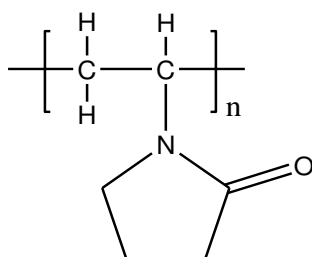


Figura 10. Representação da estrutura química da polivinilpirrolidona.

A vantagem do uso de PVP como estabilizante é justificada pelo fato deste polímero ter grande afinidade pelo metal, possuir dois pontos de coordenação (O e N), ser solúvel em água, alcoóis e suportar altas temperaturas [26].

O efeito de proteção do PVP é atribuído à interação do par de elétrons isolados presentes nos átomos de oxigênio e nitrogênio da unidade repetitiva do PVP, que podem ser transferidos para os dois orbitais híbridos sp do metal, para formar íons complexos (Figura 11). Os dois complexos formados podem induzir a diferentes processos de nucleação, tal como sugerido por Jiang e colaboradores [27].

Zhang e colaboradores [28], utilizando espectroscopia IR, demonstraram a existência da ligação química N:Ag:O em AgNP estabilizadas com PVP, enquanto vários outros grupos [27–29] realizaram análises de XPS para observar alterações nas fotoemissões C1s e N1s. Os resultados obtidos indicaram que ocorre alteração apenas no pico referente a O1s, o que os levou a concluir que o PVP interage com AgNP por meio do átomo de oxigênio.

Curiosamente, as evidências experimentais têm mostrado que o grupo C=O presente no PVP, interage de forma diferente com as diferentes faces cristalográficas da estrutura metálica. Assim, o PVP pode adsorver preferencialmente em certas faces, ou seja, pode agir inibindo ou aumentando o crescimento de uma face específica e, conseqüentemente, causando o crescimento anisotrópico de AgNP [30,31]. No entanto, ainda há muita controvérsia a respeito de que tipo de face as moléculas de PVP adsorvem preferencialmente.

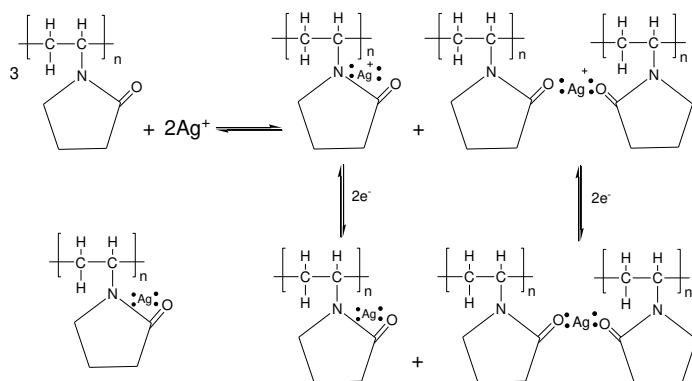


Figura 11. Complexação dos íons prata com polivinilpirrolidona [27].

Apesar de existirem vários trabalhos que utilizam o PVP como estabilizante na preparação de AgNP, ainda é objeto de estudo investigar a associação desse polímero com nanopartículas de prata e o seu efeito no tamanho e estado de agregação das nanopartículas, uma vez que não há relatos na literatura a respeito da caracterização da camada estabilizante em torno da AgNP, quando se altera a proporção de AgNO_3 e PVP.

Outras classes de estabilizantes tem também sido usados na estabilização das AgNP. Estudos têm demonstrado recentemente que algumas moléculas que apresentam grupos hidroxila, tais como poli(álcool vinílico), poli(etilenoglicol), oligossacarídeos e polissacarídeos, podem ser utilizadas também na estabilização das AgNP [32,33]. Uma classe de oligossacarídeos que está sendo estudada é a das ciclodextrinas (CDs). Ciclodextrinas são maltodextrinas naturais e cíclicas produzidas a partir do amido, pela ação de enzimas denominadas como ciclodextrina glicosiltransferase, sendo as mais importantes a α -, β - e γ -CD, compostas de seis, sete e oito monômeros de glicose [34], respectivamente (Figura 12).

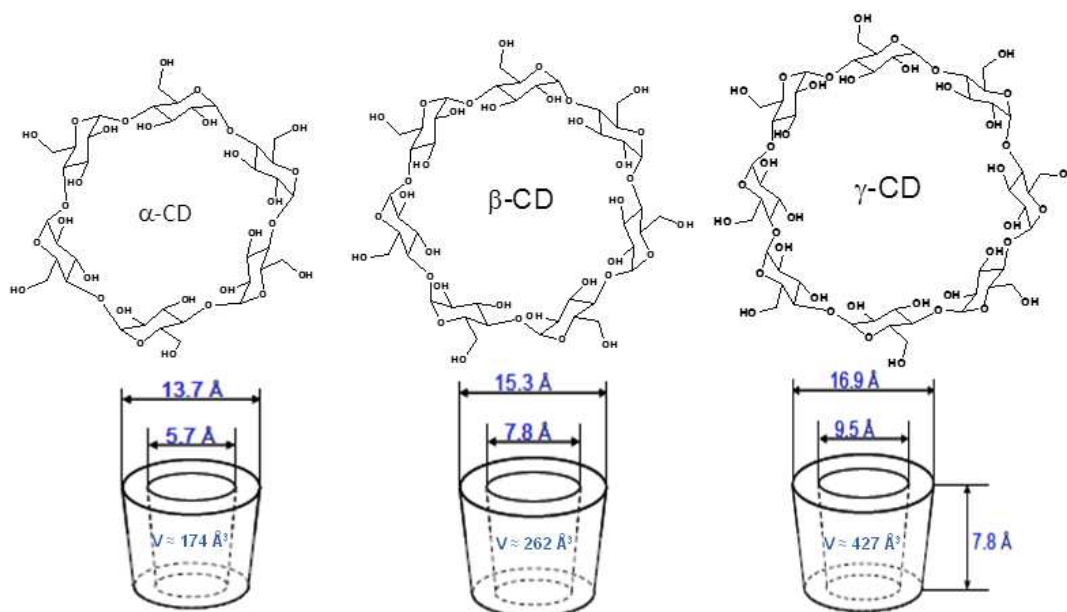


Figura 12. Estruturas químicas e dimensões das α , β e γ -ciclodextrinas (CD). Adaptado das referências [34,35].

As ciclodextrinas são cristalinas, não-higroscópicas e apresentam estrutura relativamente rígida em formato de um cone oco truncado, uma cavidade central hidrofóbica e uma superfície exterior hidrofílica contendo grupos hidroxila. Os grupos hidroxila (OH) secundários estão ligados aos átomos de carbonos C2 e C3, localizados ao redor da abertura maior, enquanto que os grupos OH primários mais reativos se encontram na extremidade mais estreita e ligados ao carbono C6 [34–36], como representado esquematicamente na Figura 13.

A presença de grupos OH nas extremidades da estrutura favorece a solubilidade das ciclodextrinas em água. O interior da cavidade é delineado pelos átomos de hidrogênio (H3 e H5) e pelas ligações de oxigênio glicosídicas. Os pares de elétrons não-ligantes do oxigênio estão voltados para o interior da cavidade, produzindo alta densidade eletrônica e resultando em um ambiente com características de base de Lewis e um caráter extremamente hidrofóbico. Já a disposição dos hidrogênios H1, H2 e H4, bem como dos grupos hidroxila, voltados para o exterior da CD, torna a superfície externa hidrofílica. As ligações de hidrogênio intramoleculares estabelecidas entre os grupos OH ligados aos carbonos C2 e C3 proporcionam estabilidade ao anel macrocíclico, e conferem uma estrutura rígida à CD, formando um cinturão secundário de ligações de hidrogênio e gerando uma estrutura rígida. Na β -CD todas as ligações de hidrogênio estão estabilizadas na estrutura, resultando na rigidez do anel e na redução da solubilidade da mesma em água [35,36].

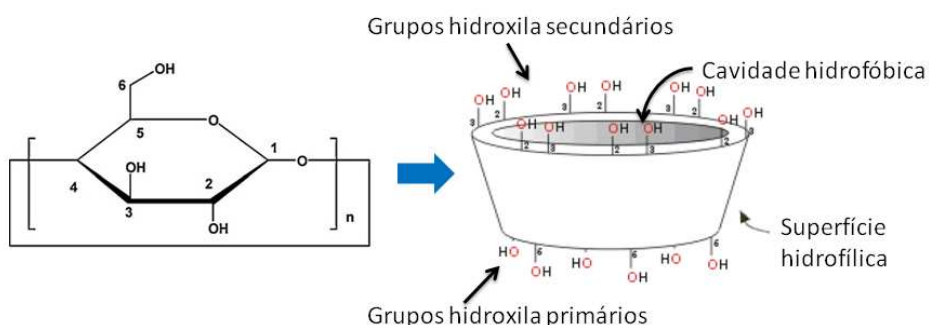


Figura 13. Estrutura química e representação da ciclodextrina em forma de cone oco, truncado, com os grupos hidroxila localizados nas aberturas do cone [35].

As vantagens do uso de β -CD como estabilizante de AgNP, deve-se ao fato de se tratar de um material biodegradável e de baixa toxicidade, como também à sua capacidade de formar complexos do tipo hospedeiro-convidado, contendo ambiente único para reações químicas, e por possuir habilidade para formar complexos de inclusão com uma variedade de substâncias [37].

Além disso, a complexação de β -CD pode ser usada para promover modificações na reatividade química do substrato, fixação de substâncias muito voláteis, melhoria na solubilidade de compostos, estabilização de substâncias sensíveis à luz, calor e oxidação, proteção da degradação de substâncias por microrganismos, mascaramento de corantes ou pigmentos e atividade catalítica com substratos. As consequências diretas mais importantes da inclusão de CD em um substrato são relativas ao aumento da sua solubilidade em meio aquoso [37].

Sendo assim, com a crescente demanda para a adoção de protocolos sustentáveis e menos agressivos ambientalmente, o uso desses precursores biodegradáveis e não-tóxicos para preparar nanomateriais tem sido incentivado. O primeiro trabalho a introduzir os conceitos de "química verde" para preparar nanopartículas de prata foi relatado por Raveendran e colaboradores [38]. Nesse trabalho, os pesquisadores usaram glicose como agente redutor e amido como agente estabilizante para produzir AgNP. Posteriormente, outros trabalhos foram divulgados na literatura utilizando carboidratos como estabilizantes, entre eles podem-se destacar: dextrana [39], chitosana [40], celulose [41] e alginato de sódio [42].

Alguns trabalhos são reportados na literatura, utilizando a β -CD como estabilizante. Jaiswal e colaboradores [43] prepararam nanopartículas de prata utilizando diferentes concentrações de β -CD não modificada e boridreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das AgNP mostraram nanopartículas esféricas, com diâmetros médios de 4-7 nm e 17 nm. A atividade antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi investigada por um método de microtitulação. Um aumento da atividade antibacteriana foi observado para as AgNP estabilizadas com β -CD, em relação às AgNP sem β -CD.

Chen e colaboradores [44] sintetizaram nanopartículas de prata estabilizadas com β -ciclodextrina modificada, para detecção de diferentes compostos aromáticos, utilizando métodos colorimétricos. Os resultados obtidos indicam que as respostas colorimétricas estão relacionadas à associação específica dos isômeros de compostos aromáticos com moléculas de β -CD, presentes na superfície da nanopartículas de prata.

Abou-Okeil e colaboradores [45] obtiveram AgNP a partir de β -ciclodextrina modificada com 2-cloroetilamina, que foi utilizada como um agente de estabilização e redução na preparação das AgNP. A formação das AgNP foi confirmada pela presença da banda plasmon em 411 nm. Os resultados indicam que as condições ótimas para obtenção das AgNP, com dimensões que variam de 1 a 9 nm, são pH 12 e tratamento térmico a 70 °C, durante 20 min.

Além de sua importante função na estabilização, o agente estabilizante tem a função de controlar o tamanho médio das NPsM. Como a literatura destaca, variando-se a razão entre as quantidades de precursor e estabilizante pode-se obter NPsM de diferentes tamanhos. Isso está intimamente relacionado à relação superfície-volume. Para altas quantidades de estabilizante (superfície) em relação ao precursor (volume), a área superficial total que pode ser estabilizada é alta, e assim são formadas NPsM pequenas. Por outro lado, se há pouco estabilizante disponível em relação ao precursor, a área total estabilizada será menor e, portanto, serão formadas menores quantidades de NPsM, porém de maior tamanho [19].

Outro fator que influencia o tamanho e a forma das partículas é a magnitude da interação entre o estabilizante e o metal. Estabilizantes que interagem fortemente tendem a formar partículas menores, pois dificultam a incorporação de espécies ou mesmo a dissolução e aglomeração das partículas [19].

O controle da distribuição de tamanho de nanopartículas depende da cinética das etapas de nucleação e crescimento. Experimentalmente, a separação das etapas de nucleação e crescimento não é trivial e envolve a escolha correta dos reagentes e do método de síntese mais adequado. A homogeneidade da nucleação também é importante para obtenção de NPsM com distribuição de

tamanhos estreita. Por essa razão, a síntese coloidal é realizada sob agitação da solução, visando minimizar a ocorrência de gradientes de concentração [19].

Os métodos de preparação buscam, além do controle de tamanho, o controle da morfologia que é de suma importância no que diz respeito às propriedades antimicrobianas. Vigneshwaran e colaboradores [46] prepararam AgNP utilizando o fungo *Aspergillus flavus*. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram AgNP esféricas e monodispersas com tamanho médio de $8,92 \pm 1,61$ nm. Além disso, os autores mostraram a formação de proteína em torno das AgNP, que atua como estabilizante. Foi concluído que o uso de fungos para a síntese de AgNP é um método ambientalmente amigável, além de oferecer possibilidades de produção em grande escala. Já em outro trabalho desenvolvido por Sharma e colaboradores [47], foram obtidas AgNP utilizando o microrganismo *Bacillus koriensis*. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram AgNP de baixa polidispersidade, com tamanho médio de $9,92 \pm 1,33$ nm e forma esférica.

Callegari e colaboradores [48] utilizaram o método físico baseado em irradiação de luz para preparar AgNP. Foi observado que o tamanho e a forma das NPs podem ser controlados a partir da escolha do comprimento de onda de luz usado para o crescimento fotoquímico. Os autores concluíram que a radiação eletromagnética pode ser usada como um parâmetro de controle no processo de crescimento das nanopartículas metálicas.

Zou e colaboradores [49] prepararam AgNP pelo método químico e investigaram os efeitos de vários parâmetros sobre o tamanho e a forma das NPs, variando a temperatura, a proporção de PVP/Ag e a concentração de íons Ag^+ . A morfologia de tais partículas foi investigada por microscopia eletrônica de transmissão. Foi verificado que a mudança morfológica de nanoplaquetas para nanoesferas ocorreu com o aumento da razão molar de PVP/Ag e diminuição da concentração de Ag^+ .

Nanopartículas de prata apresentam forte atividade contra bactérias, vírus e fungos, embora seu mecanismo de ação ainda não seja totalmente conhecido. A

eficiência bactericida depende da característica da superfície, do tamanho e da forma das AgNP, bem como da sua estabilidade química. Pal e colaboradores [50] demonstraram que AgNP com forma triangular apresentam maior ação biocida contra *Escherichia coli*, quando comparadas com partículas de forma esférica e cilíndrica, ou mesmo com íons Ag^+ . Conclusões semelhantes foram obtidas por Sharma e colaboradores [51]. Em um estudo recente [52], foi avaliado o potencial antimicrobiano de AgNP coloidais, com tamanhos variáveis (44, 50, 35 e 25 nm), sintetizadas a partir da redução do complexo $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ por carboidratos (glicose, galactose, maltose e lactose). Foi confirmado que a atividade antibacteriana varia com o tamanho das AgNP, sendo demonstrado que AgNP com diâmetros médios de 25 nm apresentam maior atividade.

1.4. Mecanismo de ação biocida das nanopartículas de prata

A resistência de bactérias a antibióticos tem despertado o interesse no uso de compostos de prata, incluindo nanopartículas de prata, como agentes antibacterianos alternativos. Tais compostos podem reduzir as infecções em pacientes queimados e prevenir o crescimento de bactérias em próteses, cateteres e materiais odontológicos [53,54].

Em geral, nanopartículas de prata podem exercer sua atividade antibacteriana utilizando três mecanismos diferentes: (1) liberação de íons Ag^+ , os quais podem se ligar a grupamentos tióis (-SH), desestabilizando a estrutura de proteínas e enzimas da membrana celular; (2) adsorção das AgNP na membrana celular bacteriana, que pode levar à formação de poros, extravasamento do conteúdo citoplasmático e conseqüentemente à morte celular; (3) produção de espécies oxigenadas reativas (ROS), radicais livres derivados do oxigênio, que também podem causar desestabilização da estrutura do DNA e desnaturação de proteínas [55]. A Figura 14 mostra uma representação esquemática da atividade antibacteriana de íons Ag^+ e AgNP.

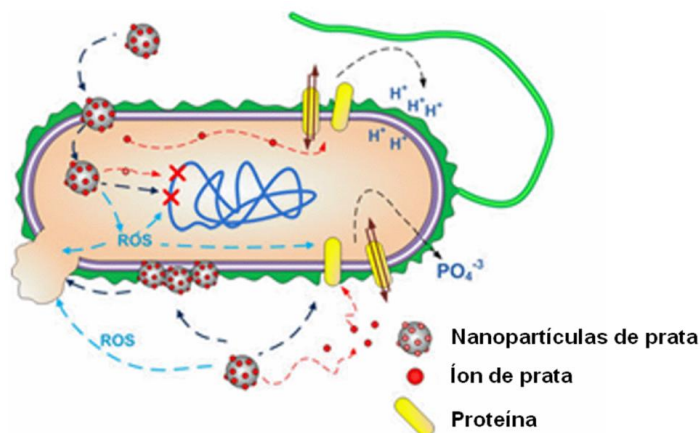
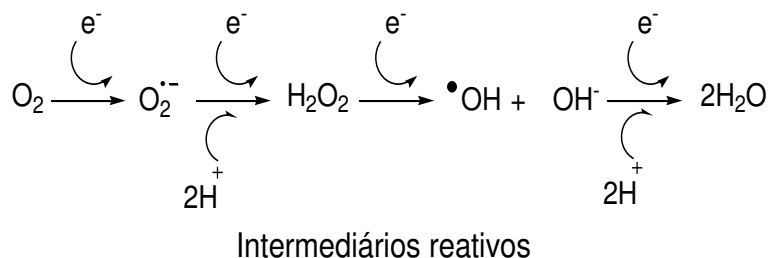


Figura 14. Esquema ilustrativo da interação entre AgNP e uma célula bacteriana [55].

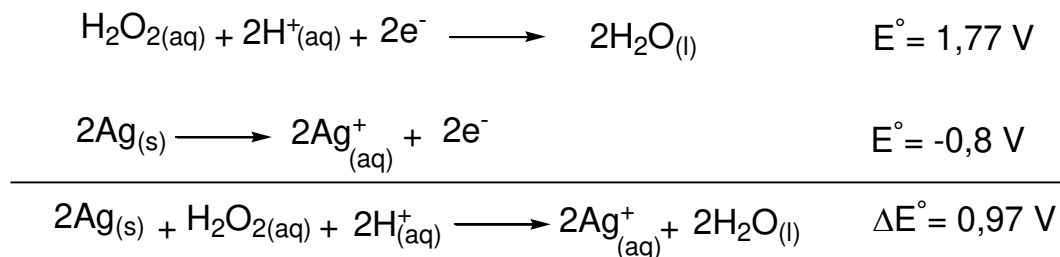
As ROS são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos, levando a concentrações fisiológicas necessárias para o funcionamento normal da célula, ou a quantidades excessivas que causam danos oxidativos à célula. Em princípio, o estresse oxidativo pode ser causado pela redução da quantidade de antioxidantes e produção elevada de ROS. As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio sofre redução, resultando na formação de água (Reação 1). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidropéroxido ($HO_2^\bullet$), hidroxila ($OH^\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria e a atividade das ROS é neutralizada com a transferência de quatro elétrons [56].



Reação 1. Redução do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria, até a formação de água.

Estudos sobre os mecanismos de toxicidade das AgNP, utilizando fibroblastos de filhotes de rato (células do tipo NIH3T3) e células cancerígenas do cólon humano, foram desenvolvidos por Hsin e colaboradores [57]. Nestes estudos, observou-se que, na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP, há indução a apoptose* de 43,4% para células de fibroblastos, enquanto $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ produz necrose de 40,2% para células cancerígenas. Os autores concluíram que os mecanismos da apoptose em células de fibroblastos ocorrem via mitocondrial, incluindo a geração de ROS nas células, que ativam as proteínas reguladoras da apoptose, induzindo a migração da proteína Bax para a superfície da mitocôndria.

Um possível mecanismo de toxicidade para células humanas foi proposto por Asharani e colaboradores [58]. Segundo os pesquisadores, nanopartículas de prata perturbam a cadeia respiratória mitocondrial, causando a geração de ROS, o que afeta a produção de ATP e danifica o DNA. Neste estudo foi proposto que as AgNP liberam íons prata a partir da reação de AgNP com H_2O_2 , como indicado a seguir (Reação 2).

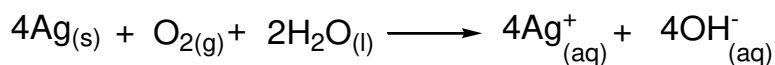


Reação 2. Dissolução oxidativa de nanopartículas de prata [58].

Asharani e colaboradores [58] também sugeriram que este mecanismo de reação pode ocorrer nas mitocôndrias em células eucarióticas, onde existe uma grande concentração de H^+ . Da mesma forma, foi observado que este mecanismo pode ocorrer na membrana celular da bactéria.

*Apoptose – “auto-destruição celular” que ocorre de forma ordenada.

Outro possível mecanismo para a dissolução oxidativa das AgNP foi proposto por Choi e colaboradores [59]. Neste caso, a prata é oxidada na presença de oxigênio (Reação 3). Foi observada uma mudança de cor da suspensão com AgNP, durante um período de uma semana.



Reação 3. Reação proposta para o mecanismo de dissolução oxidativa das nanopartículas de prata com oxigênio [59].

Neste último trabalho foi relatado que a quantidade de íons prata livres corresponde a aproximadamente 2,2% do total de prata presente na suspensão de AgNP [59].

Vários estudos têm relacionado a toxicidade de AgNP à liberação de íons prata. Por exemplo, Feng e colaboradores [60] reportaram o estudo do mecanismo de inibição de íons prata contra *S. aureus* e *E. coli*. Para *E. coli* foram observadas alterações morfológicas significativas após o tratamento com íons prata. Foi verificada a presença de grânulos densos no centro e em torno da parede de células de *E. coli*. A microanálise de raios X destes grânulos comprovou a presença da prata e enxofre, sendo este resultado atribuído à hipótese de que os íons prata entram na célula bacteriana e podem-se combinar com os componentes celulares contendo enxofre. Também foi observada a presença de grânulos densos no interior da célula da *S. aureus*, apesar da mesma apresentar uma parede celular de peptidoglicano mais espessa que a *E. coli*, que poderia impedir a penetração dos íons prata no citoplasma. Os autores concluíram que, em ambos os microrganismos, os íons prata entram no interior das células bacterianas através da parede celular, modificando o DNA a partir da interação do grupo tiol presente na estrutura proteica da parede celular da bactéria, resultando em morte celular.

Sondi e Salopek-Sondi [61] também relataram a atividade bactericida de AgNP contra *E. coli*. Para estudar a ação biocida das AgNP, foram utilizadas as técnicas de SEM e TEM. A partir das micrografias, foi observado que as AgNP

interagem com a membrana da bactéria e são capazes de penetrar na célula. Como resultado foi proposto que as AgNP induzem a formação de cavidades na superfície da membrana, causando a morte das células. Os autores concluíram que os nanomateriais obtidos podem ser aplicados na formulação de um novo tipo de bactericida.

Kim e colaboradores [62] investigaram a atividade antimicrobiana da AgNP contra levedura, *E. coli* e *S. aureus*. A presença de íons prata (Ag^+) foi determinada por meio da técnica de espectroscopia de ressonância de spin eletrônico. Os resultados sugerem que os mecanismos de ação biocida das AgNP contra levedura, *S. aureus* e *E. coli*, estão relacionados à liberação de íons Ag^+ da superfície das AgNP, induzindo posteriormente danos à membrana celular. A concentração inibidora mínima para os microrganismos estudados foram de $6,6 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, $3,3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, para levedura, *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

Chopra [63] investigou o aumento da utilização de produtos a base de prata como agentes antimicrobianos. O autor concluiu que materiais com prata são uma alternativa eficaz frente a antibióticos usados no tratamento de feridas. Porém, é destacado que o uso prolongado de baixas concentrações de íons prata pode levar ao desenvolvimento de resistência, sendo sugerido que se selecione dispositivos contendo elevado nível de íons de prata para assegurar uma rápida ação bactericida.

Resumindo o que foi abordado, os efeitos deletérios sobre um organismo após exposição à prata podem ser interpretados de forma positiva se o objetivo for desinfetar ou esterilizar um tipo específico de material. No entanto, se o mesmo material exercer impactos indesejados a outros organismos, tal toxicidade pode ser interpretada como um perigo potencial.

A incorporação de nanopartículas de prata em materiais poliméricos tem sido destacada para a fabricação de embalagens, membranas e produtos na área médica, para inibição da formação de biofilmes, uma vez que estes filmes representam um grande problema de contaminação de alimentos e infecções hospitalares.

1.5. Membranas poliméricas

Membranas são definidas como filmes finos que separam dois fluídos e atuam como barreira seletiva para o transporte de seus componentes, quando aplicado algum tipo de força motriz (pressão, vácuo, potencial elétrico, etc.) [64]. A fração de líquido de alimentação que permeia através da membrana é denominada de permeado, e a fração retida, de concentrado.

Membranas sintéticas são preparadas a partir de diferentes materiais: polímeros, metais, vidros e cerâmicas. Membranas inorgânicas apresentam maior vida útil que membranas poliméricas, entretanto, em virtude da maior versatilidade em se obter diferentes morfologias e de apresentarem menor custo, as membranas poliméricas são as mais utilizadas e as que apresentam melhores perspectivas de crescimento em termos mercadológicos [64].

Membranas sintéticas surgiram como uma tentativa de imitar as membranas naturais, em particular quanto às suas características únicas de seletividade e permeabilidade. As vantagens de utilizar processos de separação por membranas (PSM) sobre processos convencionais se devem à baixa demanda de energia, seletividade, separação de compostos termolábeis e simplicidade de operação e escalonamento [65].

Os processos podem ser classificados de acordo com a força motriz utilizada. Os processos mais importantes comercialmente são aqueles que utilizam um gradiente de pressão como força motriz. Dentro desta classificação, estão os processos de microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa [65], como resumido na Tabela 1.

Tabela 1. Principais processos comerciais de separação por membranas, que utilizam gradiente de pressão como força motriz [65].

Processos	Pressão Aplicada	Diâmetro de poros das membranas (μm)	Material retido	Material que permeia
Microfiltração	0,5 – 2 bar	0,09 - 10	Material em suspensão, bactérias. Massa molar $> 500 \text{ kg mol}^{-1}$	Água, solventes e sólidos dissolvidos
Ultrafiltração	1 - 7 bar	0,004 – 0,1	Colóides macromoleculares. Massa molar $> 5.000 \text{ g mol}^{-1}$	Água, solventes, sais solúveis de baixa massa molar
Nanofiltração	5 – 25 bar	0,001 – 0,005	Moléculas de massa molar $500 < \text{Massa Molar} < 2.000 \text{ g mol}^{-1}$	Água, solventes, sais e moléculas de baixa massa molar
Osmose Inversa	15 - 80 bar	$< 0,002$	Todo material solúvel ou em suspensão	Água e outros solventes

Em relação à morfologia, as membranas podem ser isotrópicas (simétricas) ou anisotrópicas (assimétricas). Membranas isotrópicas possuem estrutura unicamente densa ou porosa, com poros de diâmetros regulares e distribuídos uniformemente ao longo da seção transversal da membrana. As membranas anisotrópicas apresentam em sua camada superior uma camada densa ou poros de menor tamanho que os encontrados na camada inferior, também chamada de suporte. As membranas anisotrópicas podem ser classificadas em integrais, quando é formada por um único material, ou compostas, quando a camada superior (ou pele) é formada por um material diferente ao do suporte (Figura 15) [65].

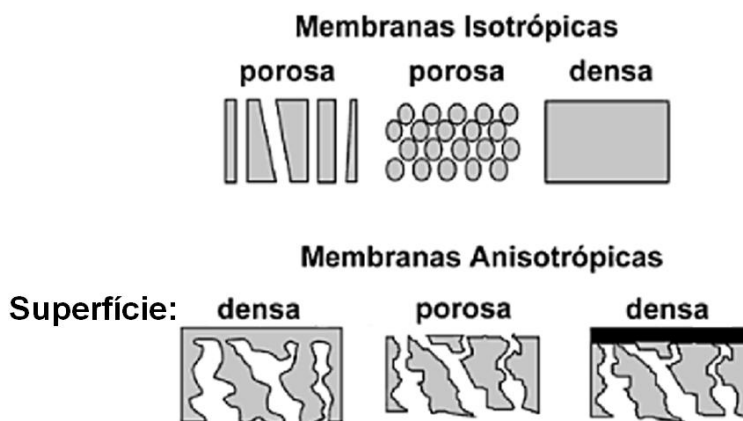


Figura 15. Esquema da seção transversal de diferentes tipos de membranas [65].

As membranas poliméricas são preparadas a partir de várias metodologias, tais como: sinterização, estiramento, gravação, extrusão, recobrimento e inversão de fases, sendo esta última a mais utilizada. No método de inversão de fases, a separação de fases é induzida por alterações na composição, ou na temperatura da solução polimérica, tornando-a instável termodinamicamente e causando a formação de duas fases: uma concentrada em polímero, que formará a estrutura da membrana, e outra pobre em polímero, que resultará na formação dos poros. Vários métodos de inversão de fases podem ser empregados para induzir a instabilidade da solução polimérica, levando à separação de fases: precipitação térmica, precipitação por evaporação de solvente, precipitação por contato com

vapor de não-solvente e imersão-precipitação [66,67]. Na inversão de fases por imersão-precipitação, por exemplo, há troca de massa entre o banho de precipitação e a solução polimérica, que tem como força motriz a diferença de potencial químico dos componentes no banho e na solução (Figura 16).

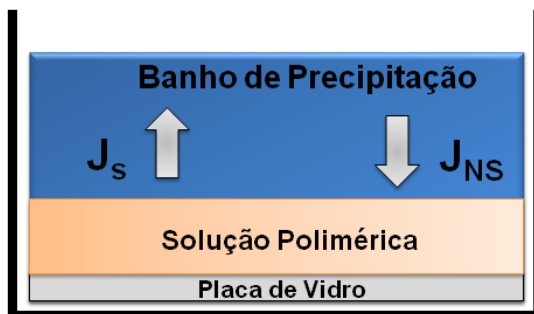


Figura 16. Esquema de transferência de massa durante a formação de membranas poliméricas. J_s é o fluxo de solvente e J_{NS} é o fluxo de não solvente.

Em um sistema ternário constituído por polímero (P), solvente (S) e não-solvente (NS), as mudanças de composição da solução, durante a formação de membranas, podem ser representadas por caminhos cinéticos de composição em um diagrama de fases. Este tipo de representação permite correlacionar os tipos de morfologia de acordo com a composição da solução durante o processo de inversão de fases, sendo a separação de fases dependente da composição inicial da solução e dos fluxos de saída de solvente e entrada de não-solvente. Estes fatores determinam a composição da solução no momento da separação de fases, representada pela interseção entre o caminho da composição da solução no diagrama ternário e a curva binodal, resultando em um tipo específico de morfologia [68]. Segundo Wienk e colaboradores [69] e van de Witte e colaboradores [70], quatro principais caminhos cinéticos podem ser identificados em um sistema ternário hipotético, como representado esquematicamente na Figura 17.

No caminho A, a transferência de massa entre a solução polimérica e o banho induz a separação de fases a se iniciar na região metaestável, entre a curva binodal e a espinodal, com concentração de polímero maior que do ponto crítico,

onde o mecanismo predominante é o de nucleação e crescimento. Este mecanismo normalmente resulta na formação de membranas microporosas com baixa interconectividade entre os poros (células fechadas).

No caminho B, o processo de separação de fases se inicia na região espinodal, separando-se espontaneamente em regiões interconectadas de alta e baixa concentração de polímero, pelo mecanismo de separação espinodal. As membranas obtidas apresentam poros com alto grau de interconectividade.

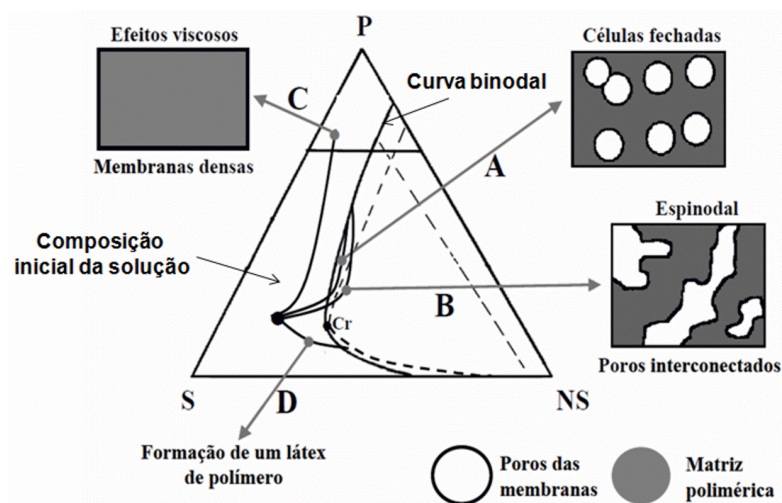


Figura 17. Representação esquemática dos possíveis caminhos cinéticos durante o processo de inversão de fases e a representação das morfologias resultantes [71].

Alternativamente, as taxas de transferência de massa podem levar a solução diretamente à região de efeitos viscosos sem que haja separação de fases líquido-líquido, o que favorece a formação de uma membrana densa (caminho C). Esse comportamento é típico do processo de evaporação controlada de solvente, porém, pode ocorrer também na imersão-precipitação quando o fluxo de entrada de não-solvente na solução é muito menor do que o fluxo de saída de solvente.

O quarto caminho ocorre quando a composição da solução polimérica atinge a curva binodal abaixo de seu ponto crítico (D), favorecendo a nucleação e crescimento da fase concentrada em polímero. Deste modo, não haverá formação de membrana, mas a formação de um látex de polímero.

A descrição do processo de inversão de fases pode ser feita pela variação da energia livre de Gibbs da mistura (ΔG_m) do sistema polímero, solvente e não-solvente, representada pela Equação (6) em termos da variação de entropia (ΔS_m) e de entalpia da mistura (ΔH_m).

$$\Delta G_m = -T \cdot \Delta S_m + \Delta H_m \quad (6)$$

A separação de fases irá ocorrer quando se atinge um estado termodinamicamente instável, por perturbações na composição ou temperatura da solução, de modo a minimizar a energia livre da mistura. Para que ocorra a separação de fases, dois critérios devem ser atendidos:

$$(\Delta G_m)_{\text{Duas Fases}} < (\Delta G_m)_{\text{Uma Fase}} \quad (7)$$

$$\left[\frac{\partial^2 (\Delta G_m)}{\partial n_i^2} \right]_{T,P,n_j \neq n_i} > 0 \quad (8)$$

A Equação 7 estabelece que haverá separação de fases quando ocorrer uma redução na energia total do sistema, enquanto a Equação 8 mostra a condição termodinâmica de estabilidade para um sistema a uma determinada temperatura (T) e pressão (P).

Na preparação de membranas poliméricas por inversão de fases, são comumente usados aditivos, para melhorar a morfologia e as propriedades da membrana final [72].

Diversos fenômenos afetam o desempenho dos sistemas de membranas, tais como: formação de depósitos, polarização de concentração e formação de *biofouling*. A formação de *biofouling* é um problema crítico nos processos de separação por membranas.

O uso de aditivos, como exemplo as AgNP, e agentes de modificação de superfície, são alternativas utilizadas para tentar inibir a formação de *biofouling*. Por definição, *biofouling* é formado pelo acúmulo de microrganismos e seus produtos

extracelulares sobre uma superfície. A formação de *biofouling* consiste geralmente em várias etapas: inicialmente ocorre a deposição dos microrganismos, seguida pela adesão das células sobre uma camada de substâncias extracelulares (exopolissacarídeos). Após este processo, ocorre o crescimento, a multiplicação e a disseminação das células [73]. Este efeito compromete a estrutura da membrana, bem como diminui seu desempenho nos processos de separação por membrana.

Vários estudos são relatados na literatura usando AgNP como aditivo na preparação de membranas poliméricas, bem como a funcionalização das membranas para inibir a formação do *biofouling*. Lee e colaboradores [74] prepararam membranas de poliamida e nanopartículas de prata por polimerização *in situ*. Os nanocompósitos foram caracterizados por espectroscopia de fotoemissão de raios X (XPS) e SEM. As membranas com nanopartículas de prata apresentaram atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa*. Além disso, os nanocompósitos apresentaram bom desempenho em termos de fluxo e rejeição de sal. Os resultados de SEM mostraram microrganismos mortos sobre as membranas contendo nanopartículas de prata.

Kochkodan e colaboradores [75] modificaram a superfície de membranas de polissulfona e de poli(fluoreto de vinidileno) , por meio polimerização fotoiniciada, utilizando substâncias com propriedades antibacterianas, tais como: ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfônico, metacrilato de 2-hidroximetila e metacrilato de etil 2-dimetilamino. Os resultados mostraram que, durante a filtração de uma suspensão contendo *E. coli*, através da membrana não modificada, o fluxo diminuiu com o tempo, devido à formação do *biofouling* na superfície da membrana. As membranas modificadas com substâncias mais hidrofílicas são menos susceptíveis à formação de incrustações de bactérias. Além disso, foi observada a redução da rugosidade das membranas por AFM, o que inibiu a formação do *biofouling*. As membranas modificadas com metacrilato de etil 2-dimetilamino possuíram melhores atividades antibacterianas, devido ao menor crescimento de microrganismos na sua superfície e, conseqüentemente, redução da formação de *biofouling*.

1.6. Nanocompósitos poliméricos com nanopartículas de prata

Segundo a definição da IUPAC [76], compósitos são materiais multicomponentes que compreendem vários domínios de fases diferentes, dos quais pelo menos um domínio é uma fase contínua, exibindo propriedades únicas, as quais não são possíveis de serem obtidas a partir dos seus componentes individuais. As dimensões da fase dispersa podem variar de escala micrométrica à macrométrica e a interface entre as fases deve ser bem definida. O material é denominado nanocompósito quando pelo menos uma de suas fases possui dimensões em escala nanométrica.

Nanocompósitos são considerados materiais dotados de novas propriedades e funcionalidades [64]. Um crescente interesse tem sido verificado na preparação de nanocompósitos poliméricos com nanopartículas de prata. Devido às suas pequenas dimensões e elevada área superficial, as AgNP têm sido exploradas como novos agentes antimicrobianos, com aplicações em fibras têxteis, artigos de higiene, embalagens e membranas.

Esses materiais mostram um considerável aperfeiçoamento nas propriedades que não poderiam ser normalmente alcançadas por polímeros puros ou compósitos convencionais. No entanto, a melhoria nas propriedades não pode ser atribuída somente ao aditivo, mas também às propriedades da matriz polimérica. Assim, o grau de modificação nessas propriedades será diferente para cada tipo de nanocompósito, variando em função do tipo de polímero utilizado, da compatibilidade entre a nanocarga e a matriz polimérica e do método de processamento utilizado [64].

1.6.1. Polissulfonas

As polissulfonas (PSf) são polímeros predominantemente amorfos, termoplásticos, que possuem temperatura de transição vítrea ao redor de 190 °C e natureza hidrofóbica. Além disso, apresentam elevada resistência química, especialmente a alcoóis, soluções salinas e alcalinas, detergentes, óleos e ácidos. Polissulfonas são susceptíveis ao ataque por solventes orgânicos polares como cetonas, hidrocarbonetos halogenados e hidrocarbonetos aromáticos. Exibem excelente estabilidade térmica e mecânica e alta resistência à hidrólise e agentes oxidantes [68].

Na Figura 18 é representada a estrutura molecular da polissulfona.

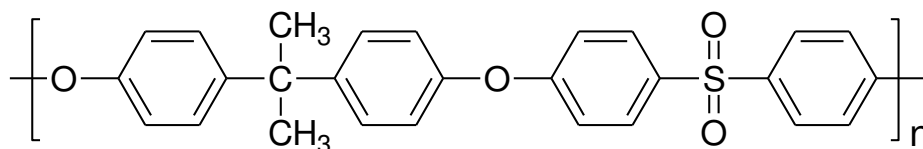


Figura 18. Estrutura molecular da polissulfona.

O interesse em membranas deste polímero é devido às suas excelentes características, que incluem desde seletividade e permeabilidade úteis, até propriedades mecânicas, térmicas e químicas adequadas. Estas membranas podem ser usadas em aplicações que variam desde rins artificiais para purificação de sangue, sistemas de recuperação de águas residuais, como também no processamento de alimentos e bebidas [68].

Vários trabalhos da literatura têm relatado o uso de AgNP incorporadas a polissulfonas para tornar o polímero resistente a microrganismos. Neste contexto, Zodrow e colaboradores [77] prepararam membranas de polissulfona contendo AgNP, pelo método de inversão de fases, para uso em processos de ultrafiltração. As membranas apresentaram propriedades antibacterianas quando testadas com uma variedade de bactérias, incluindo *E. coli* K12 e *Pseudomonas mendocina* KR1, e um bacteriófago MS2. A incorporação de AgNP aumentou a hidrofilicidade

da membrana, a permeabilidade e redução de vários tipos de *biofouling*. No entanto, os autores observaram, por espectroscopia de fotoelétrons, a lixiviação da prata da superfície das membranas após filtração de apenas 4 litros de água. A análise de ICP-OES mostrou que 90% de prata permanece na membrana, porém foi verificada uma perda significativa de atividade antibacterial e antiviral.

Taurozzi e colaboradores [78] relataram a preparação de membranas porosas de PSf e membranas de PSf/AgNP, pelo método de inversão de fases. Para entender como as diferentes condições de preparação influenciam a estrutura final das membranas contendo AgNP, foram utilizadas várias estratégias: a) variação da temperatura e composição do banho; b) duas diferentes formas de incorporação das AgNP e c) adição de dois agentes para promover a formação dos poros. As imagens de SEM mostraram nanopartículas de diâmetro de 50 a 500 nm, distribuídas ao longo da superfície filtrante dos nanocompósitos preparados pelo método *ex situ*. Já as nanopartículas de prata preparadas pelo método *in situ* apresentaram diâmetro menor que 50 nm, mas distribuídas uniformemente ao longo da seção transversal. Segundo os autores, estas diferenças são atribuídas ao longo período de redução dos íons Ag^+ na solução polimérica, disponibilidade limitada de prata para o crescimento de nanopartículas e ao efeito do meio heterogêneo durante a formação AgNP no nanocompósito, que pode atrasar a nucleação e retardar o crescimento de AgNP. As membranas exibiram 95% de atividade antimicrobiana contra *E. coli* e resistência a *biofouling*.

Koseoglu-Imer e colaboradores [79] também desenvolveram membranas de PSf com concentrações de AgNP na faixa de 0,25% a 1,0%, utilizando o método de inversão de fases. As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a superfície das membranas apresentaram mudanças com a adição da AgNP. As partículas apresentam forma esférica e formam agregados com o aumento da concentração de AgNP. A rugosidade da membrana de PSf aumenta com o aumento da concentração de AgNP. Os autores atribuem esse aumento à presença de agregados de AgNP na superfície da membrana. Foi observado também a diminuição da permeabilidade das membranas contendo maior concentração de AgNP, o que foi atribuído ao aumento do número e tamanho de

AgNP sobre a superfície da membrana. Os resultados microbiológicos mostram um decréscimo no crescimento de colônias de bactérias com adição da AgNP. No entanto, para os testes de *biofouling* com lodo ativado, não foi observada inibição da formação de *biofouling* na membrana de PSf com AgNP.

Sawada e colaboradores [80] prepararam fibras ocas de poliétersulfona (PES) enxertadas com acrilamida, e incorporaram AgNP em uma camada superficial de acrilamida por fotoredução de nitrato de prata. A hidrofiliabilidade da superfície da membrana foi aumentada, levando à redução de *biofouling* de albumina de soro bovino. A formação das AgNP foi confirmada por espectroscopia de fotoelétrons de raios X e microscopia eletrônica de transmissão. As membranas de fibra oca contendo AgNP apresentam atividade antibacteriana contra *E. coli*, porém membranas PES sem AgNP não apresentam atividade antibacteriana. Além disso, a atividade antibacteriana da membrana contendo AgNP foi testada por imersão em suspensão contendo *E. coli* e incubação durante 8 horas a 37 °C. Mais de 99,99% das células de *E. coli* foram mortas, o que sugere que as AgNP foram capazes de inibir o crescimento bacteriano.

1.6.2. Acetato de celulose

Acetato de celulose (CA) é um éster de celulose comercialmente importante por ser um derivado de celulose, um polímero de origem renovável, biodegradável e reciclável. Na Figura 19 está representada a estrutura química do acetato de celulose. O acetato de celulose é obtido pela esterificação de materiais celulósicos abundantes, tais como algodão, polpa de madeira, cana de açúcar e papel reciclado. O polímero é amorfo, não tóxico e inodoro, tendo como principais características a resistência a ácidos fracos, estabilidade em óleos minerais e permeabilidade a vapor d'água e álcool. Em termos de propriedades óticas, o acetato de celulose apresenta excelente transparência [81].

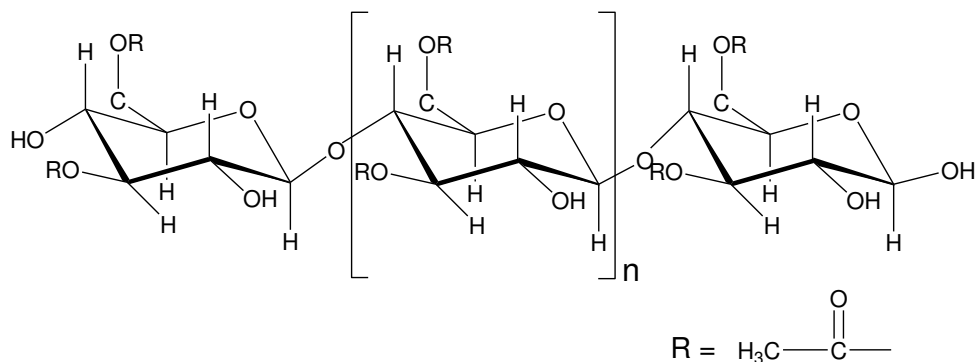


Figura 19. Estrutura química do acetato de celulose.

O acetato de celulose é um polímero que pode ser facilmente moldado na forma de filmes, membranas, fibras e microesferas. Seu uso industrial como termoplástico de extrusão, injeção e compressão abrange fios para a indústria têxtil, filtros, membranas e recobrimentos de superfície. Membranas de CA têm sido aplicadas com sucesso em sistemas de biosseparação para ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa [82]. A utilização de CA tem algumas limitações, principalmente devido à sua suscetibilidade ao ataque por solventes orgânicos e microrganismos. Outra limitação é a formação de *biofouling*. Apesar de se utilizar tratamentos específicos para controlar a formação do *biofouling*, muitas membranas poliméricas não resistem aos produtos químicos utilizados no processo de limpeza [83].

Neste sentido, pesquisadores têm desenvolvido nanocompósitos de acetato de celulose a partir da incorporação de nanocargas, por exemplo, nanopartículas de prata. Chou e colaboradores [84] relataram a preparação de fibras ocas de acetato de celulose contendo nanopartículas de prata por meio da técnica de eletrofição. As fibras ocas apresentam morfologia esponjosa e superfícies densas (sem poros) nas camadas interiores e exteriores da fibra. As nanopartículas de prata foram formadas na superfície densa exterior das fibras, a partir da redução química, onde foi utilizado como agente redutor dimetilformamida. As fibras de acetato de celulose apresentam elevada atividade antimicrobiana contra os microrganismos *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, a atividade antimicrobiana é preservada, mesmo após as fibras serem mantidas em banho de água por 180 dias.

Son e colaboradores [85] descreveram a preparação de nanofibras de acetato de celulose contendo nanopartículas de prata em sua superfície, por eletrofiação e irradiação UV, a partir da adição de pequenas quantidades AgNO_3 à solução polimérica. As fibras funcionalizadas com nanopartículas de prata, com tamanho médio de 21 nm, apresentam atividade antibacteriana contra os microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, sendo essa atividade atribuída à liberação de íons de prata.

Em um trabalho anterior, Son e colaboradores [86] também prepararam nanofibras de CA contendo nanopartículas de Ag metálica, obtidas por fotorredução lenta de íons Ag^+ . O nanocompósito obtido também apresenta atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

Algumas pesquisas [87] têm explorado também o desenvolvimento de superfícies antibacterianas, a partir de outros polímeros. Xu e colaboradores [88] prepararam nanocompósitos de fibras ultrafinas de poli(ácido láctico) contendo AgNP e mostraram a redução do crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. Zhu e colaboradores [89] desenvolveram membranas de quitosana, imobilizando íons de prata ou Ag metálica em sua superfície, e também verificaram a inibição da formação de *biofouling*.

Nanocompósitos de prata foram obtidos por Mohan e colaboradores [90] a partir da preparação de hidrogéis de matrizes poliméricas derivadas de poli(acrilamida). O grau de reticulação e a natureza dos polímeros foram considerados fatores importantes no controle da forma e do tamanho das nanopartículas. Neste estudo também foi mostrado que os nanocompósitos apresentam atividade antimicrobiana frente à *E. coli* e *Bacillus*.

Samuel e colaboradores [91] relataram que catéteres de poliuretano e silicone impregnados com AgNP apresentaram desempenho significativo na prevenção de infecções hospitalares. Foi verificado que materiais poliméricos, com distribuição uniforme de nanopartículas de prata, apresentam atividade antimicrobiana significativa contra uma ampla faixa de microrganismos e também redução na formação de *biofouling* sobre os catéteres.

A partir das informações relatadas na literatura, pode-se inferir que as propriedades dos nanocompósitos contendo AgNP, não só dependem das características morfológicas das nanopartículas, como também do método e das condições de sua preparação, uma vez que estes podem afetar o tamanho, a forma, a camada estabilizante e o grau de dispersão das nanopartículas em matrizes poliméricas e, conseqüentemente, a adesão nanopartícula à matriz [64,92,93].

Capítulo 2

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

A proposta deste trabalho foi estudar as condições de preparação de nanopartículas de prata de tamanho uniforme, utilizando-se polivinilpirrolidona e β -ciclodextrina como estabilizantes, bem como caracterizar as nanopartículas formadas.

Um segundo objetivo foi preparar e caracterizar membranas poliméricas porosas de polissulfona e acetato de celulose, obtidas pelo processo de inversão de fases, com a incorporação das nanopartículas de prata preparadas e avaliar a atividade antimicrobiana das membranas obtidas.

2.2. Objetivos Específicos

i) Investigar a influência da proporção do precursor e estabilizante em relação ao estado de agregação das AgNP e também à espessura do estabilizante associado às nanopartículas de prata por microscopia eletrônica de transmissão.

ii) Caracterizar a camada de estabilizante em torno das AgNP por imagem de energia filtrada (ESI-TEM), na qual átomos específicos são revelados.

iii) Estudar a influência de diferentes métodos de dispersão das AgNP nas membranas porosas de acetato de celulose e polissulfona, preparadas pelo processo de inversão de fases.

iv) Avaliar o potencial antimicrobiano das membranas de polissulfona e acetato de celulose contendo nanopartículas de prata frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Capítulo 3

3. Parte Experimental

3.1. Materiais e Métodos

A Tabela 2 apresenta as características dos reagentes empregados neste trabalho, os quais foram utilizados sem prévia purificação.

Tabela 2. Características dos reagentes e polímeros utilizados neste trabalho.

Reagentes	Fórmula	Procedência	Pureza (%)
Nitrato de prata	AgNO_3	Plat-Lab	99
Polivinilpirrolidona 40.000 g mol ⁻¹	$(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$	Sigma Aldrich	-
β -Ciclodextrina	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}$	Sigma Aldrich	98
Hidróxido de sódio	NaOH	Lafan	97
Glicose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Lafan	99
Polissulfona 35.000 g mol ⁻¹	$(\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{SO}_4)_n$	Sigma Aldrich	-
Acetato de celulose 30.000 g mol ⁻¹	$(\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{14})_n$	Sigma Aldrich	-
N-metilpirrolidona	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$	Sigma Aldrich	99,5
Membrana de celulose regenerada	-	Spectrum lab	-
Acetona	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	Labsynth	99,5
Peptona (Proteína)	-	Oxoid	-
Cloreto de sódio	NaCl	Synth	-
Citrato de sódio anidro	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	Synth	-
Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Mallinckrodt	PA.A.C.S
Sulfato de amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Nuclear	PA.A.C.S
Fosfato monobásico de potássio	KH_2PO_4	Ecibra	99
Fosfato dibásico de potássio	K_2HPO_4	Ecibra	99

As culturas bacterianas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 14207 e *S. aureus* ATCC 29213 foram adquiridas do banco de culturas da Fundação André Tosello e conservadas em glicerol a -18 °C. Para cultivo em meio sólido foi utilizado Brain Heart Infusion agar (BHI) da marca DIFCO. Para os ensaios em cultura líquida, utilizou-se o meio Minimal Davis (K_2HPO_4 0,7 g L⁻¹; KH_2PO_4 0,2 g L⁻¹; $(NH_4)_2SO_4$ 1 g L⁻¹; $Na_3C_6H_5O_7$ 0,5 g L⁻¹; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g L⁻¹), como descrito anteriormente por Zodrow e colaboradores [77]. Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

3.2. Preparação de AgNP utilizando PVP como estabilizante

As nanopartículas de prata estabilizadas com polivinilpirrolidona (AgNP-PVP) foram preparadas utilizando nitrato de prata como precursor, PVP como agente estabilizante, glicose ($C_6H_{12}O_6$) como agente redutor, hidróxido de sódio (NaOH) como catalisador da reação e água como solvente [94]. Foram preparados 15 mL de solução de $C_6H_{12}O_6$ 0,013 mol L⁻¹ e 15 mL de NaOH 0,01 mol L⁻¹, que foram misturados com 30 mL de uma solução de PVP 0,015 mol L⁻¹, sob agitação magnética constante. A solução resultante foi aquecida e, após atingir 60 °C, foram adicionados 20 mL de solução de nitrato de prata 0,01 mol L⁻¹ sob fluxo de 1 gota s⁻¹. Em seguida, o sistema foi mantido sob aquecimento (60 °C) por mais 10 min. O produto da reação foi lavado 3 vezes com aproximadamente 25 mL de água deionizada, para remoção de outros íons e glicose, em uma centrífuga a 10.000 rpm por um período de 30 min. As AgNP-PVP foram liofilizadas e posteriormente mantidas em dessecador. Foram também preparadas AgNP-PVP a partir de soluções de nitrato de prata com concentrações de 0,05 mol L⁻¹ e 0,10 mol L⁻¹. Para estudar o efeito do estabilizante, foram preparadas AgNP-PVP a partir de diferentes proporções estabilizante/precursor. A Tabela 3 apresenta as concentrações e proporções utilizadas.

Tabela 3. Razões mássicas e molares entre PVP, glicose, NaOH e AgNO₃ utilizadas nas preparações de AgNP-PVP a partir de soluções 0,01 mol L⁻¹ de AgNO₃.

$m_{\text{PVP}}/m_{\text{AgNO}_3}$	$n_{\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6}/n_{\text{AgNO}_3}$	$n_{\text{NaOH}}/n_{\text{AgNO}_3}$
1,5	2,0	1,5
3,0	2,0	1,5
6,0	2,0	1,5

3.3. Preparação de AgNP utilizando β -CD como estabilizante

As nanopartículas de prata estabilizadas com β -ciclodextrina (AgNP- β -CD) foram preparadas utilizando as mesmas condições de síntese descritas no item 3.2, porém o agente estabilizante foi a β -CD e a concentração de nitrato de prata utilizada foi de 0,01 mol L⁻¹. Além disso, o produto da reação foi dialisado, para remoção de íons nitrato (NO₃⁻), usando membranas de celulose regenerada com corte de 1000 Dalton (Spectra) e, posteriormente, foi liofilizado e mantido em dessecador.

3.4. Preparação das membranas de polissulfona

3.4.1. Membrana de PSf pura

Para a preparação das membranas de polissulfona, foram solubilizadas 3,0 g de PSf em 16,5 mL de N-metilpirrolidona e a solução foi mantida sob agitação por 24 horas, as condições de preparações das membranas foram adaptadas conforme descrito por Basri e colaboradores [95]. Após a completa homogeneização da solução, a mesma foi espalhada sobre a superfície de uma placa de vidro de dimensões de 20 cm x 30 cm, contendo lateralmente dois fios esticados de níquel-cromo de 200 μ m de espessura, utilizados para possibilitar o controle da espessura da membrana. A solução foi espalhada sobre a placa de vidro com auxílio de um

bastão de vidro, onde foi deixada em repouso por 1 minuto para a evaporação parcial do solvente. Em seguida, a placa com a solução espalhada foi introduzida em um banho de água deionizada (não solvente) à temperatura ambiente (23 a 25 °C), até o completo desprendimento da membrana da placa de vidro. Após a precipitação do polímero nesse banho, a membrana foi lavada 3 vezes em banho de água deionizada para remoção completa do solvente e finalmente foi seca à temperatura ambiente.

O procedimento descrito acima permitiu obter membranas assimétricas e porosas, onde a superfície em contato com o ar apresentou aspecto mais brilhante que a superfície em contato com o substrato (vidro).

3.4.2. Método de dispersão

Para a preparação das membranas de polissulfona com incorporação de AgNP-PVP pelo método de dispersão, foram inicialmente solubilizadas 3,0 g de PSf em 10 mL de N-metilpirrolidona (NMP) e a solução foi mantida sob agitação por 24 horas. As AgNP-PVP, preparadas segundo o método descrito no item 3.2, a partir de solução aquosa de nitrato de prata $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, foram dispersas em 3,5 mL de NMP, nas concentrações de $4,3 \times 10^{-3}$, $8,6 \times 10^{-3}$ e $1,7 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$, que correspondem a porcentagens de 0,5%, 1,0% e 2,0% de AgNP-PVP. As suspensões foram submetidas à sonicação em ultrassom de ponta (Sonic) durante 5 minutos e gotejadas na solução polimérica, sob agitação magnética. A concentração de polímero no solvente (NMP) foi mantida constante em todas as soluções, correspondendo a 15,0% em massa. Por outro lado, as concentrações de AgNP-PVP em relação ao polímero, foram de 0,5%, 1,0% e 2,0% em massa. O mesmo procedimento utilizado na etapa de formação das membranas de polissulfona pura foi utilizado para a formação de membranas de PSf contendo AgNP-PVP.

3.4.3. Métodos *in situ*

Diferentemente do método anterior, as AgNP foram preparadas *in situ* a partir de dois métodos:

3.4.3.1. Preparação pelo método *in situ* 1

Foram dissolvidos 3,0 g de PSf em 10 mL de NMP e a solução mantida sob agitação por 24 horas. Em seguida, foram dissolvidos separadamente 0,060 g de PVP e 0,060 g de AgNO_3 em 3,0 mL e 3,5 mL de NMP, respectivamente. Inicialmente foi adicionada a solução de PVP gota a gota à solução polimérica e, em seguida, a solução de AgNO_3 . O NMP foi utilizado como agente redutor das nanopartículas de prata. Neste caso, as concentrações de AgNO_3 e PVP corresponderam cada uma a 2,0% em massa em relação ao PSf. Foram também preparadas membranas de PSf contendo 0,5% e 1,0% de AgNO_3 e PVP. O mesmo procedimento utilizado na etapa de formação das membranas de polissulfona pura foi utilizado para a formação de membranas de PSf contendo AgNP-PVP.

3.4.3.2. Preparação pelo método *in situ* 2

Primeiramente foram dissolvidos 3,0 g de PSf em 10 mL de NMP e a solução polimérica foi mantida sob agitação por 24 h. Em seguida, foram dissolvidos separadamente, 0,060 g de AgNO_3 , 0,090 g de PVP, 0,021 g de NaOH e 0,127 g de glicose em 2,5 mL, 2,0 mL, 1,0 mL e 1,0 mL de NMP, respectivamente. Foi adicionada, gota a gota, a solução de PVP à solução polimérica, em seguida as soluções aquosas de NaOH e glicose e, por último, a solução de AgNO_3 . Neste caso, a concentração de AgNO_3 foi de 2,0% em massa em relação ao polímero. Para a obtenção dos valores das massas de PVP, NaOH e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ foi considerada a razão mássica $\text{PVP}/\text{AgNO}_3=1,5$ e as razões molares: $\text{NaOH}/\text{AgNO}_3=1,5$ e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6/\text{AgNO}_3=2,0$.

Membranas com 0,5% e 1,0% de nitrato de prata também foram preparadas usando o mesmo procedimento e mantendo as mesmas proporções molares dos outros reagentes. A etapa de formação das membranas foi similar à utilizada na preparação da membrana de polissulfona pura.

3.5. Preparação das membranas de acetato de celulose (CA)

3.5.1. Membrana pura

A membrana porosa de CA foi preparada pelo método de inversão de fases [96]. Uma solução contendo 11% de CA e 67% de acetona foi completamente homogeneizada sob agitação por 12 horas. Após a homogeneização da solução polimérica, 4,4 mL de água foram adicionados, gota a gota, à solução polimérica. O volume de água utilizado corresponde a 22 % da solução final. A membrana foi preparada segundo o procedimento já descrito anteriormente para a membrana de polissulfona (item 3.4.1). Porém, após a solução de CA ser espalhada sobre a placa de vidro, esta foi imediatamente introduzida no banho de água deionizada para precipitação, devido o solvente utilizado, cetona, ser volátil.

3.5.2. Método de dispersão

As membranas porosas de CA contendo nanopartículas de prata foram também preparadas pelo método de inversão de fases. Uma solução contendo 11% de CA e 67% de acetona foi completamente homogeneizada sob agitação por 12 horas. Após a homogeneização da solução polimérica, as AgNP- β -CD foram dispersas em ultrassom com volume fixo de 4,4 mL de água (corresponde a 22% da solução final) para atingir as concentrações de 1,0, 0,5 e 2,0% em massa de nanopartículas de prata em relação ao polímero. A suspensão de AgNP- β -CD em água foi adicionada, gota a gota, à solução polimérica para garantir a dispersão das nanopartículas na matriz polimérica. As membranas foram preparadas segundo o procedimento já descrito anteriormente no item 3.4.1. Porém, após a solução de

CA ser espalhada sobre a placa de vidro, esta foi imediatamente introduzida no banho de água deionizada para precipitação.

3.5.3. Método *in situ*

Foram dissolvidos 2,2 g de CA em 17 mL de acetona, a solução polimérica foi mantida sob agitação por 12 h. Em seguida, foram dissolvidos separadamente 0,044 g de AgNO_3 , 0,066 g de $\beta\text{-CD}$, 0,015 g NaOH e 0,09 g de glicose em 1,4 mL, 1,0 mL, 1,0 mL e 1,0 mL de água, respectivamente. Inicialmente, foi adicionada a solução de $\beta\text{-CD}$ gota a gota à solução polimérica, em seguida as soluções de NaOH e glicose e, por último, a solução de nitrato de prata. Neste caso, a concentração de AgNO_3 foi de 2,0% em massa em relação ao polímero. Para a obtenção das massas de $\beta\text{-CD}$, NaOH e glicose foi considerada a razão mássica $\beta\text{-CD}/\text{AgNO}_3=1,5$ e as razões molares: $\text{NaOH}/\text{AgNO}_3=1,5$ e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6/\text{AgNO}_3=2,0$.

As membranas com 0,5% e 1,0% de nitrato de prata também foram preparadas segundo o mesmo procedimento e mantendo as mesmas proporções dos outros reagentes. A etapa de formação das membranas foi similar à utilizada no método de dispersão.

A Figura 20 mostra um esquema ilustrativo das etapas envolvidas

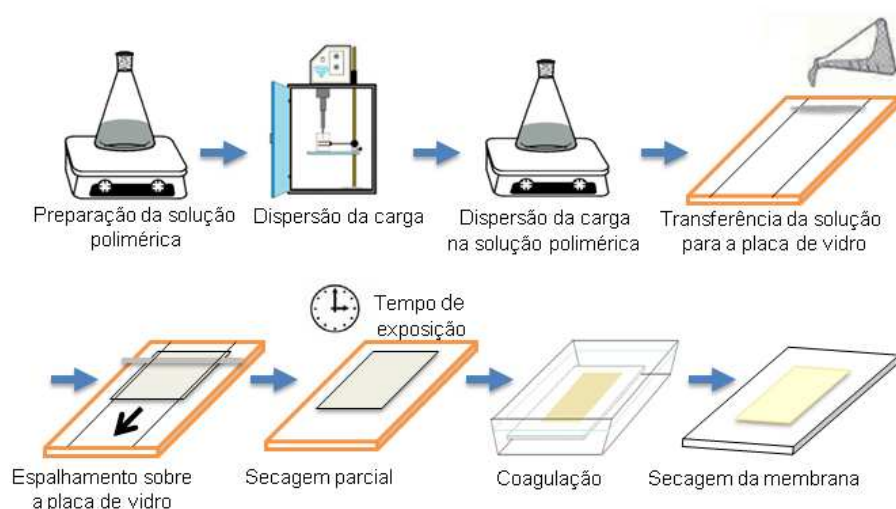


Figura 20. Sequência de etapas envolvidas na formação de membranas pelo método de inversão de fases.

3.6. Nomenclatura das membranas

Para efeito de simplificação, a porcentagem de nanopartículas de prata nas membranas porosas de PSf e CA é indicada na abreviação da membrana como apresentado na Tabela 4. Por exemplo, uma membrana porosa (M) de PSf contendo 2% de AgNP-PVP e obtida pelo método de dispersão (D), fica abreviada como MDPSf2. Já as membranas formadas a partir de 2% de AgNO₃ obtidas pelos dois diferentes métodos *in situ* (I1 e I2), são indicados por MI1PSf2 e MI2PSf2.

O mesmo tipo de abreviação foi usado para as membranas de CA. Por exemplo, uma membrana de CA contendo 2,0% de AgNP- β -CD e obtida pelo método de dispersão é indicada por MDCA2 e pelo método *in situ* (I) de MICA2.

Tabela 4. Abreviações para as membranas.

Materiais	Polímeros	Método	% AgNP*	Estabilizantes
MPSf	Polissulfona	-	-	-
MDPSf2	Polissulfona	Dispersão	2,0	PVP
MI1PSf2	Polissulfona	<i>In situ</i>	2,0	PVP
MI2PSf2	Polissulfona	<i>In situ</i>	2,0	PVP
MCA	Acetato de celulose	-	-	-
MDCA2	Acetato de celulose	Dispersão	2,0	β -CD
MICA2	Acetato de celulose	<i>In situ</i>	2,0	β -CD

*Serão adotadas as mesmas abreviações para as membranas nanocompósitas contendo 0,5% e 1,0% de AgNP.

3.7. Atividade antimicrobiana de AgNP-PVP e AgNP- β -CD

As culturas bacterianas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*) foram cultivadas em placas de Petri contendo meio BHI ágar e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as colônias isoladas foram resuspensas em solução salina 0,90% (m/v), visando alcançar uma densidade óptica (DO) entre 0,15 e 0,18, que corresponde a 10⁶ – 10⁸ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL⁻¹), na escala de MacFarland [97]. As amostras de AgNP-PVP e AgNP- β -CD foram dispersas em 9,9 mL de água peptonada 0,1% (m/v), atingindo uma volume final de

10 mL e mantidas em ultrassom de banho por 20 minutos, para garantir sua completa dispersão. A concentração final de AgNP-PVP e AgNP- β -CD nesta dispersão foi de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Uma alíquota de 100 μL da suspensão bacteriana foi inoculada e os frascos incubados em *orbital shaker* sob agitação de 110 rpm, por 3 horas a 37 °C. Após incubação, uma alíquota de 100 μL foi coletada e submetida à diluição seriada em solução salina 0,9% (m/v). As diluições foram inoculadas em meio de BHI ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas. Após o período de incubação, as colônias foram contadas e o número total de bactérias expresso em unidades UFC mL^{-1} . O controle negativo foi preparado em frasco sem a presença das nanopartículas de prata. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8. Curva tempo-morte para AgNP-PVP e AgNP- β -CD contra *E. coli*

O experimento para obtenção da curva tempo-morte foi realizado para investigar o efeito antimicrobiano das AgNP-PVP e AgNP- β -CD em função do tempo. O microrganismo utilizado foi a *E. coli*, que foi cultivado da mesma forma descrita no item 3.7. As amostras de AgNP-PVP e AgNP- β -CD foram dispersas em água peptonada (0,1% m/v) e, antes de adicionar o microrganismo, a solução foi sonicada por 20 min. As concentrações finais utilizadas de AgNP-PVP e AgNP- β -CD foram mantidas na faixa de 0,5 a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Uma alíquota de 200 μL da suspensão bacteriana foi adicionada em cada frasco e o volume final completado até 20 mL. Os frascos foram incubados em *orbital shaker* sob agitação de 110 rpm a 37 °C. Alíquotas de 100 μL foram coletadas em intervalos de tempo de 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h, e submetidas à diluição seriada em solução salina de 0,90 % (m/v). Em seguida, 20 μL de cada solução foram semeados em meio BHI ágar e o número de colônias de bactérias foram medidos após incubação de 12 h a 37 °C. Os frascos contendo apenas os microrganismos foram utilizados como controle e todos os experimentos foram realizados em triplicata. A Tabela 5 mostra as concentrações de nanopartículas e os volumes de inóculo, AgNP e água

peptonada em cada uma das soluções com diferentes concentrações de nanopartículas.

Tabela 5. Concentrações de AgNP-PVP e AgNP- β -CD usadas no ensaio de curva de tempo-morte contra *E. coli*.

C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	V _{total} (mL)	V* _{inóculo} (μL)	V _{AgNP} (μL)	V** _{peptonada} (mL)
0,5	20	200	33,3	19,76
1,0	20	200	66,7	19,73
2,5	20	200	166,7	19,63
5,0	20	200	333,3	19,46
10	20	200	666,7	19,13
12,5	20	200	833,5	18,96
15	20	200	999,9	18,80
20	20	200	1340,0	18,46

*Concentração do inóculo de 10^6 a 10^8 UFC mL^{-1} e **concentração de água peptonada de 0,1% (m/v).

3.9. Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas de polissulfona e acetato de celulose

Para o método de contagem de colônias foram utilizados os microrganismos *E. coli* e *P. aeruginosa* e avaliadas as membranas puras e as membranas com nanopartículas de prata. A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando os microrganismos, *E.coli* e *S. aureus*. As culturas bacterianas foram semeadas em placas de Petri contendo meio BHI ágar e incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias isoladas foram resuspensas em solução salina 0,9% (m/v), visando alcançar DO entre 0,15 e 0,18, correspondente a 10^6 - 10^8 UFC mL^{-1} . Uma alíquota de 500 μL dessa suspensão foi transferida para frascos erlenmeyer contendo 50 mL de meio Minimal Davis. As membranas de MPSf e MCA puras e as membranas de PSf e CA com nanopartículas de prata foram cortadas em seções de dimensões de 1 cm x 1 cm, sendo colocadas 5 seções de cada membrana em frascos separados. As membranas foram previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Em seguida foram incubadas em *orbital shaker*, sob agitação de 150 rpm, a 37 °C por 12 horas. Após incubação, uma alíquota de 100 μL de cada frasco foi coletada e diluída em série em água peptonada 0,1% (m/v) e plaqueada

em meio de BHI ágar, segundo esquema apresentado na Figura 21. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Como controle, os ensaios microbiológicos foram realizados também para as membranas sem nanopartículas de prata. Além disso, frascos contendo apenas as bactérias (sem membranas) foram também utilizados como um segundo controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Foram utilizados os microrganismos, *E. coli* e *S. aureus*, para as membranas de MCA, MDCA e MICA com concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% de AgNP- β -CD, e os microrganismos, *E. coli* e *P. aeruginosa* para as membranas MPSf, MDPSf, MI1PSf e MI2PSf com concentrações 0,5%, 1,0% e 2,0% de AgNP-PVP.

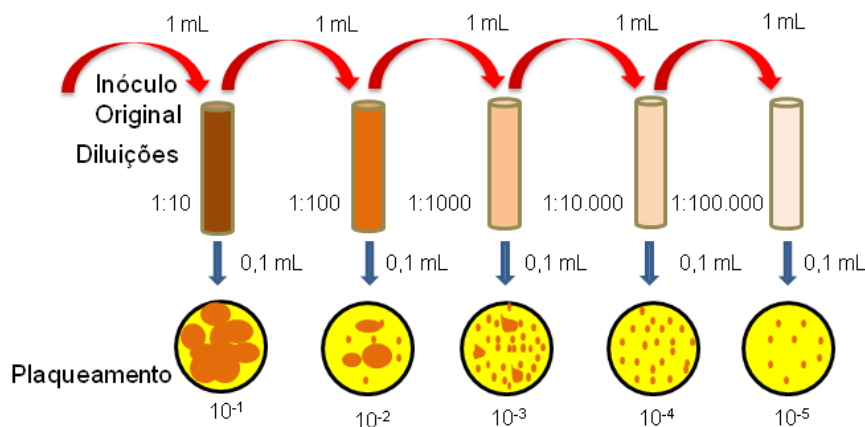


Figura 21. Esquema do processo de diluição seriada e de plaqueamento.

3.10. Estudo da formação do biofouling nas membranas de polissulfona e acetato de celulose

O potencial de formação do *biofouling* sobre a superfície das membranas foi avaliado para as membranas MI1PSf2 e MDCA2 preparadas pelo método *in situ* e dispersão, respectivamente, usando o microrganismo *E. coli*. A cultura bacteriana foi diluída em solução salina 0,90% (m/v) e $10^6 - 10^8$ UFC mL⁻¹. Uma alíquota de 300 μ L do inóculo foi incubada na presença de seções de 2,5 x 2,5 cm das membranas estéreis em 30 mL de meio BHI por 48 h a 37 °C em *orbital shaker*, sem agitação. Após a incubação, cada lado da membrana foi lavado com 1 mL de

solução salina 0,90% (m/v), em seguida a membrana foi colocada em frasco erlenmeyer contendo 20 mL de solução salina 0,90% (m/v) e sonicado por 24 minutos. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi coletada e submetida à diluição seriada em solução salina 0,90% (m/v), que foi plaqueada em meio BHI ágar e incubada por 12 h a 37 °C. Após o período de incubação, as colônias foram contadas e o resultado expresso em UFC mL^{-1} . Como controle, os ensaios microbiológicos foram realizados também para as MPSf e MCA puras. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.11. Técnicas de caracterização

3.11.1. Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis)

Os espectros de UV-vis na região de 200 a 800 nm foram obtidos de suspensões contendo as AgNP-PVP e AgNP- β -CD, em um espectrofotômetro de arranjo de diodos UV-vis Agilent. Para as membranas, as análises de espectroscopia na região do UV-vis foram realizadas utilizando acessório de reflectância difusa (Diffuse Reflectance Spectroscopy-DRS), em um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 500, equipado com acessório DRS da Harrick, de geometria Praying Mantis. Foi utilizado sulfato de bário como referência. Essa análise foi utilizada para identificar as nanopartículas AgNP-PVP e AgNP- β -CD presentes nas membranas de PSf e CA.

3.11.2. Difração de Raios X (XRD)

As análises de difração de raios X das nanopartículas de prata e membranas foram realizadas em um difratômetro Shimadzu, modelo XRD7000, operando com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade de varredura 2° min^{-1} e região de 2θ entre 5 e 90° .

3.11.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho, no modo transmitância, foi utilizada para investigar as nanopartículas e a formação do complexo PVP/Ag e β -CD/Ag, e no modo de ATR (reflexão total atenuada), para a análise das membranas. As AgNP-PVP foram analisadas depositando uma gota da suspensão coloidal sobre janela de seleneto de zinco (ZnSe). No caso das AgNP- β -CD, foram utilizadas pastilhas de KBr. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR Bomem MB series, modelo MB 100, nas seguintes condições: 16 acumulações por espectro; resolução de 4 cm^{-1} e faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . Os espectros infravermelho no modo ATR foram obtidos em um espectrômetro Illuminat IR fabricado pela Smiths Detection, equipado com elemento de reflexão interna de ZnSe (45°). Os espectros foram obtidos nas seguintes condições: 64 acumulações; resolução de 4 cm^{-1} e faixa espectral de 4000 a 650 cm^{-1} .

3.11.4. Espectroscopia Raman

Espectros Raman de β -CD e AgNP- β -CD foram obtidos usando o equipamento Raman 400 F (Perkin Elmer), equipado com um laser de excitação em 785 nm e detector CCD (área ativa de 1024×255 pixels - $26 \times 26\text{ }\mu\text{m}$, resolução de 16 bits e $-50\text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura de trabalho). Este equipamento está localizado no laboratório do Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi.

3.11.5. Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (CHN)

Os teores de estabilizantes presentes nas amostras de AgNP-PVP e AgNP- β -CD foram estimados a partir das quantidades de C, H e N, fornecidas pela análise elementar, que foi realizada no analisador PERKIN ELMER 2400, series II CHNSO.

3.11.6. Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das nanopartículas de prata e membranas foi investigada utilizando o analisador termogravimétrico TA Instruments 2950, em uma faixa de temperatura de 25 a 900 °C, sob taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e fluxo de gás constante de 100 mL min⁻¹ de argônio.

3.11.7. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A análise térmica das amostras foi realizada em instrumento TA DSC Q100, com taxa de aquecimento e resfriamento de 10 °C min⁻¹, de acordo com o programa de análise: 1) aquecimento a partir da temperatura ambiente até 250 °C; 2) isoterma de 2 min nessa temperatura; 3) resfriamento até 25 °C; 4) isoterma de 2 min a 25 °C; 5) aquecimento de 25 °C até 250 °C. As curvas de DSC apresentadas neste texto foram normalizadas com respeito a massa da amostra. Aproximadamente 6 mg de amostras de AgNP-PVP, AgNP-βCD e das membranas foram pesadas e colocadas em porta amostras herméticos de alumínio. Os dados apresentados correspondem ao segundo aquecimento.

3.11.8. Ultrassom de ponteira

Para as preparações das suspensões de nanopartículas foi utilizado o ultrassom de ponteira Sonic, com diâmetro de 1/8 (3 mm) e amplitude máxima de 40% por 5 minutos e temperatura limite de 50 °C.

3.11.9. Ângulo de Contato

O caráter hidrofílico das membranas foi avaliado por meio de medidas de ângulo de contato (Figura 22), usando o aparelho Easydrop Kruss DSA 20. Uma gota séssil de água deionizada possuindo volume de 5,0 µL foi depositada sobre a superfície da membrana, com dimensões de 1 cm x 1 cm e o ângulo de contato foi

determinado a cada 10 s. Os valores foram calculados pelo software do equipamento. Para minimizar o erro experimental, todos os valores reportados constituíram uma média de dez medidas, obtidas em cinco diferentes regiões da superfície da membrana.

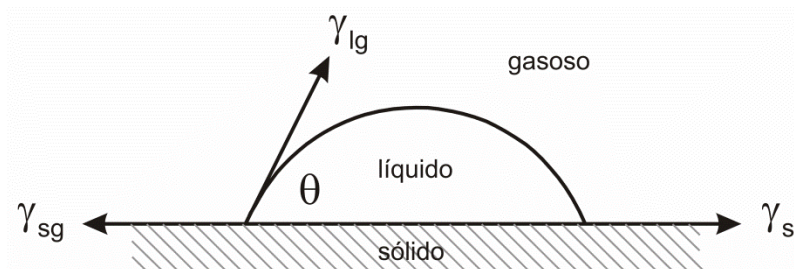


Figura 22. Ilustração do ângulo de contato formado entre gota do líquido sobre superfície sólida.

3.11.10. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM)

As morfologias das membranas foram também estudadas no microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo, modelo JEOL JSM-6340, operado a 3 kV. As amostras foram fraturadas criogenicamente e recobertas com uma fina camada de carbono e ouro no metalizador Baltec MED 020.

3.11.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas no equipamento Carl Zeiss CEM 902, operando com voltagem de aceleração de 80 kV. O registro das imagens foi feito com detector bidimensional, através de uma câmera CCD Proscan, com resolução de 1024 x 1024 pixels e informação de 8 bits por pixel.

Amostras das suspensões aquosas contendo AgNP-PVP e AgNP- β -CD foram gotejadas em uma grade de cobre de 400 mesh, contendo um filme fino de parlódio estabilizado com carbono, e secas à temperatura ambiente.

A preparação das membranas para observação no TEM pode ser dividida em duas etapas: embutimento das membranas em resina epóxi (Eponate, PELCO) e obtenção de seções ultrafinas por crioultramicrotomia.

As seções ultrafinas das amostras, de aproximadamente 30 nm de espessura, foram cortadas com faca de diamante (Diatome), sob condições criogênicas (-100 °C), utilizando o ultramicrotomo Leica UC6. No ultramicrotomo a amostra, com uma área menor que 1 mm² foi colocada em um suporte que se move em direção à navalha fixa, como esquematizado na Figura 23. Os cortes foram coletados da superfície da navalha de diamante com o auxílio de um anel metálico embebido em solução concentrada de sacarose e transferidos para uma grade de cobre (300 a 500 mesh). Essa grade foi então cuidadosamente colocada sobre a superfície de água deionizada para remoção da sacarose. Após a secagem, as amostras foram observadas no TEM.

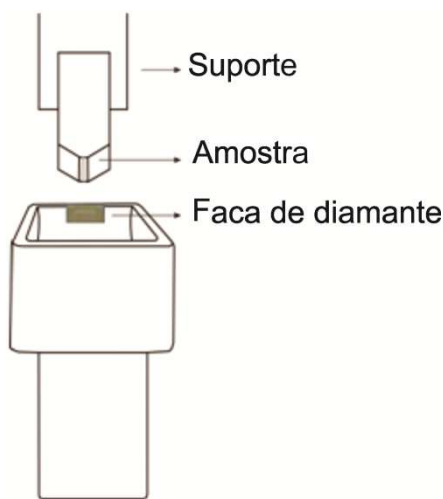


Figura 23. Representação esquemática do corte de amostras em ultramicrotomo.

3.11.12. Imagem espectroscópica de elétrons associada à microscopia eletrônica de transmissão (ESI-TEM)

Os espectros de perda de energia de elétrons e as imagens espectroscópicas das AgNP-PVP e AgNP- β -CD foram obtidos no equipamento Carl Zeiss Libra 120, operando a 80 kV, com fonte LaB₆ termiônica. Uma câmera Olympus, controlada pelo software iTEM, foi usada para aquisição de imagens e espectros. As imagens

de perda de energia de elétrons (ESI) foram obtidas para os elementos de carbono e oxigênio, pelo método de três janelas e fenda de energia de 25 eV, utilizando a borda K em (544 eV) para o oxigênio e a borda K (em 303 eV) para o carbono. A preparação das amostras seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente para análise convencional de TEM.

3.11.13. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A morfologia das membranas foi também examinada por microscopia de força atômica, em um microscópio Nanosurf Flex AFM. As imagens foram obtidas operando o equipamento em modo de não-contato, usando uma ponteira Tap 190-AI-G, com constante de força 48 N/m e frequência de 190 kHz.

3.11.14. Potencial zeta (ζ)

O potencial ζ das AgNP-PVP e AgNP- β -CD foi determinado no equipamento Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As dispersões das AgNP foram diluídas 10 vezes com uma solução de 10^{-3} mol L⁻¹ de KCl e o potencial ζ foi medido em célula capilar com um caminho ótico de 10 mm.

3.11.15. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O diâmetro médio das AgNP-PVP e AgNP- β -CD e suas distribuições por intensidade de tamanho foram também determinados pela técnica de DLS, no mesmo equipamento Nano ZS Zetasizer, a um ângulo de detecção da luz espalhada fixo em 173°, e temperatura de 25 °C. O instrumento Nano ZS usa um laser operando em $\lambda = 633$ nm. As amostras foram diluídas em concentrações inferiores a 10^{-4} mol L⁻¹ e colocadas em cubeta de acrílico. As medidas apresentam uma precisão de 1% e podem ser obtidas de partículas com dimensões entre 2 nm a 3 μ m, dependendo do índice de refração, concentração e ângulo de espalhamento.

3.11.16. Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS)

A técnica analítica de ICP-MS foi utilizada para determinar a quantidade de íons prata lixiviada das membranas. A determinação foi realizada no equipamento ICP-MS (Elan RDC-e, PerkinElmer, Norwalk, CT, EUA) utilizando as condições de operação indicadas na Tabela 6.

Tabela 6. Condições operacionais das medidas de ICP-MS.

Parâmetros Operacionais	
Câmara de nebulização	Cyclonic
Nebulizador	Meinhard
Radiofrequência (RF) (W)	1240
Fluxo no nebulizador (argônio) (L min ⁻¹)	0,90-0,92
Fluxo auxiliar (L min ⁻¹)	1,1
Modo de varredura	Peak Hopping
Tempo de aquisição (ms)	50
Varredura/leitura	20
Integração do tempo (ms)	1000
Replicatas	5
Isótopo monitorado	¹⁰⁷ Ag ⁺

Para determinar a quantidade de íons prata, primeiramente foi utilizada uma solução estoque de AgNO₃ padrão, com concentração de 1000 mg L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (≥18,2 MΩ cm), obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). Foi empregado ácido nítrico sub-ebulição para preparação dos padrões e diluições das amostras.

As soluções de referência, contendo de 1,0 a 100,0 mg L⁻¹ de AgNO₃, foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de 1000 mg L⁻¹ de AgNO₃ e acidificada com ácido nítrico 0,2% (v/v). Esta solução de ácido nítrico 0,2% (v/v) foi utilizada como branco. Os frascos de polipropileno, vidrarias e utensílios, foram previamente limpos por imersão em solução de HNO₃ 10% (v/v), durante 24 h e lavados com água deionizada.

A determinação de íons prata foi realizada em dispersões contendo AgNP-PVP e AgNP- β -CD. O procedimento utilizado para obtenção das amostras está descrito no item 3.11.19. A quantidade de Ag⁺ lixiviada foi determinada por contato das membranas com água (volumes de 10 mL). As membranas avaliadas foram: MDCA0,5, MDCA2, MICA0,5, MICA2, MDPSf0,5, MDPSf2, MI1PSf0,5 e MI2PSf2. As soluções foram acidificadas com 0,2% (v/v) de ácido nítrico, armazenadas em frascos de polipropileno e analisadas por ICP-MS.

As membranas com 2,0% de AgNP foram ainda submetidas a outro teste para avaliar a quantidade de íon Ag⁺ lixiviada. Para isto, quatro volumes de 250 mL de água foram permeados através de membranas e 10 mL de cada volume de 250 mL foram analisados por ICP-MS. As soluções foram também acidificadas com 0,2% (v/v) de ácido nítrico, armazenadas em frascos falcon, e analisadas por ICP-MS.

3.11.17. Testes de fluxo de água das membranas de PSf e CA

Neste trabalho foi utilizado um sistema de permeação, produzido pela empresa QUALIMEC (Sumaré, SP, Brasil), que foi projetado para as medidas de fluxo de água das membranas desenvolvidas neste trabalho. O esquema e fotografia do sistema de permeação estão apresentados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

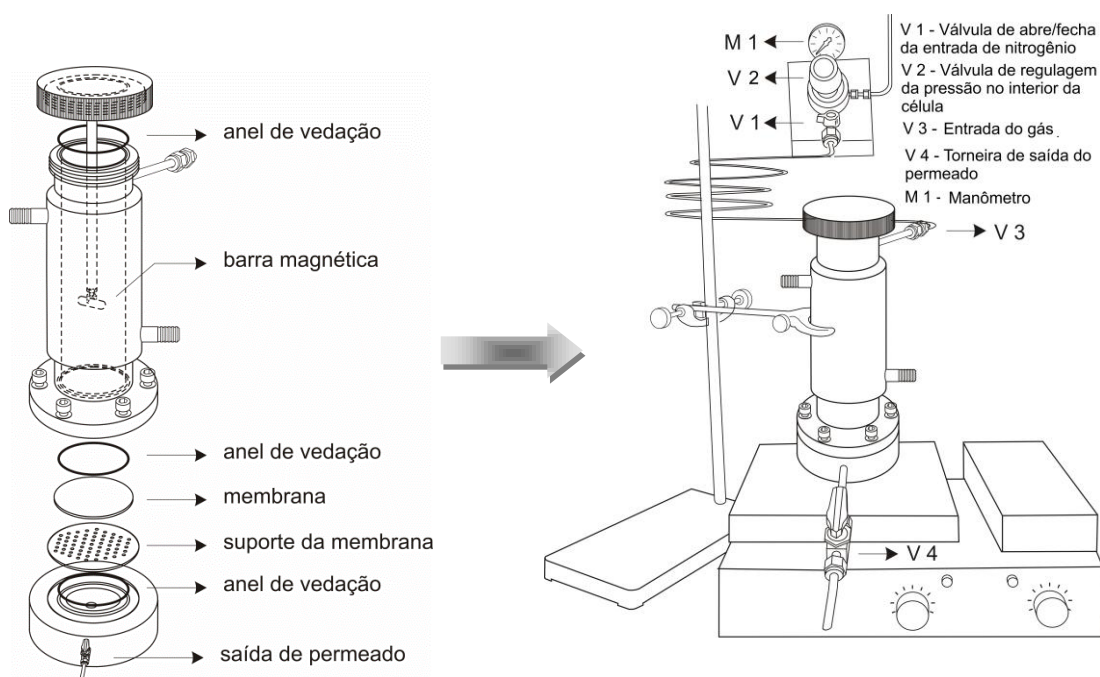


Figura 24. Esquema do sistema de permeação utilizado.

O sistema de permeação é constituído de um cilindro encamisado de diâmetro interno de 0,046 m e altura de 0,241 m, tendo capacidade de 0,300 L. A cela foi construída em aço inox e projetada para operar sob pressão máxima de 30 bar. A parte inferior do cilindro é formada por uma base, que contém uma saída para o permeado. Sobre a base é montado um suporte que serve de apoio ao disco de membrana, a qual tem área de permeação de 16,6 cm². Anéis de vedação são utilizados para impedir o vazamento de líquido. Abaixo da base é acoplado um agitador magnético (Cole Parmer), que promove a agitação da solução de alimentação. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e utilizando-se gás nitrogênio para pressurizar a solução de alimentação (água). O sistema de permeação também possui uma camisa de circulação de água para eventual controle de temperatura.

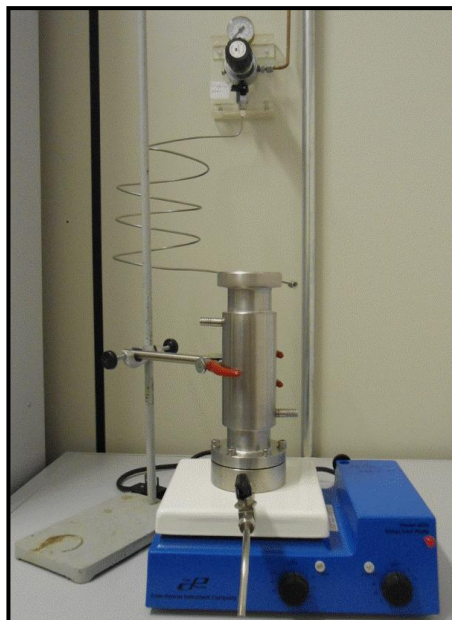


Figura 25. Fotografia do sistema de permeação.

3.11.17.1. Procedimento experimental

Foram realizados três ensaios de permeação para cada membrana, à temperatura ambiente (23 a 25 °C), utilizando-se 250 mL de água e velocidade de rotação do agitador magnético sobre a membrana de 300 rpm. Inicialmente, a pressão de entrada na cela foi mantida em 7 bar, para a maioria da membranas. Porém, foi necessário aumentar a pressão para 12 bar para membrana de PSf contendo AgNP e obtida pelo método de dispersão, uma vez que não foi possível medir o fluxo de permeado em 7 bar.

O volume do permeado foi registrado em intervalos regulares de tempo durante os ensaios. Já o tempo de ensaio foi definido em função do fluxo de permeado através da membrana, mantendo-se a medida até que fosse coletado um volume total de 100 mL de permeado.

3.11.17.2. Determinação do fluxo permeado

O fluxo permeado (J) é definido pelo volume permeado (V_p) que atravessa a área da membrana (A_p) em um determinado intervalo de tempo (t), segundo a equação (9).

$$J = \frac{V_p}{t \cdot A_p} \quad (9)$$

3.11.18. Determinação de prata lixiviada durante o ensaio microbiológico

Para determinar a quantidade de íons Ag^+ liberada pela membrana durante o ensaio microbiológico, as membranas de MDPSf2, MI1PSf2, MI2PSf2, MDCA2 e MICA2 foram cortadas em seções de dimensões 1 cm x 1 cm e esterilizadas. Erlenmeyers de vidro foram esterilizados e em cada um deles foram colocados 5 seções de cada uma das membranas e 10 mL de água deionizada. Em seguida, os erlenmeyers foram colocados em um *orbital shaker* (Incubadora tecnal TE-420), sob agitação de 150 rpm, a 37 °C por 12 horas. Após esse período, a água foi transferida para frasco falcon e tratada com ácido nítrico. A concentração de prata presente foi analisada por ICP-MS. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.11.19. Determinação de prata lixiviada durante o processo de filtração

Para avaliar o efeito de lixiviação da prata no processo de filtração, foi filtrado 1 L de água deionizada através das membranas de MPSf e MCA contendo 2% de nanopartículas de prata (MDPSf2, MI1PSf2, MI2PSf2, MDCA2 e MICA2), utilizando o mesmo sistema de permeação descrito anteriormente.

A solução alimentada foi agitada a 300 rpm e o permeado foi coletado, a cada 250 mL de água permeada, até completar um volume de 1 L. A concentração de prata das amostras coletadas foi determinada pela técnica de ICP-MS.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Este trabalho está dividido em três partes: i) preparação e caracterização das nanopartículas de prata estabilizadas com PVP e β -CD; ii) preparação e caracterização de membranas porosas de polissulfona e acetato de celulose com nanopartículas de prata e iii) avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata e das membranas de PSf e CA.

4.1. Caracterização de nanopartículas de prata estabilizadas com polivinilpirrolidona (AgNP-PVP)

O uso de PVP na preparação das AgNP-PVP é bem estabelecido na literatura e tem como finalidade gerar um complexo com o precursor (AgNO_3) capaz de controlar o crescimento e a aglomeração das AgNP e, ao mesmo tempo, estabilizar a suspensão dessas nanopartículas em meio líquido.

A espectroscopia na região do UV-vis foi utilizada para acompanhar a formação das AgNP-PVP, a qual foi indicada pelo surgimento de uma coloração verde-musgo da suspensão. As nanopartículas foram preparadas a partir de diferentes concentrações de precursor (AgNO_3), mas mantendo-se a razão mássica PVP/ AgNO_3 igual a 1,5. A Figura 26a apresenta o espectro de UV-vis do íon prata em solução. A existência de uma banda de absorção em 300 nm indica que o íon prata está coordenado com moléculas de água ($\text{H}_2\text{O}:\text{Ag}:\text{OH}_2$). O aparecimento das bandas plasmon em 430, 416 e 408 nm, como observado nas Figuras 26b, 26c e 26d, respectivamente, caracteriza a formação das AgNP-PVP esféricas. Foi observado no espectro de UV-vis das nanopartículas de prata, obtidas a partir da solução de AgNO_3 mais concentrada, a presença de uma cauda longa, como mostra a Figura 26d. Este resultado indica a formação de agregados de nanopartículas.

Além disso, é possível observar um aumento na intensidade de absorção da banda plasmon das AgNP-PVP em função do aumento da concentração de AgNO_3 ,

certamente devido ao aumento da quantidade de nanopartículas formadas. O deslocamento do máximo de absorção para menores comprimentos de ondas de 430, 416 e 408 nm, referente às diferentes concentrações de AgNO_3 . Foi calculada também a largura à meia altura a partir dos espectros de UV-vis e os valores obtidos foram 82 nm, 89 nm e 155 nm, para nanopartículas formadas a partir de solução de AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes dados indicam que o aumento da concentração de AgNO_3 promoveu a formação de nanopartículas de prata com diâmetro médio maior e faixa de distribuição de tamanho mais larga.

Dadosh [98] preparou AgNP a partir de diferentes concentrações de ácido tânico, utilizando a técnica de UV-vis para discutir o mecanismo de crescimento das AgNP, como também a morfologia resultante. O aparecimento da banda plasmon na faixa de 401 a 410 nm indicou a formação de partículas aproximadamente esféricas e o aumento na concentração de ácido tânico resultou no aumento do diâmetro médio das nanopartículas.

Endo e colaboradores [99] avaliaram a reação catalítica entre AgNP e peróxido de hidrogênio por espectroscopia UV-vis, usando AgNP estabilizadas por PVP. Foi observada a diminuição da intensidade da banda plasmon em 408 nm atribuída ao processo de oxidação da prata.

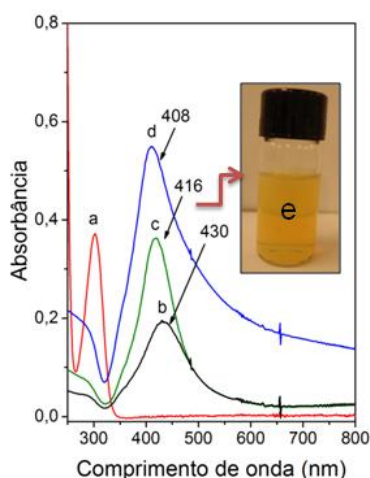


Figura 26. Espectros de UV-vis: (a) solução de AgNO_3 e AgNP-PVP obtidas a partir de soluções de AgNO_3 : (b) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (c) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. (e) Foto da dispersão coloidal de AgNP-PVP.

Os difratogramas de raios X das nanopartículas de prata formadas a partir de diferentes concentrações de AgNO_3 são mostrados na Figura 27. Os picos em $37,8^\circ$, $43,8^\circ$, $64,2^\circ$, $77,2^\circ$ e $81,5^\circ$ estão correlacionados com os planos cristalinos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) e (2 2 2), típicos da estrutura cúbica de face centrada da prata (JCPDS 04-0783). No entanto, pode-se observar no difratograma de raios X das nanopartículas formadas a partir de AgNO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, que os picos de difração são mais largos e menos intensos, quando comparados aos das nanopartículas formadas em concentrações de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Isto pode estar relacionado com a variação da organização estrutural dos átomos de prata.

A largura do pico de difração fornece informações importantes sobre o tamanho médio dos domínios com coerência cristalográfica (cristalito), calculado segundo a equação (10) de Scherrer [100]:

$$t = \frac{0,9\lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (10)$$

onde t é o tamanho médio dos domínios cristalinos e β é a largura a meia altura do pico de difração, normalmente medida em radianos, e λ é o comprimento de onda. Os resultados mostraram valores dos tamanhos médios para os cristalitos de 16,2 nm, 12,2 nm e 23,4 nm, para as nanopartículas preparadas a partir de soluções aquosas de AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Deivaraj e colaboradores [101] verificaram que a morfologia das AgNP, de estrutura cúbica de face centrada, depende da razão Ag^+/PVP . O difratograma de raios X exibiu picos similares aos observados neste trabalho, o que caracteriza a formação de nanopartículas de prata. Além disso, os autores mostraram que a interação entre AgNO_3 e PVP, utilizando piridina como solvente, resulta na formação de nanopartículas esféricas, nanobastões e nanoplacas triangulares, observadas após diferentes dias de armazenamento. Os autores explicam essas mudanças morfológicas com base no processo de envelhecimento de Ostwald, cuja hipótese é apoiada por duas observações: (a) variação progressiva da banda

plasmônica em aproximadamente 410 nm, o que indica a ocorrência de aglomerações das partículas antes do crescimento anisotrópico das mesmas; (b) crescimento das partículas, simultaneamente com a mudança na morfologia, o que está de acordo com as características conhecidas de maturação de Ostwald, pois as partículas maiores são formadas pela dissolução das partículas menores. No que diz respeito à mudança de morfologia, a mesma está relacionada com a cinética de adsorção e dessorção do PVP em diferentes planos cristalográficos das nanopartículas, conduzindo assim a um eventual desenvolvimento de uma geometria não esférica.

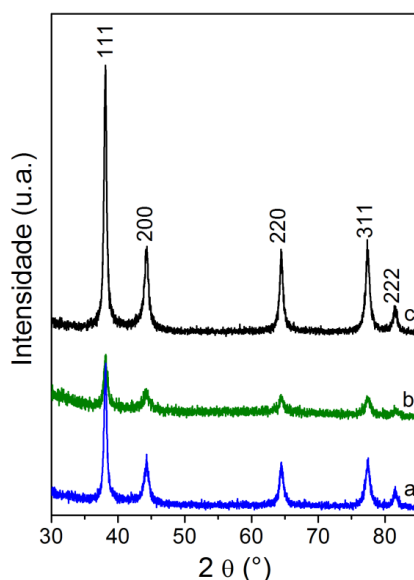


Figura 27. Difratogramas de raios X das AgNP obtidas a partir de diferentes concentrações de AgNO₃: (a) 0,01 mol L⁻¹, (b) 0,05 mol L⁻¹ e (c) 0,10 mol L⁻¹.

Para investigar a interação química entre PVP e AgNP, foram obtidos espectros de infravermelho do PVP puro e das AgNP, que estão exibidos na Figura 28. O espectro de infravermelho do PVP puro apresenta duas bandas principais em 1019 cm⁻¹ e 1667 cm⁻¹ que correspondem, respectivamente, às vibrações das ligações C-N e C=O; os deslocamentos nessas bandas indicam a formação do complexo de PVP/AgNP. Comparando-se os espectros, é possível observar a mudança na posição da banda em 1667 cm⁻¹, característica do PVP puro, para 1643 cm⁻¹, correspondente ao PVP associado às AgNP.

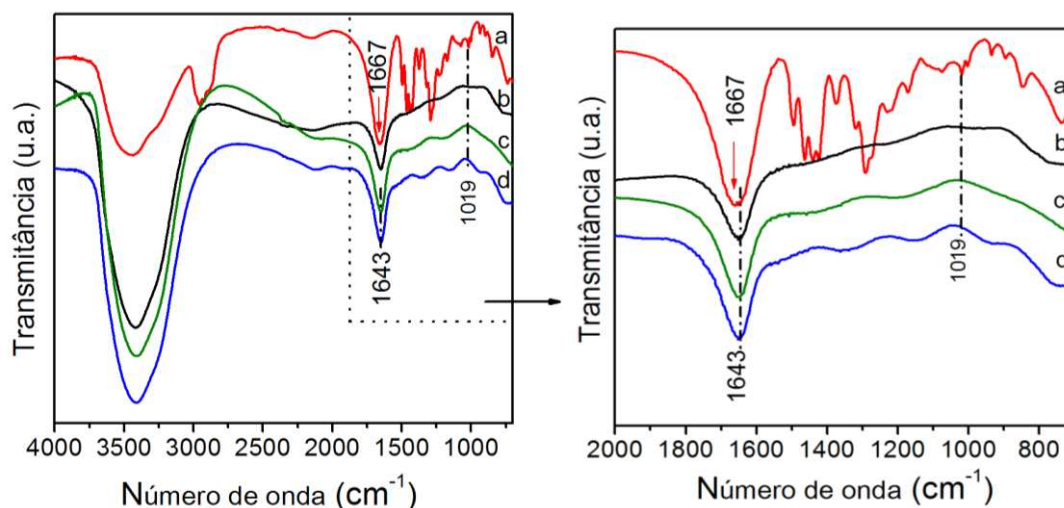


Figura 28. Espectros de FTIR do PVP puro (a) e das nanopartículas de prata obtidas a partir de diferentes concentrações de AgNO_3 : (b) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (c) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

O gráfico à direita é uma ampliação da região entre 700 e 2000 cm^{-1} , correspondente à região tracejada da curva à esquerda.

Este deslocamento da banda foi observado para todas as concentrações estudadas e sugere a formação do complexo de prata com o grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$), presente na estrutura do PVP. A Figura 29 representa a reação de formação das nanopartículas de prata estabilizadas com PVP, que foram preparadas neste trabalho. É representada a reação de óxido-redução envolvendo íons prata e glicose, bem como a formação do complexo de prata e PVP.

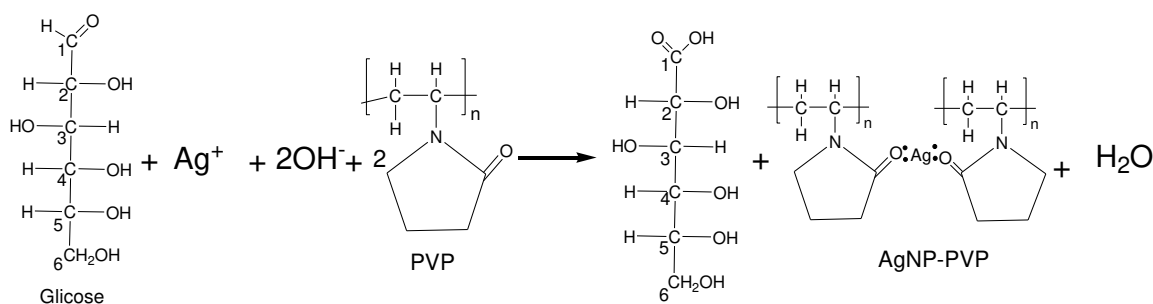


Figura 29. Esquema da reação de formação das AgNP-PVP.

Wang e colaboradores [94] estudaram o mecanismo de estabilização do PVP na preparação de AgNP (tamanhos menores que 50 nm) e propuseram a

coordenação entre o nitrogênio da estrutura do PVP e a superfície da prata, com base em resultados de infravermelho. Entretanto, para AgNP com tamanhos entre 500 e 1000 nm, foi atribuída a ocorrência de interações entre PVP e a superfície das nanopartículas, tanto com o nitrogênio como com o oxigênio das moléculas de PVP.

Sheikh e colaboradores [102] prepararam AgNP por exposição a raios γ . Neste caso, os resultados de espectroscopia indicaram a ocorrência de interação química entre o oxigênio da estrutura do PVP e a superfície das nanopartículas de prata, devido à mudança da banda referente à ligação C=O, em 1662 cm^{-1} para 1649 cm^{-1} , indicando a formação do complexo Ag/PVP.

Para investigar a morfologia, o tamanho e a distribuição de tamanho das AgNP-PVP foi utilizada a técnica de TEM. A Figura 30 mostra as imagens de TEM obtidas para as nanopartículas preparadas a partir de diferentes concentrações do precursor, mas mantendo-se a razão mássica PVP/AgNO₃ de 1,5. Observou-se que nessas condições de preparação é possível controlar a distribuição de tamanho, bem como a coalescência das nanopartículas. Dentre as condições investigadas, o uso de uma menor concentração de AgNO₃ permitiu obter AgNP-PVP mais uniformes em tamanho e mais dispersas (Figura 30a).

As imagens mostram que as nanopartículas obtidas apresentam morfologia aproximadamente esférica, com diâmetro médio de $56 \pm 8\text{ nm}$, $60 \pm 24\text{ nm}$ e $44 \pm 19\text{ nm}$, quando formadas a partir de concentrações de $0,01\text{ mol L}^{-1}$, $0,05\text{ mol L}^{-1}$ e $0,10\text{ mol L}^{-1}$ de AgNO₃, respectivamente. Comparando-se os resultados de TEM e UV-vis das nanopartículas formadas com concentração de $0,10\text{ mol L}^{-1}$ de AgNO₃, pode-se afirmar que a cauda longa observada no UV-vis corresponde à agregação das nanopartículas de prata e esta pode ser proveniente do processo de secagem durante a preparação da amostra para análise no TEM.

Wang e colaboradores [94] estudaram o efeito da concentração do PVP e da velocidade de adição de AgNO₃ no crescimento e na agregação das nanopartículas, concluindo que ambos interferem tanto na distribuição de tamanho como na agregação das mesmas.

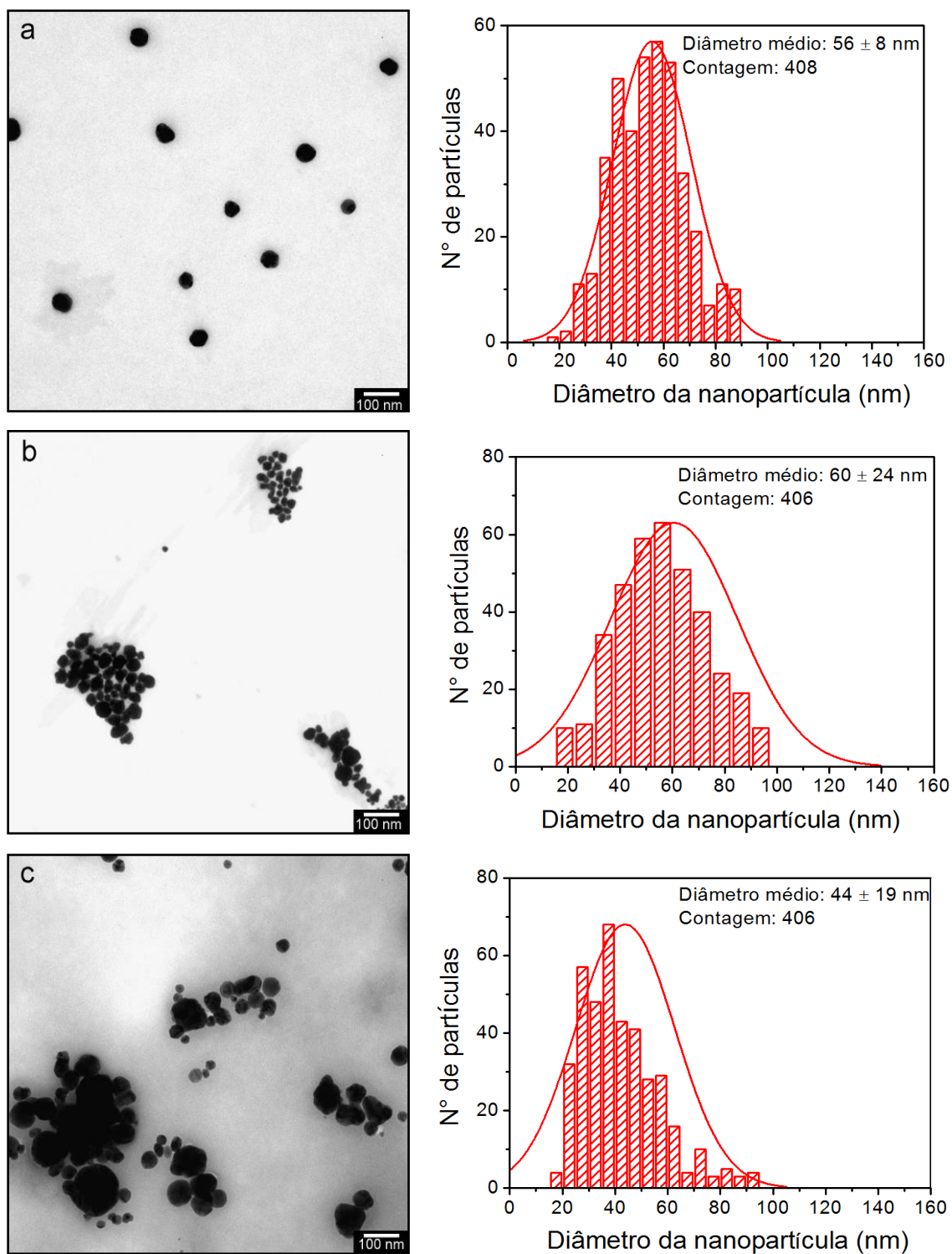


Figura 30. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de prata estabilizadas com PVP e seus respectivos histogramas, obtidos a partir de diferentes concentrações de AgNO_3 : (a) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (b) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (c) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. O software utilizado para contagem das nanopartículas de prata foi NIS-Elements Ar.

Luo e colaboradores [103] acompanharam a formação de AgNP, a partir de AgNO_3 e polietilenoglicol, utilizando a técnica de DRX, e observaram por TEM que o diâmetro médio das partículas é influenciado pela temperatura de preparação e concentração de precursor. Neste estudo, foi mantida a concentração de AgNO_3 constante e alterada a temperatura de 80 °C a 120 °C. Foi observado que o diâmetro médio das nanopartículas aumentou de 10 nm para 80 nm, com o aumento da temperatura, e que a morfologia mudou de esfera para nanoprisma.

He e colaboradores [104] obtiveram AgNP, utilizando o método de irradiação por micro-ondas, e investigaram o efeito dos estabilizantes (PVP e β -CD) e da concentração do precursor na formação das AgNP. Foi observado que o tamanho das partículas diminui com o aumento da concentração do estabilizante. Os autores concluíram que o PVP estabiliza melhor as nanopartículas pequenas em relação à β -CD.

Outro fator que deve ser considerado quando se analisa a distribuição de tamanho e a dispersão das AgNP é a ordem de adição do precursor. No trabalho desenvolvido por Kim e colaboradores [105], as AgNP foram preparadas por diferentes métodos. Foi verificado que o tamanho das AgNP depende da concentração de precursor, como também da ordem de adição dos componentes e do aquecimento da solução contendo a mistura do precursor, estabilizante (PVP) e agente redutor (etilenoglicol). Os resultados obtidos indicam que é possível controlar a taxa de nucleação das nanopartículas, onde o uso de menor temperatura de aquecimento origina nanopartículas de prata menores, devido à alta nucleação, enquanto que a adição do precursor na solução do estabilizante, mantida em maior temperatura, reduz a nucleação da prata, o que resulta na obtenção de nanopartículas com dimensões maiores e faixa estreita de distribuição de tamanho.

Comparando-se os resultados obtidos por DLS com os TEM obtidos neste trabalho, pode-se observar uma concordância entre os valores dos diâmetros médios das AgNP-PVP, preparadas com diferentes concentrações de AgNO_3 . A Figura 31 mostra a distribuição de tamanho das AgNP-PVP. Foram calculados os valores de largura à meia altura (*Full Width at Half Maximun - FWHM*) dos

espectros de DLS. Os resultados mostraram que as nanopartículas de prata formadas a partir das diferentes concentrações de AgNO_3 , ou seja, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, apresentaram valores de FWHM de 30, 78 e 65, respectivamente. Estes resultados corroboram com resultados de TEM, pois quanto menor a largura à meia altura, mais estreita é a distribuição de tamanhos.

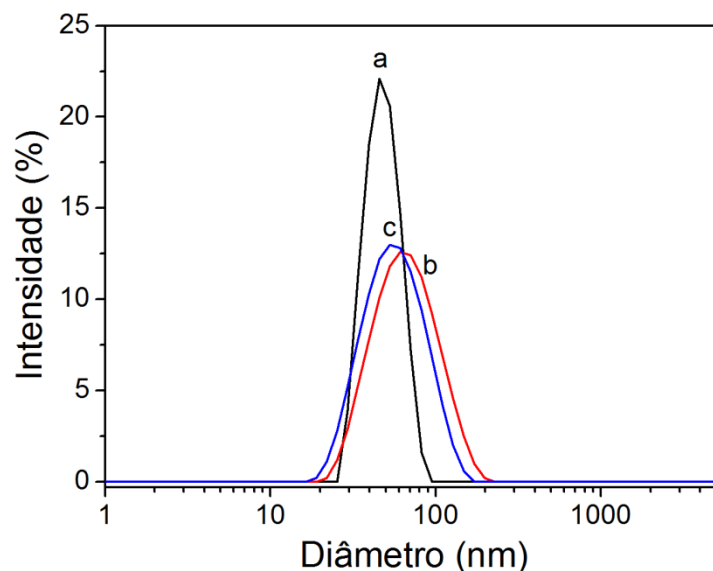


Figura 31. Espalhamento dinâmico de luz das AgNP-PVP obtidas a partir de diferentes concentrações de AgNO_3 : (a) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (b) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (c) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

O potencial ζ das AgNP-PVP foi avaliado para estimar a estabilidade das mesmas. O valor absoluto do potencial ζ é geralmente utilizado como um parâmetro indicativo da estabilidade do sistema coloidal. Em termos de potencial ζ , os valores mais elevados representam uma maior concentração de carga na superfície da partícula e, portanto, uma maior repulsão eletrostática entre as partículas, o que favorece a formação de uma suspensão coloidal estável. O potencial ζ obtido para AgNP-PVP a partir da concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 foi de $-30,6 \text{ mV}$. De acordo com a literatura, este valor está entre a região de instabilidade incipiente e estabilidade moderada [106]. Portanto, os valores de potencial ζ para as outras AgNP-PVP estão abaixo deste valor limite, o que pode

ser um indicativo da tendência de agregação dessas nanopartículas. Os valores dos diâmetros, polidispersidade e potencial ζ estão exibidos na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de diâmetro médio, índice de polidispersidade (PDI) e potencial ζ das AgNP-PVP.

Amostras	Concentração AgNO ₃ (mol L ⁻¹)	Diâmetro médio		PDI	Potencial ζ (mV)
		TEM	DLS (nm)		
AgNP-PVP	0,01	56±8	48,8	0,15	-30,6
AgNP-PVP	0,05	60±24	70,7	0,22	-15,7
AgNP-PVP	0,10	44±19	59,9	0,26	-21,1

Também foi investigada a influência do PVP no processo de estabilização das AgNP, no que se refere à distribuição de tamanho e à formação da camada de PVP em torno das nanopartículas de prata. Para isso, fixou-se a concentração de AgNO₃ (0,01 mol L⁻¹) e a razão mássica PVP/AgNO₃ foi alterada. As imagens de TEM, apresentadas na Figura 32, mostram que houve uma tendência de aumento na formação de agregados com o aumento da concentração de PVP (Figuras 32a, 32d e 32g). Os histogramas mostram a distribuição de diâmetro médio das AgNP-PVP (Figuras 32c, 32f e 32i). É possível observar que o diâmetro médio das nanopartículas não é alterado significativamente, exceto no caso das nanopartículas preparadas a partir da razão mássica PVP/AgNO₃ igual a 3,0, que apresentaram duas populações de diâmetros: 10 ± 5 nm e 51 ± 15 nm. As imagens de TEM de partículas únicas (Figuras 32b, 32e, 32h) mostram uma camada cinza envolvendo as nanopartículas. Essa camada corresponde ao estabilizante adsorvido (PVP). Em relação à espessura da camada de PVP, não foi observada uma mudança significativa. Os valores de espessura obtidos das imagens de TEM foram de $3,6 \pm 0,4$ nm; $4,6 \pm 0,7$ nm e $4,2 \pm 0,2$ nm, para as razões mássicas PVP/AgNO₃ de 1,5, 3,0 e 6,0, respectivamente. A espessura média da camada do

estabilizante em torno da nanopartículas foi calculada utilizando uma amostragem de 35 nanopartículas de prata.

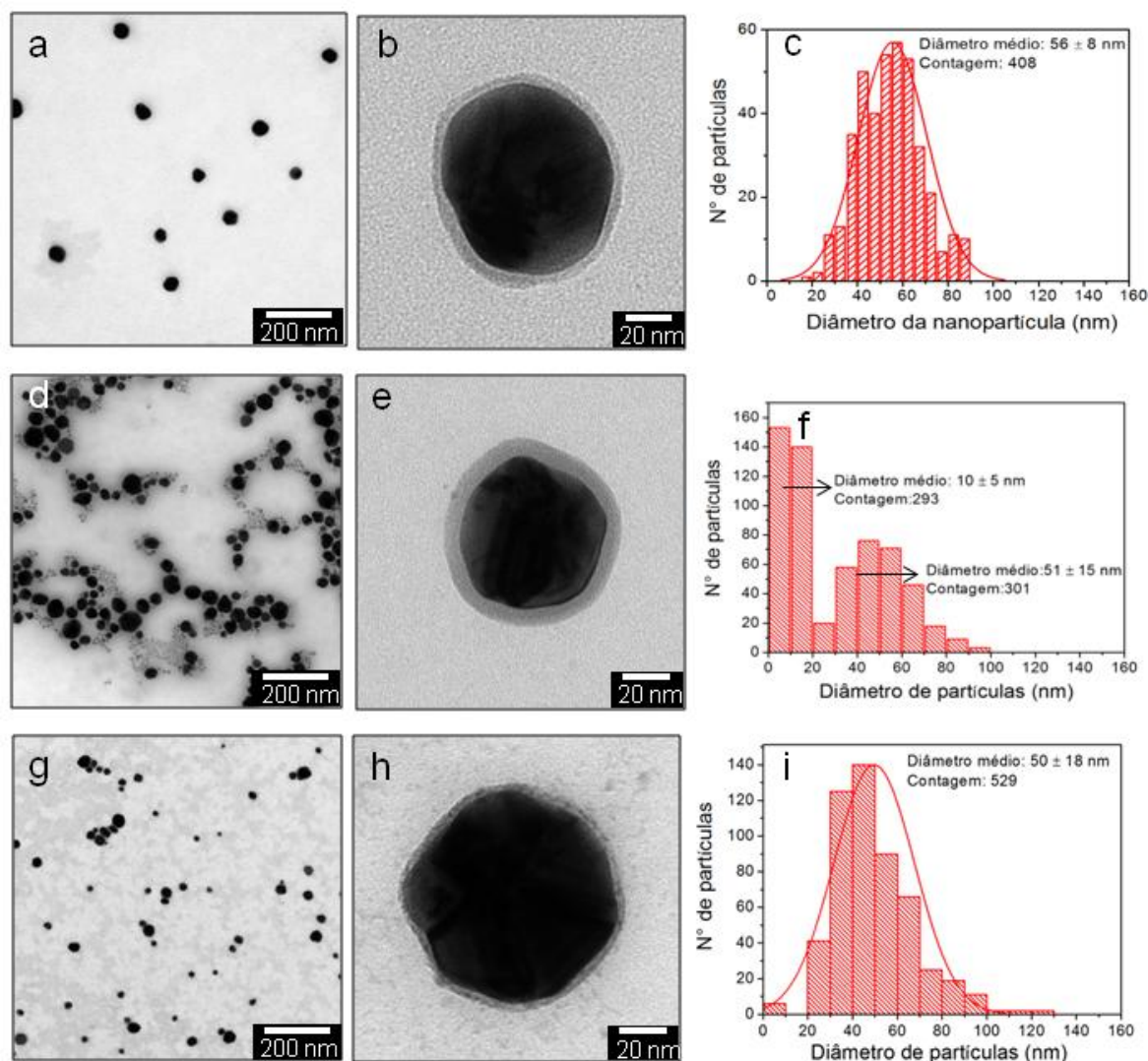


Figura 32. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de AgNP-PVP obtidas a partir de AgNO₃ de 0,01 mol L⁻¹ e diferentes razões mássicas PVP/AgNO₃: (a,b) 1,5; (d,e) 3,0, (g,h) 6,0. (c,f,i) Histogramas correspondentes.

No trabalho desenvolvido por Shin e colaboradores [107] foi investigado o mecanismo de crescimento de AgNP, obtidas por redução de AgNO₃ utilizando radiação γ e PVP como estabilizante. Neste estudo, os pesquisadores variaram a quantidade (de 0,2% a 5,0%) e massa molar do PVP (10.000, 55.000 e 130.000 g mol⁻¹). As AgNP foram investigadas pelas técnicas de TEM e FTIR. Os espectros

de FTIR mostraram que a intensidade relativa das bandas I_{1645}/I_{1680} , decresce com o aumento da massa molar de PVP. Isso ocorre porque as AgNP-PVP apresentam uma área superficial menor quando preparada com PVP de maior massa molar. Sendo assim, a quantidade de grupos imida adsorvida na superfície das AgNP-PVP é menor. As imagens de TEM exibiram AgNP-PVP apresentando uma faixa estreita de tamanho. Os pesquisadores sugeriram três etapas de crescimento das AgNP: a) os íons prata interagem com PVP; b) ocorre formação de nanopartículas primárias, a partir da redução da prata por radiação γ ; c) as nanopartículas primárias coalescem, ou podem interagir com as moléculas de PVP, formando agregados.

Dang e colaboradores [108] prepararam AgNP pelo método denominado poliol, utilizando PVP como estabilizante e etilenoglicol como solvente e agente redutor. Para estudar a influência do agente estabilizante no tamanho e distribuição das AgNP, diferentes concentrações de PVP foram utilizadas, mantendo-se a concentração de AgNO_3 constante. A formação das AgNP foi confirmada pelo aparecimento de bandas plasmônicas em 406 e 409 nm. As imagens de TEM mostram AgNP-PVP esféricas, com tamanhos nas faixas de 18-132 nm, 13-12 nm e 4-16 nm, para concentrações de PVP 0,001, 0,003 e 0,006 mol L⁻¹, respectivamente. Os autores concluíram que há um limite de concentração de PVP, para promover o crescimento das AgNP. Portanto, a concentração de PVP tem efeito sobre o tamanho das partículas e a agregação das mesmas.

Chou e colaboradores [109] prepararam nanopartículas de prata e investigaram o efeito de polivinilpirrolidona e poli(álcool vinílico) (PVA) na sua formação, utilizando formaldeído como agente redutor. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão revelaram nanopartículas de prata com forma esférica, com tamanhos entre 7 e 20 nm. A preparação das nanopartículas foi controlada pela razão molar PVP/ AgNO_3 e PVA/ AgNO_3 em solução, onde os valores mais adequados foram 9,27 e 3,37, respectivamente. Portanto, a maior concentração de PVP em relação à AgNO_3 tem um efeito de barreira para o crescimento das nanopartículas.

As morfologias das AgNP-PVP preparadas neste trabalho foram examinadas mais detalhadamente por TEM. A distribuição elementar da camada polimérica em torno das nanopartículas foi investigada pela técnica de espectroscopia de perda de energia de elétrons (EELS).

A Figura 33 apresenta a imagem de campo claro e a imagem filtrada correspondente das AgNP-PVP obtidas a partir das concentrações de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de solução aquosa de AgNO_3 e $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ de solução aquosa de PVP (razão mássica $\text{PVP}/\text{AgNO}_3=1,5$). A Figura 33a mostra que as nanopartículas obtidas apresentam morfologia aproximadamente esférica. Pode-se observar na Figura 33a uma região cinza claro ao redor das nanopartículas, atribuída à camada de PVP, com espessura de $3,6 \pm 0,4 \text{ nm}$. Observa-se na imagem de energia filtrada (Figura 33b) o contraste invertido desta camada em relação à imagem de campo claro, indicando que um número significativo de elétrons inelasticamente espalhados atravessa a amostra e, portanto, a amostra pode ser analisada pela técnica de imagem de espectroscopia de elétrons (ESI-TEM).

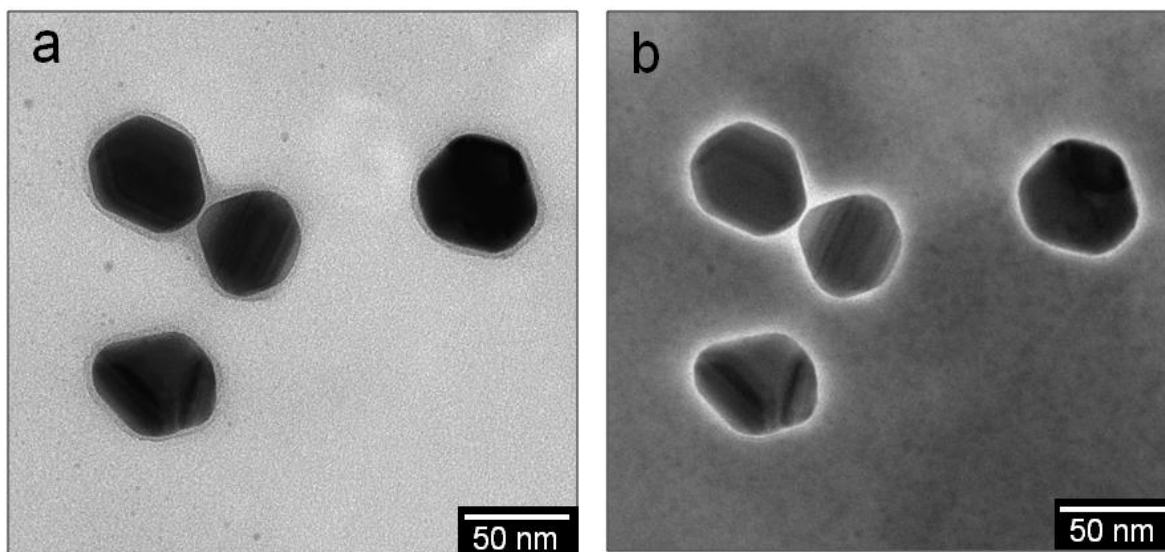


Figura 33. (a) Imagem de campo claro de AgNP-PVP e (b) imagem filtrada em energia de 25 eV.

Para confirmar a presença do PVP, os espectros de perda de energia de elétrons foram obtidos com uma fenda 25 eV selecionada nas energias 303 eV e 544 eV, correspondentes às energias de absorção de carbono e oxigênio, respectivamente, pois estes são os elementos presentes no polímero (Figuras 34a e 34b) e também na glicose, utilizada na preparação das nanopartículas.

Uma vez confirmada a presença desses elementos em torno das AgNP pelos espectros de perda de energia de elétrons, foi realizado mapeamento por ESI-TEM. A Figura 34c apresenta a imagem de campo claro de uma única nanopartícula de prata. O mapeamento de carbono, representado pela região azul na imagem da Figura 34d, mostra que esse elemento está distribuído de maneira uniforme ao redor da nanopartícula. Esta imagem sugere que o material acumulado ao redor da partícula é constituído pelo polímero, com a possível presença de glicose. O mapeamento de oxigênio (Figura 34e) também indica uma distribuição uniforme desse elemento, porém como há uma menor concentração desse elemento em relação ao carbono, a intensidade de sinal está reduzida. A presença de oxigênio na superfície das nanopartículas de prata e não ao seu redor, pode ser também interpretada pela formação de óxido de prata.

É importante destacar que a caracterização da camada de agente estabilizante ao redor de nanopartículas metálicas de AgNP, pela técnica de ESI acoplada ao TEM, não tem sido relatada na literatura. Assim, os resultados apresentados neste trabalho são inéditos e confirmam a formação de uma camada contínua e coesa ao redor das partículas.

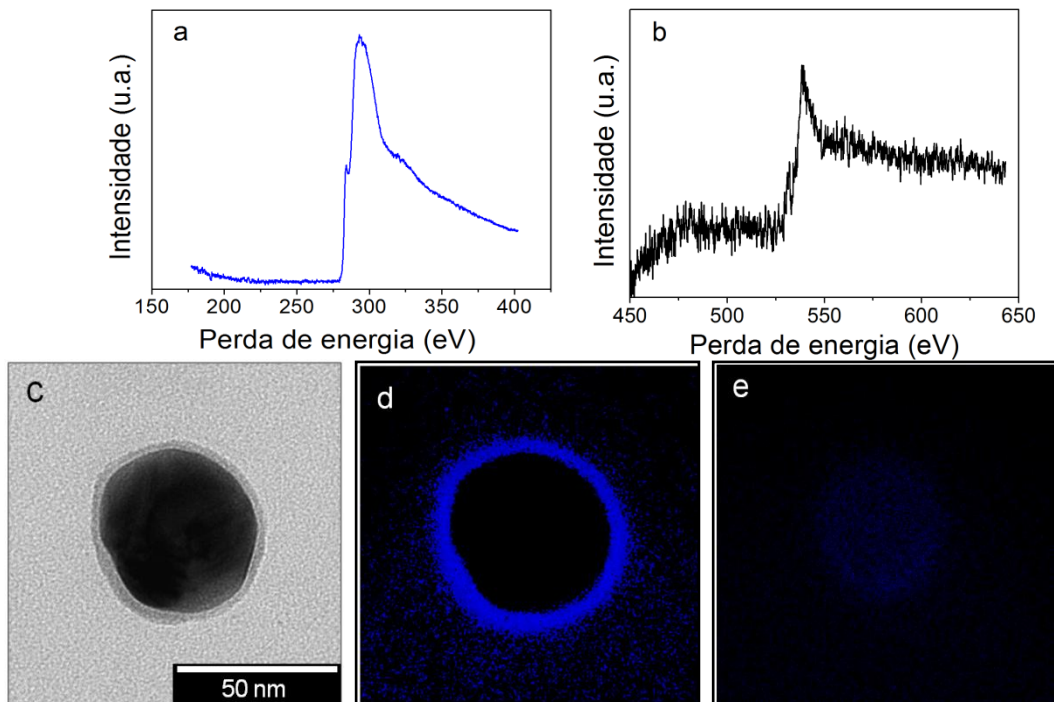


Figura 34. (a) e (b) Espectros de perda de energia de elétrons na região do carbono e oxigênio, respectivamente, (c) Imagem de campo claro de AgNP-PVP, (d) mapa elementar de carbono e (e) mapa elementar de oxigênio.

As propriedades térmicas das AgNP-PVP, obtidas a partir da concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 e razão mássica PVP/ AgNO_3 de 1,5, foram avaliadas por TGA e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 35. A Figura 35a apresenta a curva de perda de massa para o PVP puro. O primeiro estágio de perda de massa em 46°C está associado à água residual absorvida. Já o segundo, em 437°C , corresponde à degradação efetiva do PVP. Na Figura 35b são observados três principais estágios de degradação. O primeiro estágio de perda de massa, entre 140°C e 250°C , corresponde à cisão da ligação N-C=O na molécula do PVP [110]. Esta perda de massa também pode ser observada na curva de perda de massa do PVP puro, porém menos intensa devido à escala estar mais comprimida (Figura 35a). A segunda região, entre 300°C e 440°C , está associada à decomposição de grupos orgânicos residuais da 2-pirrolidona. A terceira região de perda de massa, entre 470°C e 750°C está relacionada à decomposição do complexo de PVP/Ag, formado pela coordenação da prata com o polímero.

Portanto, a estabilidade térmica do sistema foi pouco afetada pela complexação, provocando diminuição na temperatura inicial de degradação do polímero.

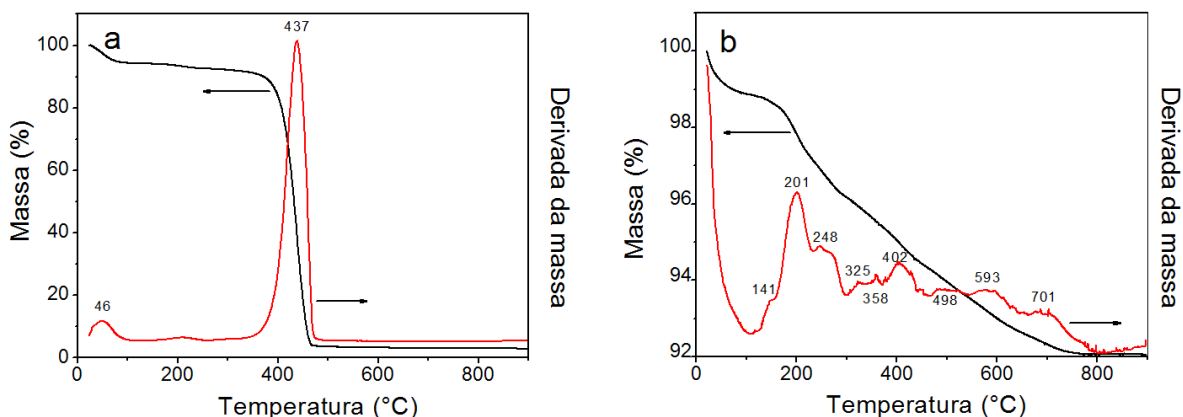


Figura 35. Curvas de perdas de massa e derivada da perda de massa (DTA) para: (a) PVP puro e (b) AgNP-PVP.

A presença de matéria orgânica nas AgNP-PVP foi confirmada por análise elementar. A quantidade total de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtida por esta análise foi de 5,9%. Esse resultado concorda com os obtidos por TGA para as AgNP-PVP, cuja porcentagem estimada de material orgânico foi de 7%.

4.2. Caracterização de nanopartículas de prata estabilizadas com β -ciclodextrina (AgNP- β -CD)

Com base nos resultados obtidos na preparação das AgNP-PVP, foram selecionadas as melhores condições experimentais para a preparação de AgNP- β -CD. Assim, AgNP- β -CD foram preparadas a partir da concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 e utilizando a razão mássica β -CD/ AgNO_3 igual a 1,5 e as razões molares $\text{NaOH}/\text{AgNO}_3$ e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6/\text{AgNO}_3$ iguais a 1,5 e 2,0, respectivamente.

A técnica de espectroscopia de UV-vis foi também utilizada para confirmar a formação de AgNP- β -CD. A Figura 36a apresenta o espectro de UV-Vis da β -CD, onde é possível verificar a ausência de qualquer banda de absorção para a solução da β -CD. Na Figura 36b é exibido o espectro de UV-vis da solução de AgNO_3 . Nota-se que a banda em torno de 300 nm está relacionada à interação de íons

prata com moléculas de água. Por outro lado, o aparecimento de uma banda em torno de 405 nm é atribuída à formação de AgNP- β -CD esféricas (Figura 36c).

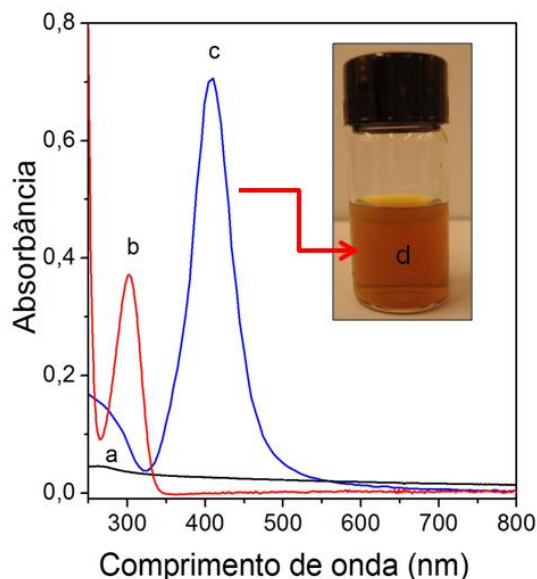


Figura 36. Espectros de UV-vis: (a) solução de β -CD; (b) solução de AgNO_3 e (c) AgNP- β -CD. Foto da dispersão coloidal de AgNP- β -CD (d).

George e colaboradores [111] sintetizaram AgNP reduzindo acetato de prata com dodecilamina em tolueno e estabilizada com β -ciclodextrina. Em seguida, a AgNP foi precipitada com etanol, dissolvida em hexano e novamente precipitada com metanol. Foi observada a mudança de coloração com o tempo de reação. Após 10 min de reação ocorreu o aparecimento da cor amarela na solução, após 30 min a solução mudou para marrom e após 8 h a solução final tornou-se marrom escuro. Essas mudanças foram acompanhadas por medidas de UV-vis, pelo aumento da intensidade da banda plasmônica em 413 nm. Os resultados de SEM mostram que não houve alterações no tamanho e forma das nanopartículas durante o processo de troca de solvente.

Gopalan e colaboradores [112] prepararam AgNP reduzindo nitrato de prata na presença de ácido ascórbico e usando β -CD como estabilizante. A formação de AgNP foi acompanhada por UV-vis e a morfologia foi investigada por TEM. No espectro de UV-vis da solução de AgNO_3 são observadas duas bandas na região de 190 a 300 nm, atribuídas à presença do íon prata. No entanto, no espectro de

UV-vis da dispersão coloidal de AgNP são observadas duas bandas: em 300 nm e em 400 nm. Este resultado mostra que ocorre a formação de AgNP, porém, parte dos íons prata não são reduzidos.

A estrutura cristalina da AgNP foi determinada por difração de raios X. Os difratogramas de raios X de AgNP e β -CD são mostrados na Figura 37. A β -ciclodextrina apresenta alto grau de cristalinidade, com picos principais de difração em 9,1°, 12,5°, 18,3° e 22° (Figura 37a). Nanopartículas de prata apresentaram picos em 37,8°, 43,8°, 64,2° 77,2° e 81,5° que estão correlacionados com os planos cristalinos (111), (200), (220), (311) e (222), típicos de prata cúbica de face centrada (JCPDS 04-0783). Pode ser observada a perda de cristalinidade da β -CD na presença de nanopartículas, confirmada pela presença de um halo na mesma região onde anteriormente apareciam os picos cristalinos da β -CD pura (Figura 37b). A partir da equação de Scherrer foi calculado também o tamanho médio dos domínios cristalinos para as AgNP- β -CD, preparadas a partir de soluções aquosas de AgNO_3 0,01 mol L⁻¹, o valor do tamanho médio para o cristalito foi de 28,6 nm.

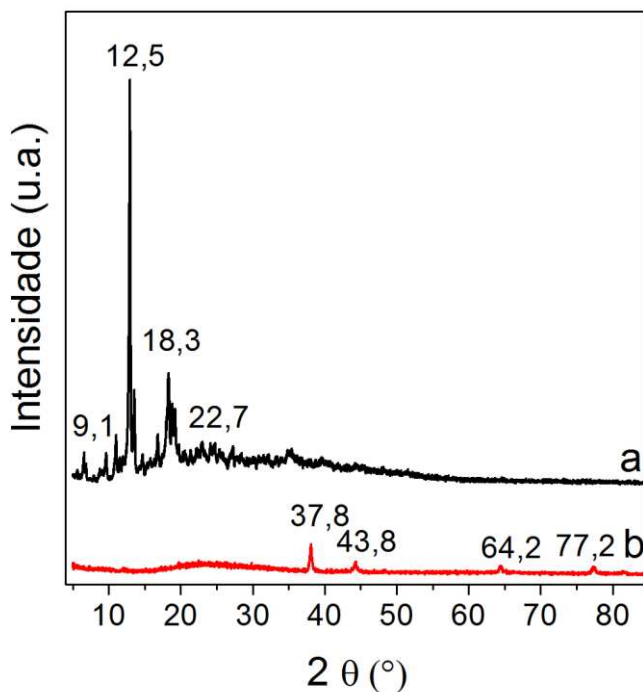


Figura 37. Difratogramas de raios X de: (a) β -CD e (b) AgNP- β -CD.

Gopalan e colaboradores [113] obtiveram AgNP usando β -CD como agente redutor e estabilizante, em solução aquosa alcalina. A formação, estrutura cristalina e morfologia das AgNP foram investigadas por UV-vis, DRX e TEM. A banda observada no espectro de UV-vis em 420 nm evidencia a formação de nanopartículas esféricas ou quase-esféricas. Esta morfologia foi confirmada por TEM. Os picos em 38° , $44,2^\circ$ e $64,3^\circ$, observados no difratograma das AgNP, são característicos de prata cúbica de fase centrada. O tamanho das AgNP foi determinado usando a equação de Debye-Scherrer e o valor obtido foi de 50 nm.

Para investigar a interação entre as moléculas de β -CD e as nanopartículas de prata foram obtidos espectros FTIR da β -CD pura e das AgNP- β -CD (Figura 38). As principais absorções das moléculas de β -CD correspondem aos estiramentos assimétricos dos grupos CH e CH₂ (ν C-H), na região de 2960 a 2850 cm⁻¹, ao estiramento assimétrico do C-O-C, em 1153 cm⁻¹, e ao estiramento assimétrico OH (C-OH e possíveis traços de água) em 3379 cm⁻¹. As bandas em 945 cm⁻¹ e 757 cm⁻¹ podem ser atribuídas à vibração do esqueleto envolvendo a ligação α 1-4 e a vibração do anel, respectivamente, enquanto que as bandas em 709 cm⁻¹ e 573 cm⁻¹ são atribuídas à vibração do anel glicopirranose. Por outro lado, a banda em 1645 cm⁻¹ é atribuída ao modo de vibração das moléculas de água adsorvida. Comparando os espectros de FTIR de AgNP- β -CD e β -CD é possível observar que as razões de intensidades entre a banda em 1029 cm⁻¹ e as bandas 942, 757, 709, 573 cm⁻¹ são diferentes. Este resultado sugere que houve uma desprotonação do grupo hidroxila, presente no anel da β -CD, causado pela interação com as nanopartículas. A banda em 1029 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento C-C e aos modos da ligação O-C-H somado ao da ligação C-C-H. Estes modos vibracionais não estão envolvidos diretamente nas moléculas presentes na superfície das nanopartículas [114].

O aparecimento da banda em 1385 cm⁻¹ pode ser atribuído à vibração tipo tesoura do CH₂OH. Schneider e colaboradores [115] apresentaram um modelo para explicar a diferença de reatividade do grupo OH da β -CD. Os grupos hidroxila secundários, presentes na face de maior diâmetro da ciclodextrina, formam ligações intramoleculares que envolvem os grupos OH ligados aos carbonos C2 e

C3 da molécula de glicose. Isto leva à formação de um “cinturão” de ligações de hidrogênio. Por outro lado, os grupos OH primários ligados ao carbono C6, presentes na face de menor diâmetro da ciclodextrina, não estão participando das ligações de hidrogênio, podendo rodar de modo a bloquear parcialmente a cavidade. Esta hipótese sugere uma maior exposição dos grupos OH ligados ao C6 ao ambiente químico. Os resultados obtidos indicam que houve uma quimissorção entre as moléculas de β -CD e as nanopartículas de prata, por coordenação com estas hidroxilas primárias [116].

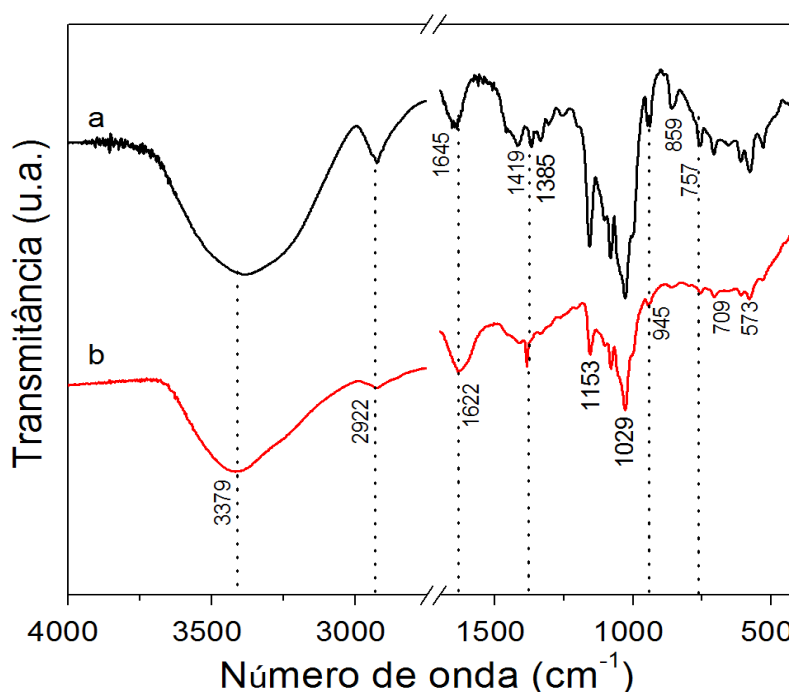


Figura 38. Espectros de infravermelho: (a) β -CD e (b) AgNP- β -CD.

A Figura 39 mostra os espectros de Raman de uma solução aquosa de β -CD (10^{-2} mol L⁻¹) e de AgNP- β -CD (concentração de β -CD igual a $3,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). As bandas em 1372 cm⁻¹ e 1388 cm⁻¹ são atribuídas à vibração C-H do tipo tesoura para AgNP- β -CD e β -CD, respectivamente. As bandas em 864 e 840 cm⁻¹ são atribuídas à vibração dos anéis de glicose. Além disso, as bandas em 636 e 604 cm⁻¹, observadas em ambos os espectros, são atribuídas à vibração fora do plano do grupo OH. A intensificação de sinal em 604 cm⁻¹, observado no espectro da AgNP- β -CD, pode indicar uma interação entre o grupo OH e a superfície AgNP. Por

outro lado, a banda em 488 cm^{-1} é atribuída à deformação do anel de glicose fora do plano. Os deslocamentos observados nos espectros podem estar associados aos diferentes ambientes químicos presentes. Assim, esta técnica é capaz de confirmar a modificação da superfície da AgNP. Outro ponto importante é a presença de β -CD não modificada, o que significa que β -CD agiu como um estabilizante de superfície e não atuou como um agente redutor dos íons prata, apesar β -CD ser formada por unidades de glicose. Estes resultados corroboram com os da literatura [117–119].

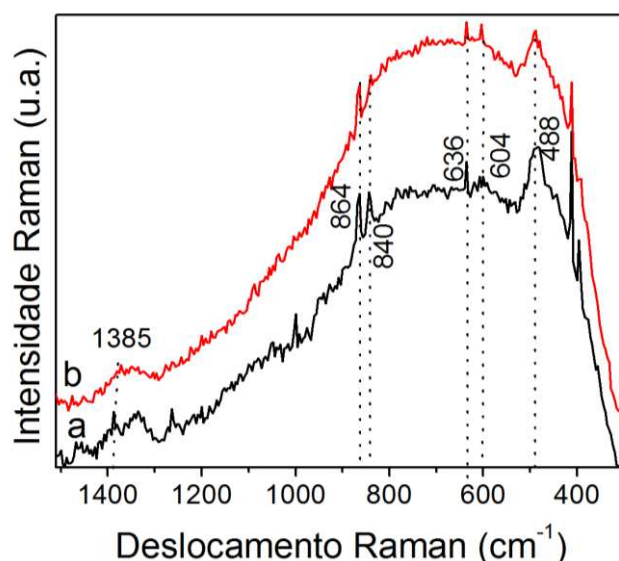


Figura 39. Espectros Raman: (a) solução aquosa de β -CD ($10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$) e (b) suspensão de AgNP- β -CD (concentração de β -CD igual a $3,2 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$).

O comportamento térmico das AgNP- β -CD e da β -CD pura foi avaliado por TGA e os resultados são mostrados na Figura 40.

Para a β -CD foram observadas duas etapas de degradação. A primeira etapa em $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ refere-se à volatilização da água de hidratação, correspondendo a 2,7 % na amostra analisada. A segunda etapa em $324\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponde à degradação da β -CD (Figura 40a). Para as AgNP- β -CD observam-se dois estágios de perda de massa (Figura 40b). O primeiro estágio em $314\text{ }^{\circ}\text{C}$ está associado à degradação das moléculas de β -CD livres, que ocorre a uma temperatura próxima à do composto puro. O segundo estágio de perda de massa em $794\text{ }^{\circ}\text{C}$ está

relacionado às moléculas de β -CD complexadas com a prata, por coordenação com os grupos hidroxila.

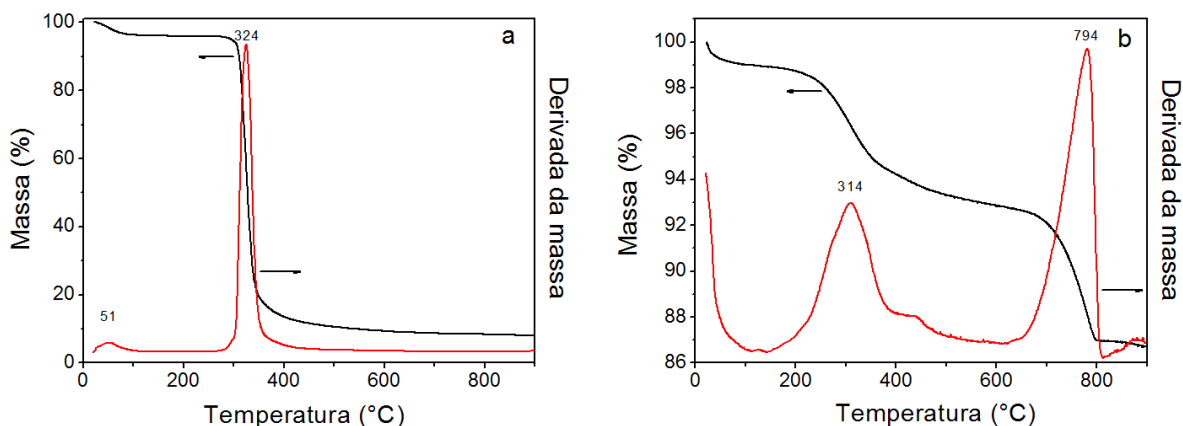


Figura 40. Curvas de perdas de massa (TG) e derivada da perda de massa (DTA) do: (a) β -CD e (b) AgNP- β -CD.

A presença de matéria orgânica nas AgNP- β -CD foi confirmada por análise elementar. A quantidade total de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtida por esta análise foi de 9%. Esse resultado é próximo ao obtido por TGA para AgNP-PVP, cuja a porcentagem de material orgânico estimada foi de 12%.

A morfologia e o tamanho das AgNP- β -CD foram investigadas por TEM. A micrografia das AgNP- β -CD mostrou nanopartículas de forma pseudo-esférica e distribuição relativamente estreita de tamanho, como pode ser verificado na Figura 41. As AgNP- β -CD apresentaram um diâmetro e um desvio padrão de $28,0 \pm 8,5$ nm, que foi determinado a partir do histograma.

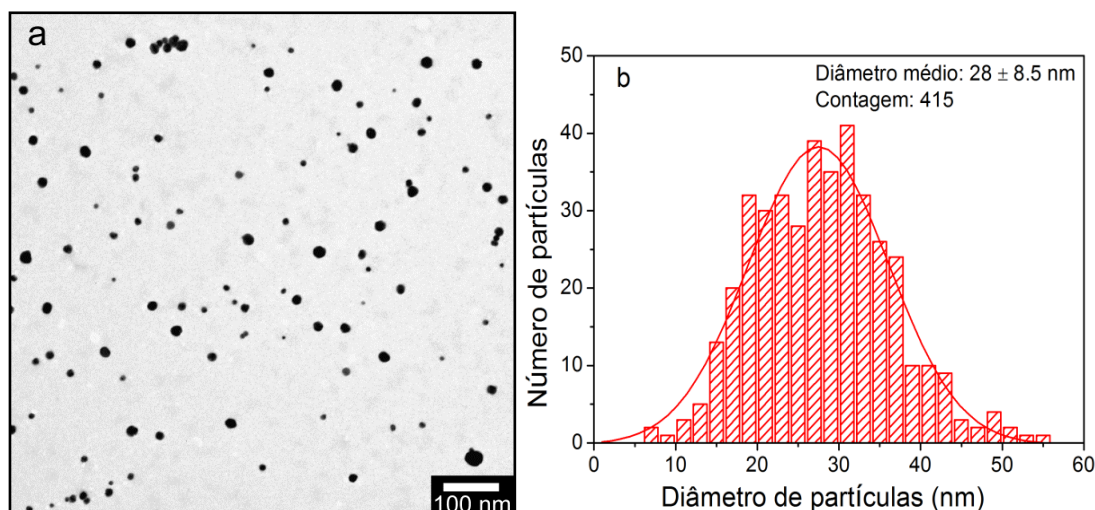


Figura 41. (a) Imagem de TEM e (b) histograma da distribuição de tamanho de AgNP- β -CD.

Para monitorar a distribuição de tamanho e o estado de agregação das AgNP- β -CD, foram também realizadas medidas de DLS. O valor de diâmetro médio obtido por DLS foi de 33 nm, enquanto que o diâmetro médio obtido a partir das imagens de TEM foi de 28 nm. Pode-se, portanto, considerar que os valores foram relativamente próximos. O potencial ζ obtido para estas nanopartículas foi de -30,1 mV. Como comentado anteriormente, a literatura considera este valor próximo ao limite entre instabilidade incipiente e estabilidade moderada de sistemas coloidais [106].

Foi também realizado o estudo da agregação das AgNP- β -CD durante o período de um mês. A Figura 42 representa os espectros de DLS em diferentes dias de estocagem. Foi observado que o diâmetro médio das nanopartículas variou em função do tempo de armazenamento. Após o período de um dia, 7 dias, 14 dias e 30 dias, os diâmetros médios foram de 33 nm, 38 nm, 50 nm e 62 nm, respectivamente. Os valores calculados de largura à meia altura foram de 38,3 nm, 47,1 nm, 50,1 nm e 79,5 nm, para as nanopartículas de prata armazenadas por 1 dia, 7 dias, 14 dias e 30 dias, respectivamente. Estes resultados mostram que o tempo de armazenamento tem influência no diâmetro médio e na distribuição de tamanho das nanopartículas, devido a uma tendência de agregação dessas partículas com o tempo.

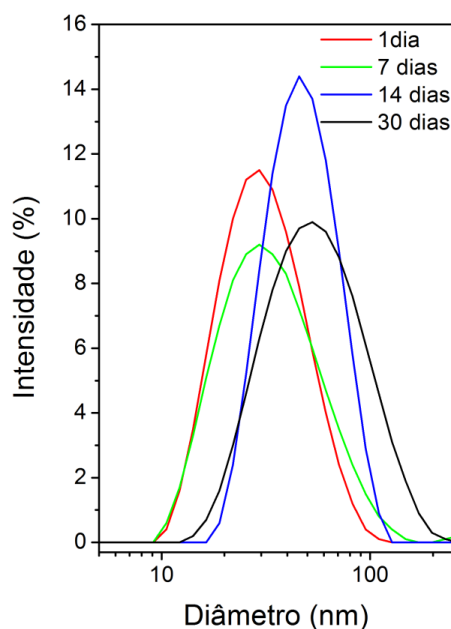


Figura 42. Diâmetro das AgNP- β -CD após diferentes dias de estocagem, obtidos por DLS.

O uso da técnica de ESI-TEM foi também importante para confirmar a presença da β -CD ao redor das AgNP. Neste caso, os espectros de perda de energia de elétrons foram obtidos com uma fenda de 25 eV selecionada nas energias de 333 eV e 544 eV, correspondentes às absorções características de carbono e oxigênio, respectivamente, que são os elementos presentes na β -CD (Figuras 43a e 43b).

Uma vez confirmada a presença destes elementos, foi realizado o mapeamento nestas regiões por ESI-TEM. A Figura 43c apresenta a imagem de campo claro de uma única nanopartícula de prata estabilizada por β -ciclodextrina. O mapa de carbono está representado por uma região verde em torno da nanopartícula e mostra que esse elemento está distribuído uniformemente ao seu redor (Figura 43d). O mapa de oxigênio é representado pela região vermelha no mapa correspondente e indica também distribuição uniforme desse elemento ao redor da AgNP (Figura 43e). Essas imagens permitem constatar que o material acumulado na superfície das nanopartículas é constituído principalmente por β -ciclodextrina.

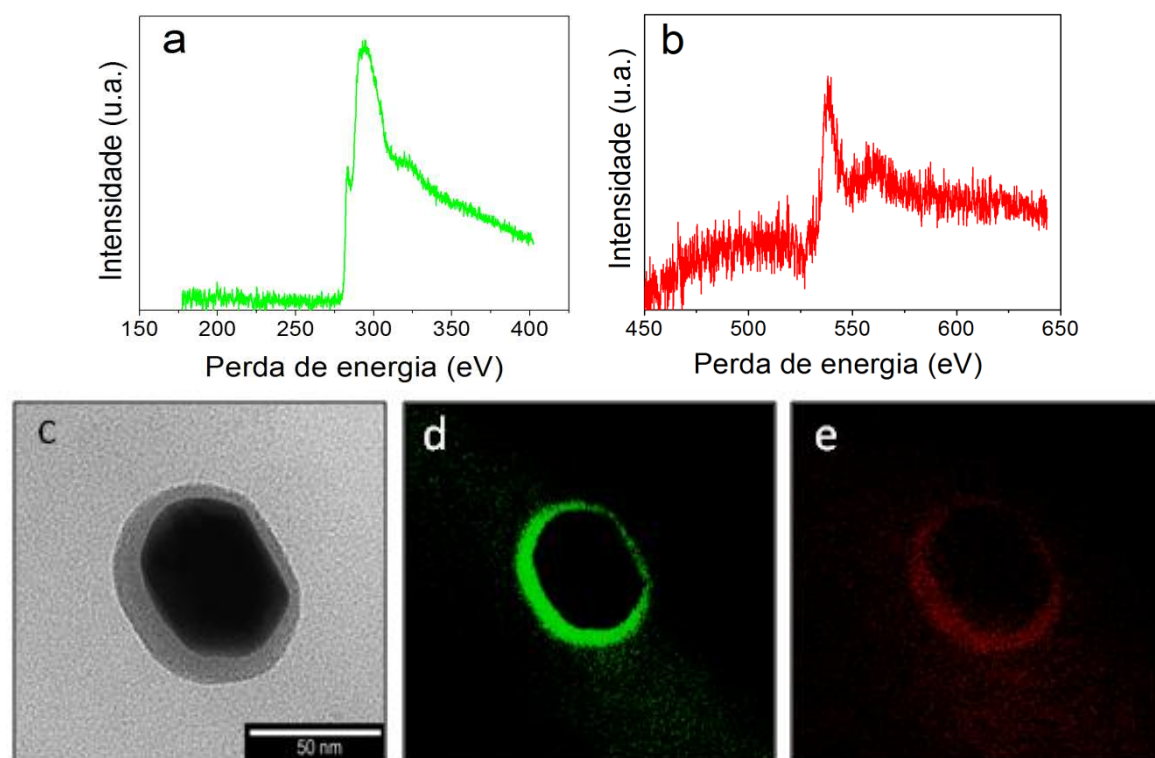


Figura 43. Espectros de perda de energia de elétrons do: (a) carbono e (b) oxigênio. (c) Imagem de campo claro de uma nanopartícula de AgNP- β -CD, (d) mapa elementar de carbono e (e) mapa elementar de oxigênio.

A imagem na Figura 44a também mostra uma região cinza ao redor da nanopartícula, atribuída à camada β -CD. Esta camada possui uma espessura que varia na faixa de 3 a 10 nm. A imagem 3D (Figura 44b), obtida por tomografia eletrônica, revela a distribuição espacial da camada β -CD em torno da partícula e confirma que esta técnica pode ser muito útil para caracterizar a morfologia das partículas estabilizadas em nanoescala. Esta imagem de tomografia 3D foi utilizada pela primeira vez para observar a morfologia das nanopartículas revestidas com este tipo de estabilizante.

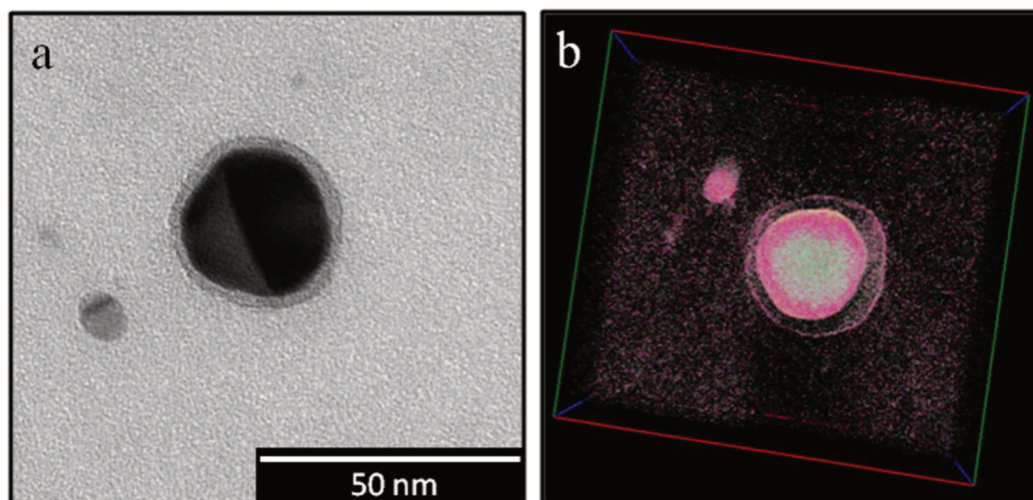


Figura 44. Imagens de ESI-TEM de uma nanopartícula de AgNP-β-CD: (a) Imagem de campo claro e (b) imagem obtida a partir da tomografia da mesma partícula.

De acordo com os resultados e discussões apresentados nesta parte da tese, é sugerido o seguinte esquema de formação das AgNP-β-CD [116] (Figura 45).

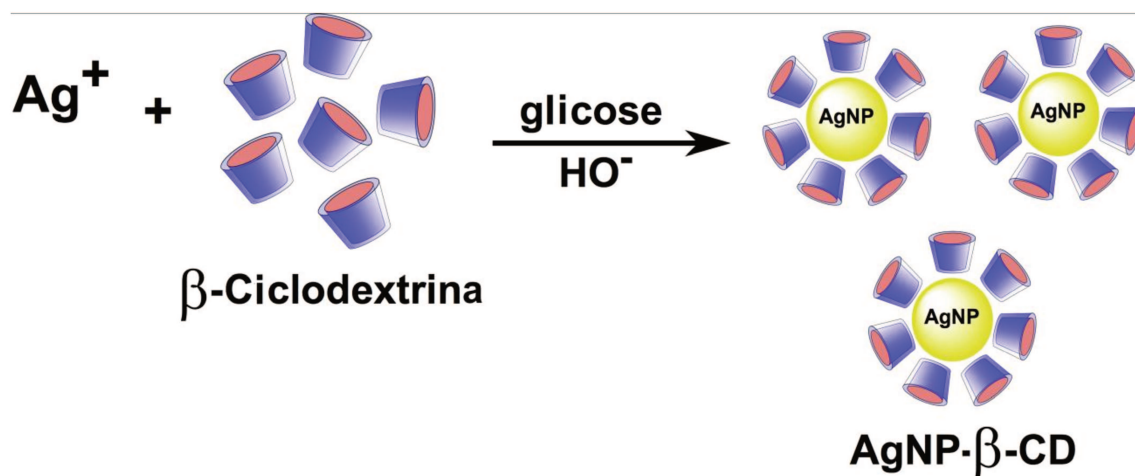


Figura 45. Esquema ilustrativo da formação das AgNP-β-CD.

4.3. Caracterização das membranas porosas de polissulfona com nanopartículas de prata

Nesta parte do trabalho, serão abordados os resultados referentes apenas às membranas de polissulfona contendo 2% de AgNP incorporadas à matriz polimérica e que foram preparadas utilizando diferentes métodos. Isto se deve ao fato de não terem sido observadas mudanças significativas em relação às membranas contendo 0,5% e 1,0% de AgNP. No entanto, os resultados de ângulo de contato e fluxo permeado serão apresentados para todas as membranas preparadas.

A Figura 46 mostra as fotos das membranas obtidas a partir dos diferentes métodos. É possível observar que a coloração das membranas muda em função do método empregado. Pode-se observar que a MPSf pura apresentou coloração branca (Figura 46a), enquanto que a membrana MDPSf2 apresentou uma coloração acinzentada (Figura 46b). No caso das membranas contendo AgNP preparadas *in situ*, foi observada uma tonalidade amarelo claro (Figura 46 c-d). Além disso, vale ressaltar que a incorporação da carga à matriz polimérica, bem como a formação da AgNP *in situ*, não resultou na formação de agregados de AgNP visíveis a olho nú.

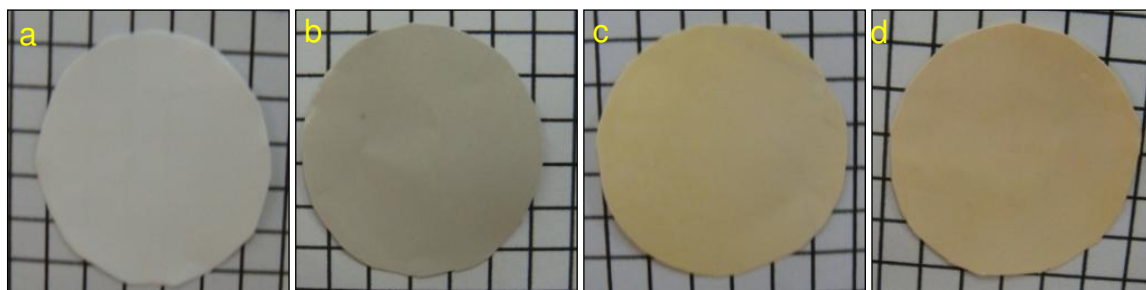


Figura 46. Imagens das membranas de polissulfona: (a) MPSf, (b) MDPSf2, (c) MI1PSf2 e (d) MI2PSf2.

A estrutura cristalina das AgNP-PVP incorporadas nas membranas foi determinada por difração de raios X. O difratograma de raios X das AgNP-PVP puras é mostrado na Figura 47a. Como já mencionado, os picos em 37,8°, 43,8°, 64,2°, 77,2° e 81,5° estão correlacionados com os planos cristalinos (1 1 1), (2 0 0),

(2 2 0), (3 1 1) e (2 2 2), típicos de prata de cela unitária cúbica de face centrada. Para o PVP puro foram observados dois picos largos em 11,4° e 21,8°, que são atribuídos à estrutura amorfa deste polímero (Figura 47b). A Figura 47c mostra o difratograma de raios X da MPSf, sendo o pico que aparece na região entre 17° e 30° atribuído ao halo amorfo da polissulfona. Para a membrana MDPSf2 foi possível observar picos em 37,8°, 43,8°, 64,2° e 77,2°, característicos das AgNP-PVP, além do halo amorfo da MPSf (Figura 47d). No entanto, nas membranas MI1PSf2 e MI2PSf2 não é possível observar os picos cristalinos relacionados à estrutura cristalina de AgNP-PVP (Figuras 47e e 47f), mas é evidente o pico referente à polissulfona em 18,0°, como também o pico em 21,8°, correspondente ao PVP. Além disso, este último pico aparece mais intenso na membrana MI2PSf2, o que sugere que a formação *in situ* de AgNP favoreceu a organização estrutural das cadeias de PVP.

Trabalhos desenvolvidos por Khanna e colaboradores [120,121], que prepararam nanocompósitos de polianilina/Ag e poli(álcool vinílico)/Ag e acompanharam a formação de nanopartículas de prata na membrana polimérica por DRX, mostraram a presença dos picos característicos das nanopartículas de prata na membrana polimérica.

Mollahosseini e colaboradores [122] estudaram o efeito do tamanho das AgNP nas membranas de polissulfona. A cristalinidade da membrana de PSf contendo AgNP foi investigada a partir da intensidade do pico de difração da membrana PSf na região entre 15° e 30°. Foi observado que membranas de PSf contendo AgNP, com diâmetro médio de 70 nm, apresentaram a mesma intensidade dos picos referentes ao PSf que a membrana de PSf pura. Entretanto, a membrana contendo AgNP, com diâmetro médio de 30 nm, mostrou um decréscimo na intensidade dos picos. Os autores concluíram que, dependendo do tamanho das nanopartículas, estas podem promover mudanças estruturais da PSf durante a etapa de formação da membrana.

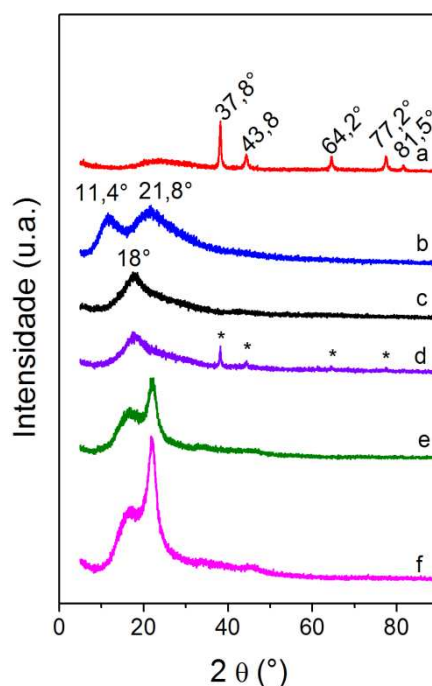


Figura 47. Difrátogramas de raios X: (a) AgNP-PVP, (b) PVP, (c) MPSf, (d) MDPSf2, (e) MI1PSf2 e (f) MI2PSf2.

Para confirmar a presença de AgNP-PVP nas membranas de PSf, foi utilizada também a técnica de espectroscopia de refletância difusa (DRS). A Figura 48 apresenta os espectros de UV-vis-DRS da MPSf e das membranas contendo AgNP. A banda plasmon centrada em 258 nm é característica da transição $\pi-\pi^*$ do anel benzênico presente na estrutura do polímero [123,124]. O surgimento das bandas centradas em 404 nm, 442 nm e 418 nm é devido à presença de AgNP nas membranas de MDPSf2, MI1PSf2 e MI2PSf, respectivamente. Estes resultados confirmam a presença das nanopartículas de prata na matriz. O deslocamento dessas bandas para região de maior energia, pode estar associada aos tamanhos e mudança na morfologia das AgNP-PVP formadas, uma vez que foram utilizados diferentes métodos de formação das AgNP na matriz polimérica. Para as membranas MDPSf2, as AgNP-PVP pré-formadas foram diretamente dispersas na matriz polimérica após solubilização do polímero, enquanto que nas membranas MI1PSf2 e MI2PSf2 a formação das mesmas ocorreu *in situ*.

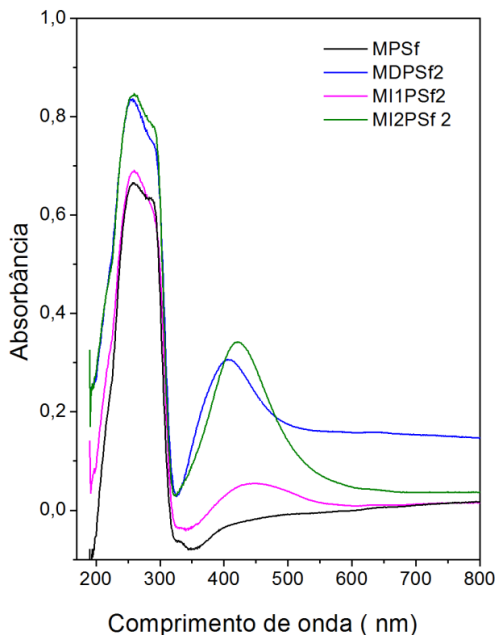


Figura 48. Espectros de UV-vis-DRS da membrana de PSf pura e das membranas com nanopartículas de prata.

As micrografias de FESEM das fraturas das membranas, bem como das suas superfícies em contato com o ar e com o substrato, estão apresentadas nas Figuras 49 e 50.

A morfologia das membranas MPSf e MDPSf2 estão apresentadas na Figura 49. É possível observar que a adição de nanopartículas de prata diretamente na matriz polimérica não causou alterações visíveis na morfologia característica das membranas, isso pode ser visualizado nas secções transversais das mesmas (Figura 49a e 49d). As membranas apresentaram estrutura porosa assimétrica, com uma camada superior densa e uma subcamada com poros na forma de canais alongados e, na sua superfície em contato com o substrato, a presença de microcavidades. Por outro lado, a forma e a distribuição das AgNP na matriz polimérica variou em função da metodologia de preparação. A Figura 49d mostra a morfologia da membrana MDPSf2. São observadas AgNP esféricas, com diâmetro médio de 45 nm, que estão distribuídas nos poros internos da membrana. No entanto, não são observadas partículas em concentração significativa sobre as superfícies superior e inferior da membrana (Figuras 49e e 49f).

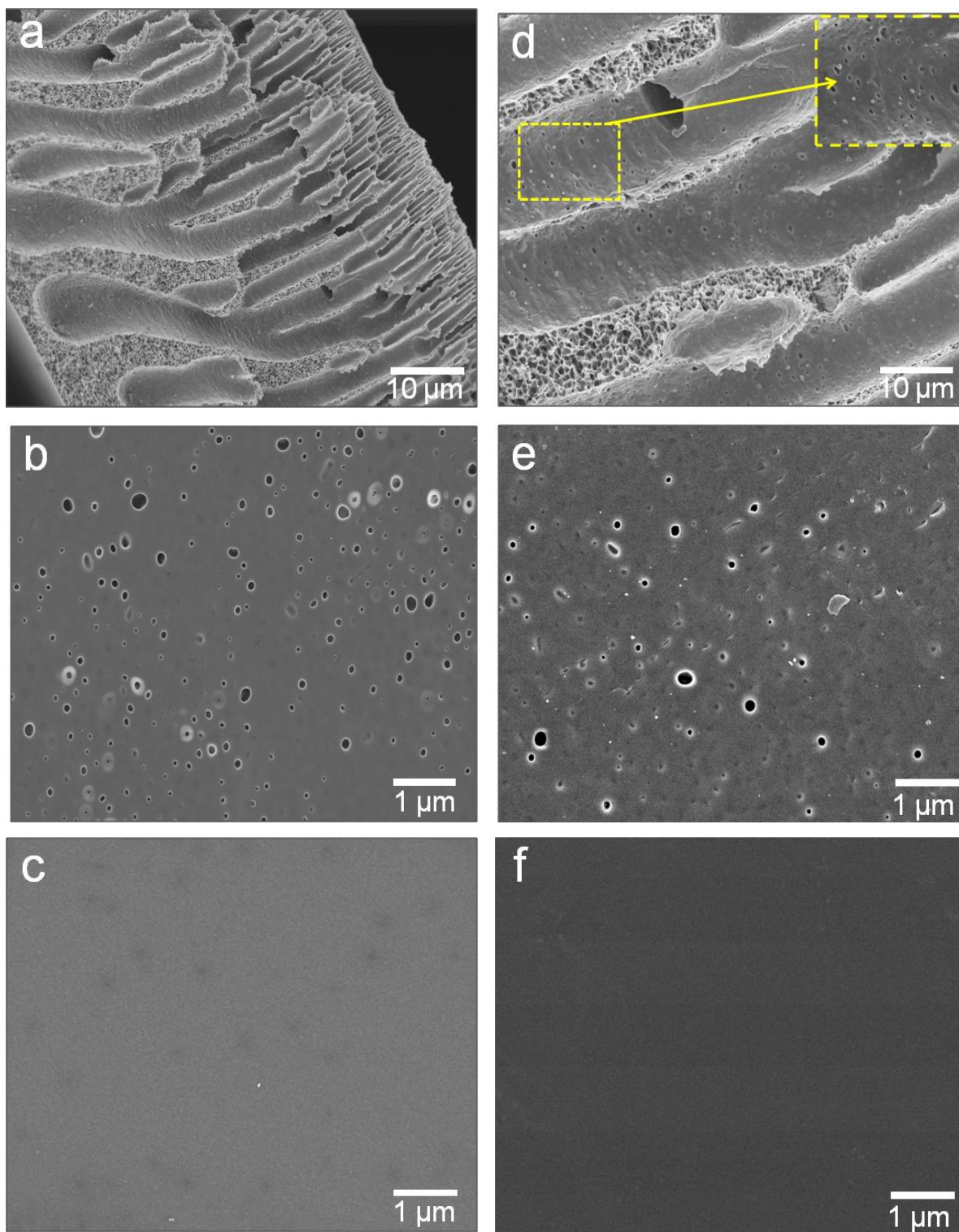


Figura 49. Imagens de FESEM: (a, b, c) MPSf e (d, e, f) MDPSf2. (a, d) Fratura, (b, e) superfície em contato com o substrato (c, f) superfície em contato com o ar.

Quando as AgNP foram formadas *in situ*, é possível observar mudanças na secção transversal e um aumento no tamanho dos poros da superfície em contato com o vidro (Figuras 50a e 50d). No caso da membrana MI2PSf2, além do aumento de tamanho dos poros, a morfologia da secção transversal apresentou canais no formato oval e poros maiores na região intercanais (Figura 50d). Este aumento no tamanho dos poros nas membranas preparadas *in situ* pode ser atribuído à lixiviação do PVP durante a formação da membrana, uma vez que o PVP é solúvel em água.

A morfologia das AgNP formadas na membrana MI1PSf2, pode ser observada nas Figuras 50b e 50c. Neste caso, as AgNP estão distribuídas principalmente em ambas as superfícies da membrana, não sendo observadas quantidades significativas de AgNP nos poros internos da membrana (Figura 50a). Além disso, a Figura 50b mostra que as AgNP são cúbicas, com comprimento de aresta médio de 38 nm.

A morfologia das AgNP presentes na membrana MI2PSf2 é representada nas Figuras 50e e 50f. As AgNP estão distribuídas nas superfícies da membrana e secção transversal (Figuras 50d, 50e e 50f), porém, quando comparadas com as AgNP presentes na membrana MI1PSf2, estas apresentam morfologia esférica, com diâmetro médio de 55 nm. Estes resultados estão relacionados com o método de preparação das AgNP. Na Figura 50d observa-se a formação de poros uniformes e interconectados, como também a presença de AgNP nos poros internos da membrana. Para as membranas obtidas pelos diferentes métodos é evidente a boa adesão da interface polímero/AgNP.

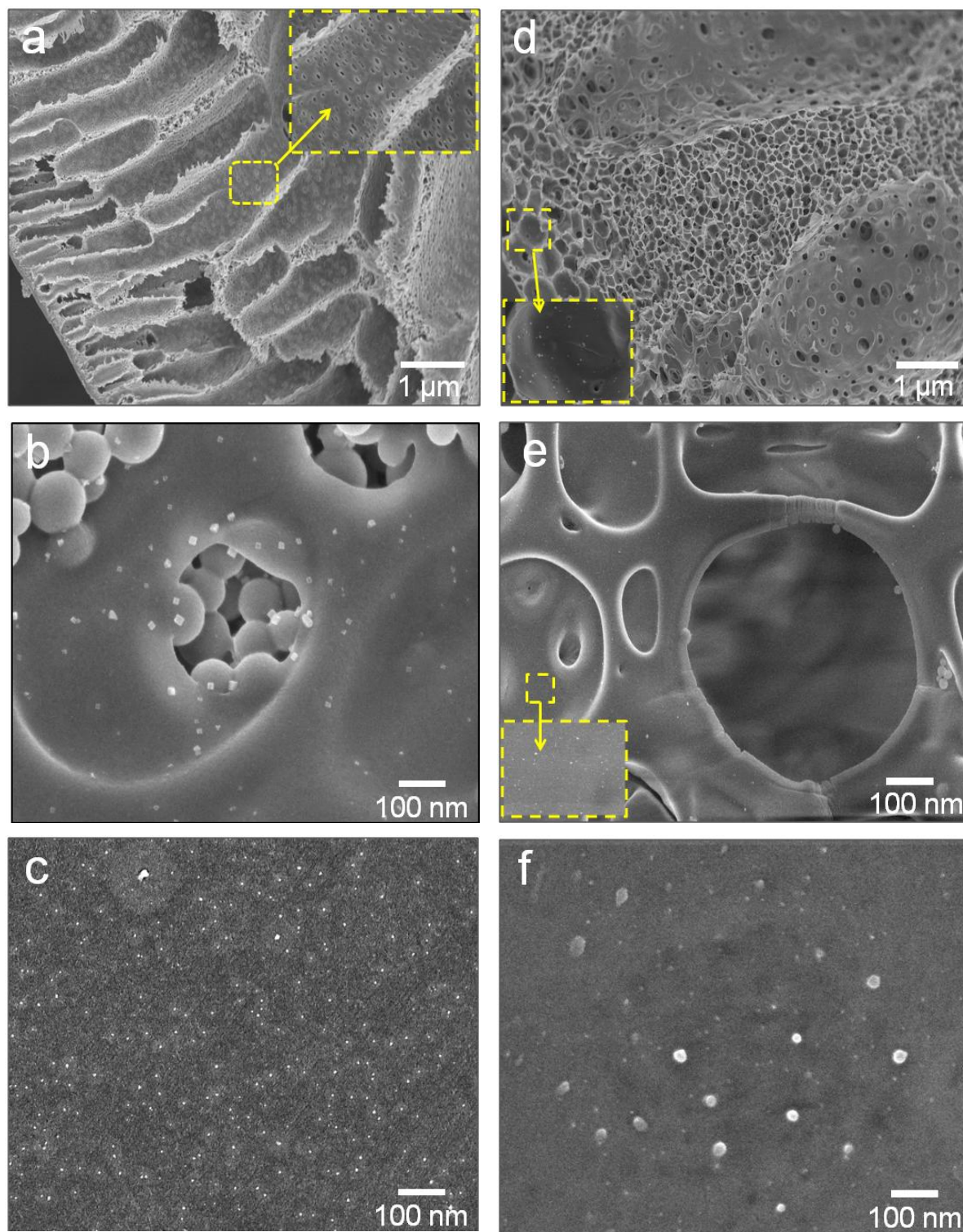


Figura 50. Imagens de FESEM: (a, b, c) MI1PSf2 e (d, e, f) MI2PSf2. (a, d) Fratura, (b, e) superfície em contato com o substrato e (c, f) superfície em contato com o ar.

Basri e colaboradores [95] prepararam membranas de poliétersulfona (PES) com nanopartículas de prata. Os nanocompósitos de PES/AgNP foram preparados por inversão de fases, variando-se o solvente, a massa molar de PVP e a concentração de nitrato de prata. A formação das AgNP foi estudada por FESEM e os resultados mostraram boa distribuição das AgNP nas membranas obtidas com 12% em massa de AgNO_3 em relação ao polímero e PVP de massa molar $360.000 \text{ g mol}^{-1}$. A distribuição uniforme das AgNP na membrana de PES resultou na inibição do crescimento da bactéria *E. coli* em 100%.

Vatanpour e colaboradores [125] prepararam membranas poliméricas de polietersulfona contendo TiO_2 por inversão de fases e investigaram o efeito do tamanho das nanopartículas de TiO_2 , bem como as suas diferentes formas cristalinas: rutilo e anatase. A concentração de TiO_2 variou entre 1 e 4% em relação ao polímero. Foi determinado um alto valor de porosidade (70-80%) para todas as membranas aditivadas, porém não houve um aumento significativo em relação à membrana pura. Os autores atribuem o resultado obtido à baixa concentração de polímero e de PVP adicionado.

O interesse em obter membranas com boa distribuição de AgNP tem sido o principal foco de trabalhos desenvolvidos na área. Recentemente, Cao e colaboradores [126] obtiveram AgNP estabilizadas com vitamina C, que foram imobilizadas em membrana sulfonada de poliétersulfona. As imagens de microscopia exibem AgNP com diâmetro médio de 45 nm, com boa distribuição na membrana. Os resultados obtidos indicam que a liberação dos íons prata pela membrana pode ocorrer gradualmente, o que permite um tempo de ação antimicrobiano mais prolongado. Além disso, os compósitos apresentam boa compatibilidade celular e nível de citotoxicidade dentro da faixa de segurança do padrão de avaliação.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a adição de AgNP ou formação *in situ* em membranas de polissulfona pode alterar a porosidade das membranas obtidas. Como resultado, o fluxo de água através das membranas pode variar.

Para investigar a distribuição das AgNP nos poros da secção transversal das membranas foi também utilizada a técnica de TEM. As imagens de TEM estão apresentadas na Figura 51. A Figura 51a mostra a MPSf, onde pode-se observar a presença de macroporos correspondentes às regiões claras. Foi possível observar também uma morfologia na forma de canais alongados com as AgNP-PVP distribuídas nos poros da membrana MDPSf2 (indicadas por setas na Figura 51b). A presença das AgNP nos poros das membranas MI1PSf2 e MI2PSf2 foi confirmada por TEM, uma vez que não foram observadas claramente por FESEM. A Figura 51c apresenta a secção transversal da membrana MI1PSf2 e a Figura 51d a imagem ampliada da mesma. É possível observar a presença de AgNP distribuídas na matriz ao redor dos poros (Figura 51d). O mesmo resultado foi observado para membrana MI2PSf2 (Figura 51e).

No estudo desenvolvido por Taurozzi e colaboradores [78] foram preparadas membranas com AgNP utilizando três métodos, onde foram alteradas as condições de preparação, tais como: modificação da temperatura do banho, composição do solvente e adição de agentes para promover a formação dos poros. Foram observadas mudanças nas seções transversais, resultando na formação de canais mais alargados, quando foi utilizado o polietilenoglicol como agente para formação dos poros. Quando foi utilizado 2-propanol para a mesma finalidade, foram observados pequenos poros na parte filtrante que foram aumentados de tamanho ao longo da secção transversal até a formação de macroporos. Apesar da utilização de diferentes condições de preparação das membranas contendo nanopartículas de prata, não foi observada a formação de nanopartículas de prata com morfologias diferentes.

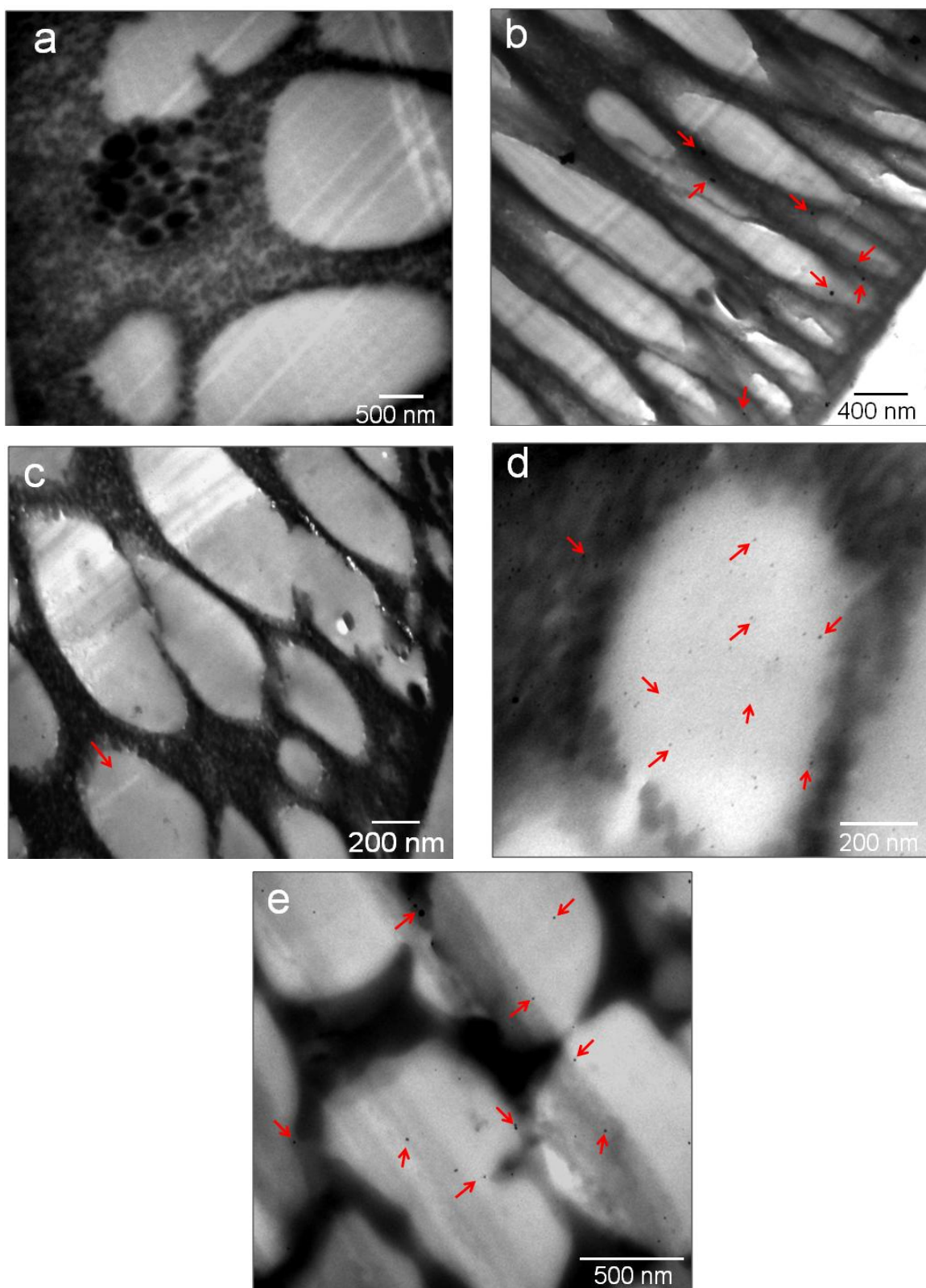


Figura 51. Imagens de TEM: (a) MPSf, (b) MDPSf2, (c,d) MI1PSf2 e (e) MI2PSf2.

A partir dos resultados obtidos por FESEM e TEM, pode-se inferir que as membranas preparadas por dispersão das nanopartículas não apresentaram mudanças significativas na morfologia da secção transversal, enquanto que as membranas preparadas por formação de nanopartículas *in situ* apresentaram alterações de porosidade. Entretanto, os diferentes métodos promoveram mudanças de forma, tamanho e distribuição das AgNP. A Figura 52 mostra de forma ilustrativa as diferenças observadas. Para as membranas MDPSf2 e MI1PSf2, obteve-se morfologia na forma de canais mais alargados, em relação à MPSf e as nanopartículas apresentaram morfologias diferentes: esferas, no caso da MDPSf2 e nanocubos, para a MI1PSf2. No entanto, a membrana MI2PSf2 apresentou canais na forma oval, com sua camada superior esponjosa e nanopartículas esféricas distribuídas ao longo dos poros [78].

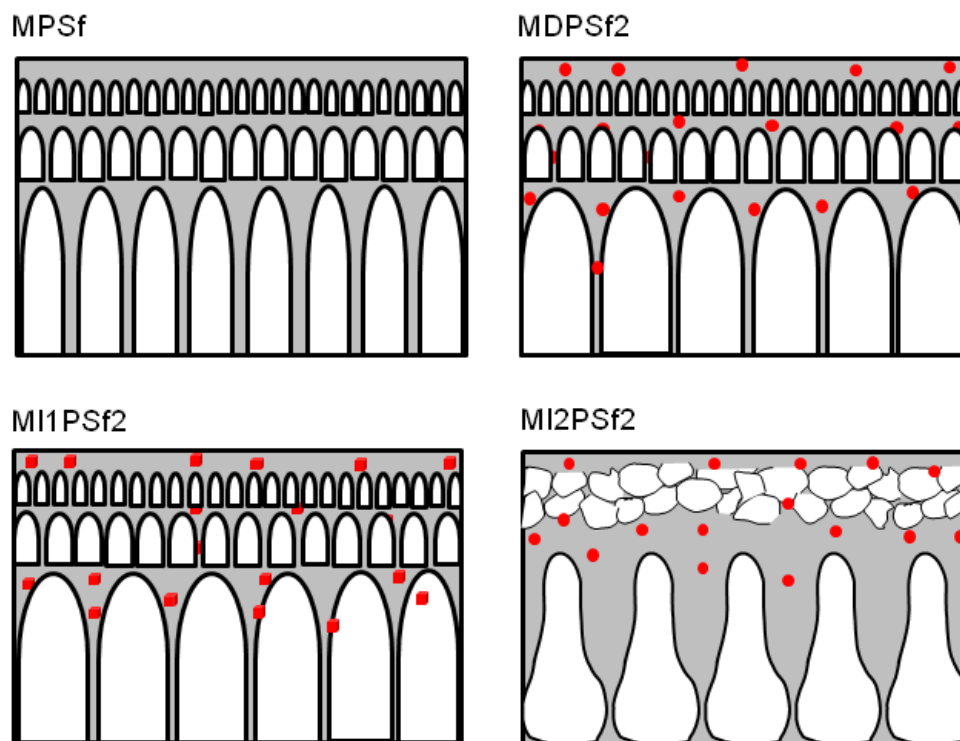


Figura 52. Esquema ilustrativo das secções transversais e da distribuição de nanopartículas de prata (partículas vermelhas) nas membranas preparadas.

A Figura 53 apresenta as curvas de DSC obtidas durante o segundo aquecimento para membranas de PSf e membranas contendo AgNP. Foi

observado que a incorporação de 2% de nanopartículas de prata nas membranas de polissulfona alterou a temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero, o que pode estar associado aos diferentes métodos utilizados para a incorporação das AgNP na matriz polimérica. As duas membranas que apresentaram um pequeno acréscimo na T_g foram aquelas preparadas pelo método *in situ*. Embora seja conhecido na literatura que blendas de PSf e PVP são imiscíveis [127,128], e que a T_g do PVP é de 168 °C [129], a mudança observada no valor de T_g é um indicativo de alterações promovidas na matriz devido à presença dos aditivos utilizados na preparação dessas membranas, entre eles, nanopartículas de prata, PVP, glicose e NaOH. No caso da membrana MDPSf2, que foi preparada por dispersão das nanopartículas de prata, o valor da T_g foi similar ao da matriz polimérica pura.

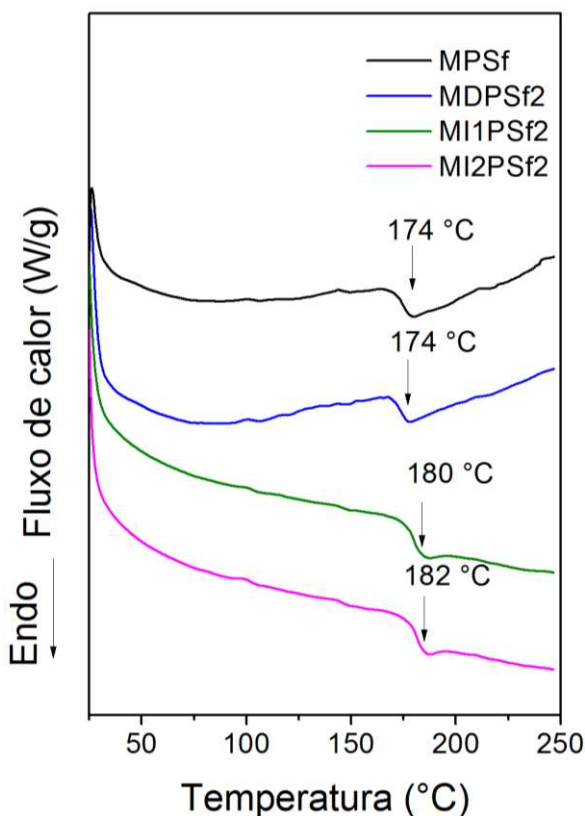


Figura 53. Curvas de DSC obtidas durante o segundo aquecimento para as membranas porosas de PSf. Os valores de T_g estão indicados nas curvas correspondentes.

Yang e colaboradores [130] prepararam membranas de polissulfona com óxido de titânio (TiO_2), variando a quantidade da carga entre 1 e 5%, e investigaram o efeito da carga na morfologia, porosidade e propriedades mecânicas das membranas. Os resultados de SEM mostraram mudanças na secção transversal das membranas, ou seja, a presença de TiO_2 promove a formação de macroporos maiores e estes são suprimidos ou desaparecem com 3% de TiO_2 . Foi também observado o aumento da T_g com o aumento de TiO_2 , interpretado como uma provável interação do polímero com a carga.

As propriedades térmicas das membranas foram também avaliadas por TGA (Figura 54). Os resultados referentes às membranas obtidas pelo método de dispersão e *in situ* mostraram perda de massa em 531 °C, em uma única etapa, atribuída à degradação da estrutura polimérica da polissulfona. O comportamento observado para as membranas contendo AgNP foi semelhante à da MPSf pura, exceto para MI1PSf2, obtida pelo método *in situ*, que apresentou um pico adicional em 435 °C, atribuído à degradação de PVP residual. Estes resultados indicam que as nanopartículas de prata não influenciaram a degradação térmica da PSf.

O efeito da adição do PVP e 2,4,6 triaminopirimidina (TAP) na dispersão de nanopartículas de prata na matriz de poliétersulfona (PES) foi estudado por Basri e colaboradores [131]. Os resultados de TGA mostram aumento na temperatura de degradação dos nanocompósitos em relação à matriz polimérica. Em outro estudo, desenvolvido por Li e colaboradores [132], foi realizada a investigação do efeito de nanopartículas de TiO_2 na matriz de poliétersulfona, sobre a estabilidade térmica da membrana. Os resultados mostram também aumento na estabilidade térmica do polímero.

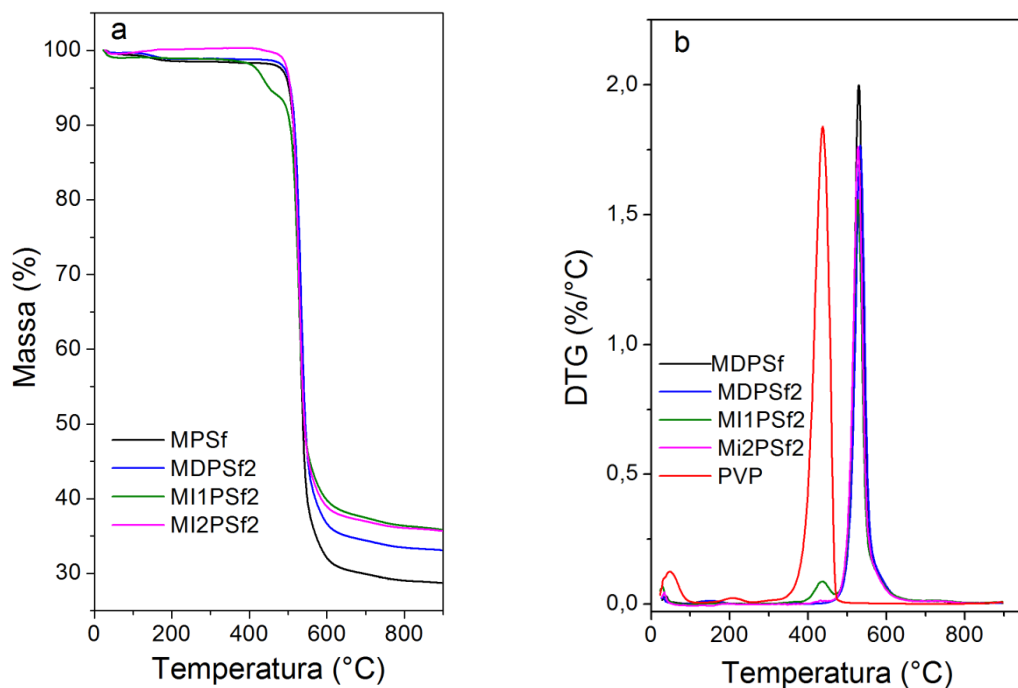


Figura 54. Curvas de perda de massa (a) e da derivada da perda de massa (b) das membranas.

A adição de nanocargas inorgânicas como aditivos em soluções poliméricas tem sido uma estratégia útil na preparação das membranas, uma vez que estes aditivos permitem obter membranas com estruturas esponjosas, poros interconectados e com maior caráter hidrofílico. A hidrofobicidade das membranas estudadas foi investigada por meio de medidas de ângulo de contato. Os resultados referentes às medidas estão apresentados na Tabela 8. Os valores dos ângulos de contato evidenciaram que a adição de AgNP tende a aumentar a hidrofilicidade das membranas MDPSf, MI1PSf e MI2PSf, em relação à membrana de polissulfona pura.

Também pode ser observado que as membranas obtidas pelo método *in situ* apresentaram maior redução do ângulo de contato, o que pode estar associado à distribuição preferencial das nanopartículas de prata na superfície da membrana, como observado por FESEM, como também à presença de PVP residual distribuído na matriz e superfície da membrana. O aumento da hidrofilicidade causada pelo PVP foi também observado por Wan e colaboradores, Lafrenière e colaboradores e Malek e colaboradores [133–135]. Este efeito pode ser

especialmente importante na prevenção de incrustações de natureza microbiológica na superfície das membranas, o que pode controlar a formação de *biofouling* e, conseqüentemente, a deteriorização da estrutura da membrana causada por microrganismos.

Tabela 8. Valores de ângulo de contato das membranas de PSf.

AgNP (%)	Ângulo de contato θ (°)*			
	MPSf	MDPSf	MI1PSf	MI2PSf
0	75,7 $\pm$ 0,3	-	-	-
0,5		69,5 $\pm$ 6,3	61,2 $\pm$ 8,9	66,8 $\pm$ 5,4
1,0		66,2 $\pm$ 2,6	59,3 $\pm$ 3,9	63,4 $\pm$ 1,7
2,0		63,0 $\pm$ 3,8	60,9 $\pm$ 2,6	58,8 $\pm$ 2,5

* superfície em contato com o ar

O fluxo permeado através das membranas preparadas foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Tylkowski e colaboradores [136]. A Tabela 9 apresenta os valores de fluxo permeado para todas as membranas de PSf em duas pressões diferentes (7 e 12 bar). Os resultados mostram que o fluxo permeado à água aumenta com o aumento da concentração de AgNP, para membranas preparadas *in situ*, em relação à membrana de polissufona pura. Este resultado é justificado pelo aumento de porosidade e de hidrofiliidade das membranas. No entanto, para a membrana MDPSf, preparada por dispersão das AgNP na matriz polimérica, as variações observadas não são consideradas estatisticamente significativas.

Nesse trabalho, a quantidade de PVP utilizada na preparação das membranas pelo método *in situ* foi de 2% em massa, em relação à massa do polímero. Apesar da pequena quantidade de PVP adicionada, esta pode contribuir para o aumento da porosidade, uma vez que este polímero é imiscível com a matriz

de PSf e solúvel em água, podendo ser extraído durante a formação da membrana no banho de coagulação. Estes resultados são importantes porque indicam um melhor desempenho dessas membranas em termos de fluxo permeado.

Zhang e colaboradores [137] prepararam membranas de polietersulfona com nanotubos de haloisita decorado com nanopartículas de prata (HNTs), usando o método de inversão de fases. As imagens de TEM mostram os nanotubos de haloisita bem dispersos na matriz polimérica. Foi observada também a diminuição do ângulo de contato da membrana com adição de HNTs e o aumento de fluxo de água. Os autores sugerem dois possíveis fatores que contribuem para melhorar o fluxo permeado da membrana de PES com HNTs, são eles: aumento da hidrofilicidade devido à adição de HNTs e presença de poros grandes nos HNTs.

Tabela 9. Valores de fluxo de água através das membranas de PSf.

AgNP (%)	Fluxo Permeado ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)				
	MPSf	MPSf	MDPSf	MI1PSf	MI2PSf
	7 bar	12 bar	12 bar	7 bar	7 bar
	25 ± 18	86 ± 33			
0,5			108 ± 47	42 ± 15	63 ± 12
1,0			59 ± 5	56 ± 10	130 ± 40
2,0			135 ± 31	121 ± 48	143 ± 1

Estudos desenvolvidos por Koseoglu-Imer e colaboradores e Sawada e colaboradores [79,80] mostram resultados contrários aos discutidos neste trabalho, ou seja, o fluxo permeado da membrana de polissulfona diminuiu com o aumento da concentração de AgNP. Os dois grupos argumentam que o aumento da quantidade e tamanho das AgNP sobre a superfície da membrana causa redução da permeação à água, devido a um efeito de barreira causado pela presença de AgNP nos poros da membranas.

4.4. Caracterização da membrana porosa de acetato de celulose com nanopartículas de prata

As Figuras 55a, 55b e 55c mostram as fotografias das membranas porosas de CA, obtidas pelo método de inversão de fases. As membranas de MDCA2 e MICA2 apresentaram cor cinza claro e marrom, respectivamente, enquanto que a membrana de CA pura (MCA) apresentou cor branca. Ambas exibiram coloração e aspecto uniformes.

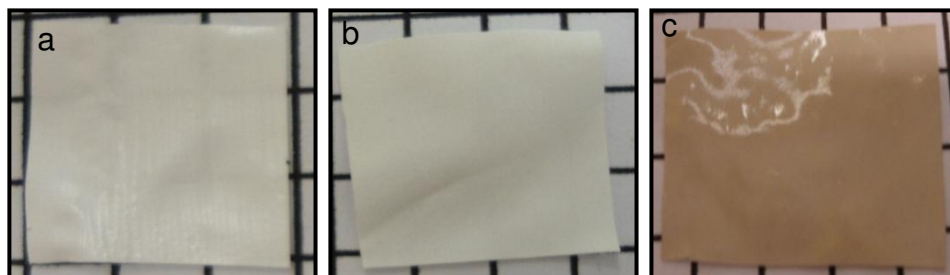


Figura 55. (a) Membranas porosas de CA, (b) MDCA2 e (c) MICA2.

As estruturas cristalinas de AgNP, β -CD, MCA, MDCA e MICA foram investigadas por difração de raios X. Os difratogramas das AgNP- β -CD e membranas MCA, MDCA2 e MICA2 estão apresentados na Figura 56. O difratograma das AgNP- β -CD (Figura 56a) mostra picos de difração em $2\theta = 37,8^\circ$, $43,8^\circ$, $64,2^\circ$, $77,3^\circ$ e $81,5^\circ$, atribuídos aos planos cristalográficos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) e (2 2 2), respectivamente, da estrutura cúbica de face centrada da prata. Para a membrana de CA pura (Figura 56b) foram observados dois picos característicos, com máximos em 15° e 22° , que correspondem ao empacotamento das cadeias de CA [33]. No caso da membrana de MDCA2, são observados os picos em $37,8^\circ$ e $43,8^\circ$, atribuídos às nanopartículas de prata distribuídas na membrana (Figura 56c). Por outro lado, não foi possível identificar a existência destes picos na membrana de MICA2 (Figura 56d).

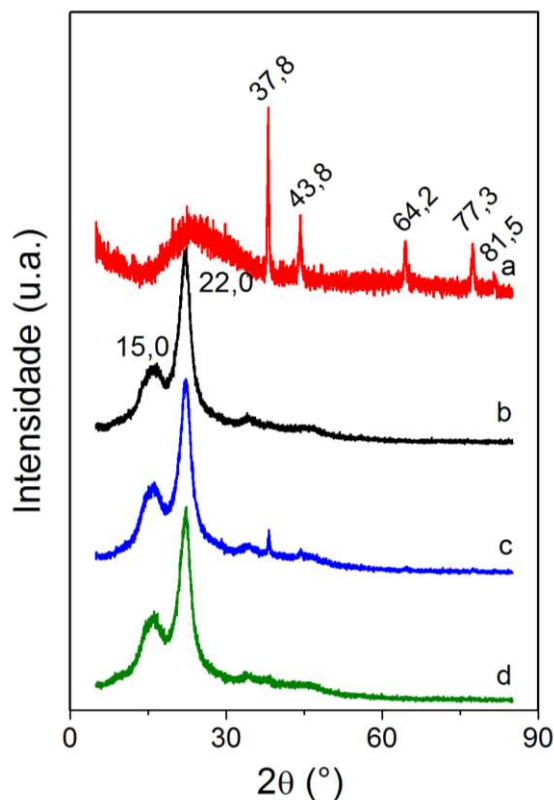


Figura 56. Difratomogramas de raios X: (a) AgNP- β -CD, (b) MCA, (c) MDCA2, (d) MICA2.

Os espectros na região do infravermelho da membrana de CA pura e das membranas com nanopartículas de prata estão apresentados na Figura 57. No espectro de MCA pode-se observar a presença da banda característica do estiramento da ligação C=O em 1737 cm^{-1} , e das bandas em 1230 cm^{-1} e 1038 cm^{-1} , características da ligação éster (C-O). Comparando-se os espectros da MCA com os das MDCA2 e MICA2 pode-se observar um deslocamento nessas bandas. Este deslocamento pode estar relacionado à interação dos grupos OH da β -CD com os grupos carbonila e hidroxila, presentes no acetato de celulose. A banda que aparece em 1643 cm^{-1} para MICA2 é atribuída à deformação do grupo OH da água.

Zhao e colaboradores [138] prepararam fibras de acetato de celulose contendo 0,2% e 0,4% de nanopartículas de prata por eletrofiação. As AgNP foram dispersas em acetona e adicionadas à solução polimérica de CA. Os resultados de FTIR mostram que as bandas em 1752 cm^{-1} , 1233 cm^{-1} e 1047 cm^{-1} ,

atribuídas aos estiramentos dos grupos carbonila e éster, são mantidas inalteradas, o que não permite avaliar as possíveis interações entre as nanopartículas de prata e a matriz de CA. Os autores sugerem que apesar de não ser possível observar o efeito da adição de AgNP por FTIR, existe a ocorrência de ligação de coordenação entre a nanopartículas de prata e a matriz de CA.

No trabalho desenvolvido por Kwon e colaboradores [139] foram preparados filmes densos de acetato de celulose com AgNP, a partir de uma mistura de CA e AgNO_3 em 2-metoxietanol que foi aquecida até a ebulição. Foram observadas mudanças nos espectros de FTIR, relativas às bandas do CA em 1748 cm^{-1} (C=O) e 1235 cm^{-1} (C-O) para 1744 cm^{-1} e 1239 cm^{-1} , respectivamente. Essas mudanças evidenciam a ocorrência de interação entre CA e AgNP.

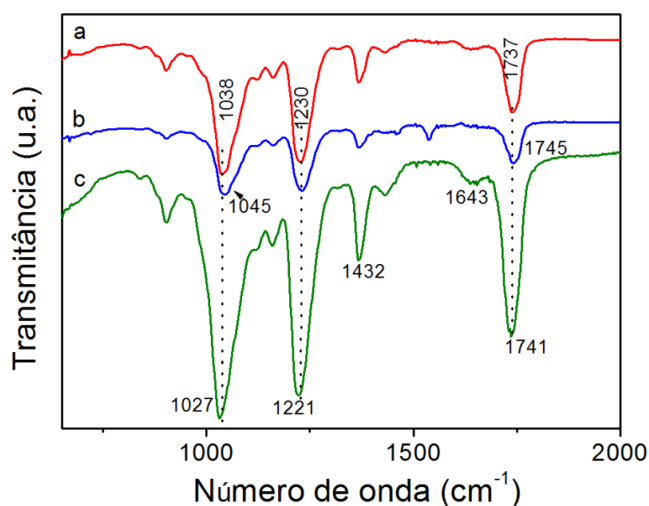


Figura 57. Espectros de FTIR: (a) MCA, (b) MDCA2 e (c) MICA2

A morfologia das membranas de CA foi investigada por FESEM. A Figura 58 exemplifica apenas as membranas MCA, MDCA2 e MICA2. As imagens foram obtidas a partir das superfícies das membranas e também das secções transversais. As imagens de FESEM apresentadas na Figura 58 mostram a estrutura porosa característica da membrana, independente da incorporação ou formação *in situ* das AgNP na matriz polimérica. Nas micrografias de fratura, Figuras 58a, 58d e 58g, pode-se observar que as membranas apresentam uma

estrutura porosa assimétrica composta por uma camada de poros na forma de canais alongados e outra camada de morfologia esponjosa, referente às microcavidades que se formaram na superfície em contato com o substrato de vidro. As membranas preparadas com adição de AgNP apresentaram mudanças na morfologia da seção transversal. Neste caso, é observada a formação de canais mais alongados. O mesmo foi observado com a formação de AgNP *in situ*, onde a seção transversal apresenta canais na forma de gotas. Além disso, as micrografias da superfície em contato com o ar mostram que a adição das cargas pelo método *in situ* causou aumento na rugosidade da superfície dessa membrana. O mesmo não ocorreu com a membrana MDCA2 (Figura 58f), que apresentou morfologia similar à membrana de CA pura. Entretanto, não foi possível observar a presença das nanopartículas de prata por FESEM, o que pode ser um indicativo da boa dispersão e adesão das nanopartículas na matriz de CA.

As mudanças de morfologia das membranas com nanopartículas preparadas *in situ* podem estar associadas ao efeito da adição de AgNP e β -ciclodextrina, o que pode ter alterado a cinética de formação de poros. Sabe-se que a estrutura esponjosa é formada pelo mecanismo de nucleação e crescimento, em que a troca do solvente e não-solvente é controlada pela viscosidade da solução polimérica.

A dispersão e a aderência de partículas em matrizes poliméricas podem ser controladas pela funcionalização da superfície das nanopartículas ou pela modificação da matriz polimérica [140]. Neste trabalho foi obtida uma boa adesão entre elas devido à ocorrência de interações favoráveis, tais como ligações de hidrogênio entre as hidroxilas e carbonilas do acetato de celulose e as hidroxilas das cadeias de β -ciclodextrina, que recobrem a superfície das nanopartículas.

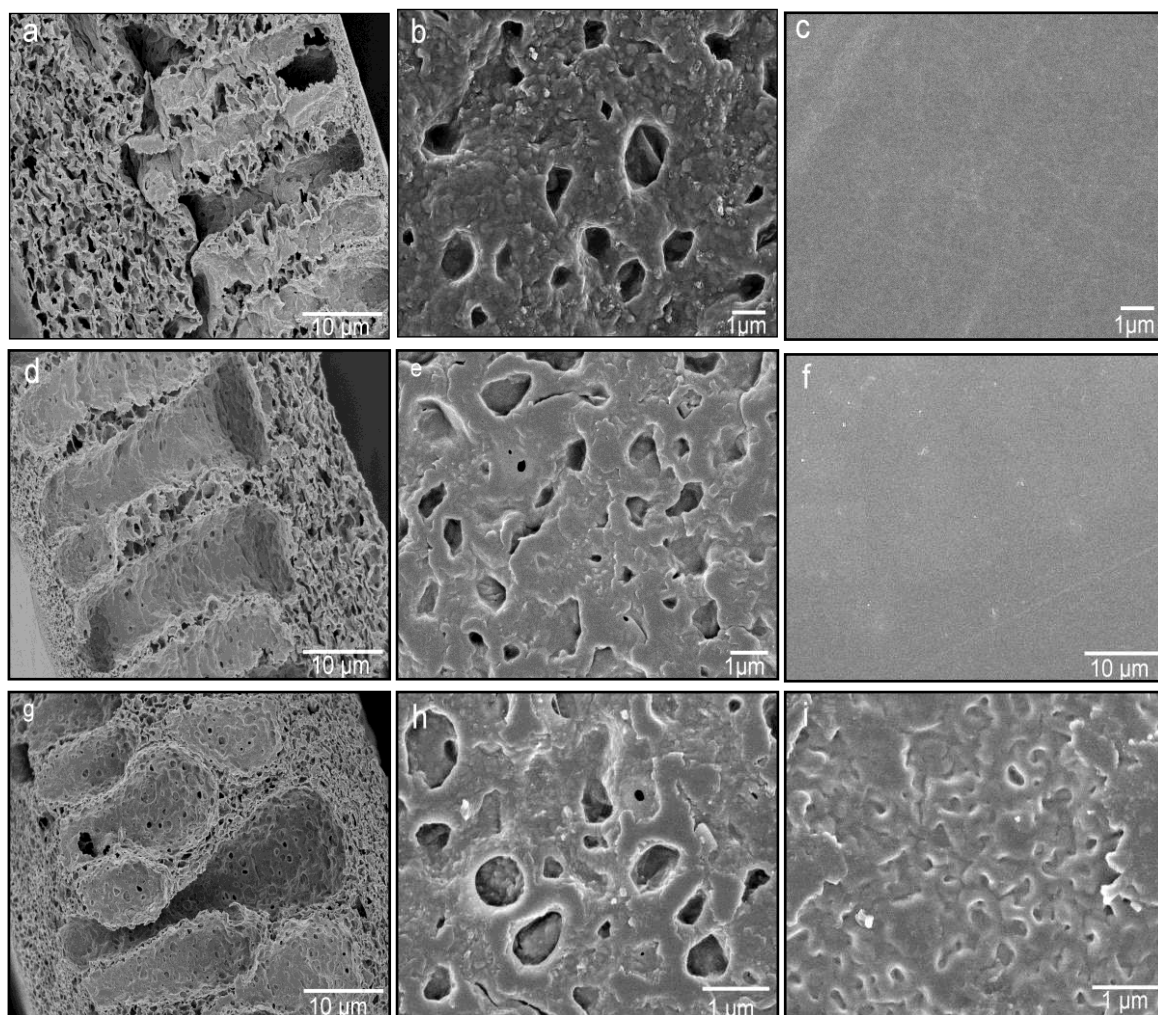


Figura 58. Imagens de FESEM: (a, b, c) MAC, (d, e, f) MDCA2, (g, h, i) MICA2. (a, d, g) Secções transversais, (b, e, h) superfícies em contato com o substrato e (c, f, i) superfícies em contato com o ar.

Song e colaboradores [141] desenvolveram um método de deposição de nanopartículas de prata em fibras de acetato de celulose, celulose e carboximetilcelulose (CMC), por eletrofiação e variação de pH na faixa de 2,5 a 9. As nanopartículas de prata foram inseridas nas fibras a partir da redução química de nitrato de prata, usando borohidreto de sódio e estabilizadas por citrato de sódio tribásico dihidratado. Os resultados de FESEM mostram que o pH influenciou na dispersão das nanopartículas de prata nos materiais celulósicos. A formação de AgNP na matriz de CA foi obtida pH na faixa de 7,8 e 9,0, sendo que as nanopartículas apresentam diâmetro menor que 50 nm. Para as fibras de CMC

com AgNP, foi observada a formação de AgNP (diâmetros na faixa de 20 a 30 nm) em pH maior que 7, distribuídas uniformemente nas fibras. No caso das fibras de celulose/AgNP, observou-se uma distribuição aleatória das AgNP (diâmetros na faixa de 20 a 50 nm), quando as mesmas são formadas em pH maior que 5,9.

Em um trabalho desenvolvido por Vasiliev e colaboradores [142], foi relatado o preparo de nanocompósitos PLA/Ag com alta dispersão das partículas na matriz, devido à funcionalização da superfície da nanopartículas de prata com ácido 3-mercaptopropiônico.

As propriedades térmicas das membranas porosas de CA, MDCA2 e MICA2 foram avaliadas por análise termogravimétrica (Figura 59). Na Figura 59a foi observada uma perda de massa em 330 °C, atribuída à degradação da matriz de acetato de celulose. De modo geral, os resultados sugerem que a incorporação de AgNP, por dispersão na matriz de CA ou formação *in situ*, não comprometeu a estabilidade térmica das membranas. Este comportamento pode ser observado nas curvas de derivada de perda de massa apresentadas na Figura 59b.

Por um lado, este resultado pode ser analisado do ponto de vista das interações intra e intermoleculares das cadeias de CA. No caso das nanopartículas de prata estabilizadas com β -CD, as interações favoráveis entre os grupos hidroxila da β -CD, com os grupos hidroxila e carbonila do CA substituem parcialmente as interações intra e intermoleculares da matriz polimérica, mantendo a estabilidade do polímero frente à degradação. Por outro lado, é discutido na literatura que a alteração da estabilidade térmica de nanocompósitos não depende somente da presença e interação com as nanocargas, mas também do grau de dispersão das mesmas [143]. Em nanocompósitos com nanopartículas de prata, a estabilidade térmica da matriz polimérica pode ser favorecida pela quantidade de nanopartículas dispersas na matriz polimérica. Para a membrana obtida neste trabalho, a pouca influência da nanopartículas de prata na estabilidade térmica do acetato de celulose pode ser atribuída ao baixo conteúdo de nanopartículas.

Resultados da literatura [144] mostram que a adição de prata na matriz de poli(metacrilato de metila) não afeta a estabilidade térmica do polímero. Por outro

lado, Chou e colaboradores [145] observaram que a adição de uma pequena quantidade de nanopartículas de prata (menor que 0,013 %) na matriz de poliuretana aumenta ligeiramente a temperatura de degradação dos nanocompósitos.

Varsha e colaboradores [146] prepararam filmes de acetato de celulose com nanopartículas de prata por *casting*. O acetato de celulose e o nitrato de prata foram solubilizados em dimetilformamida à 80 °C por 6h, sendo que a dimetilformamida foi utilizada como agente redutor dos íons prata e solvente do CA. A estabilidade térmica do filme foi investigada por análise termogravimétrica. Os resultados de TGA mostraram que houve um aumento na temperatura de degradação devido à presença de nanopartículas de prata, aumentado de 268 °C para 288 °C. Os autores concluem que a presença da AgNP aumenta a estabilidade térmica do filme de CA.

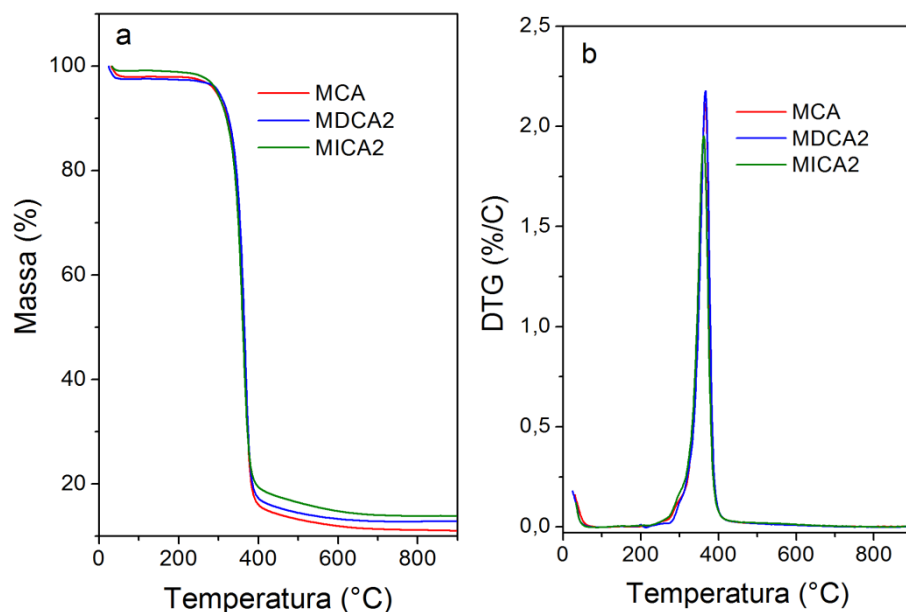


Figura 59. (a) Curvas termogravimétricas e (b) derivada da massa das membranas de MCA, MDCA2 e MICA2

A Figura 60 mostra as curvas de DSC, obtidas durante o segundo aquecimento, para as membranas porosas de MCA, MDCA2 e MICA2. A

temperatura de transição vítrea ($T_g = 190\text{ }^{\circ}\text{C}$) das membranas porosas não foi afetada após a incorporação das AgNP, independente da metodologia utilizada.

Madaeni e Tina [147] incorporaram nanopartículas de prata em membranas de acetato de celulose e triacetato de celulose comerciais para microfiltração. A incorporação da AgNP foi realizada utilizando duas formas: a primeira consistiu apenas em imergir a membrana em solução contendo entre 1 e 5% de nanopartículas de prata dispersas em solução de cloreto de estanho e a segunda em imergir a membrana em solução de 1 a 5% de nitrato de prata contendo amônia. As imagens de SEM mostraram que as AgNP são distribuídas preferencialmente nos poros. Foi observado um aumento da temperatura de transição vítrea com adição da AgNP de $189,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $191,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. O autor conclui que há uma leve melhora da estabilidade térmica do material com a presença de 5% de AgNP.

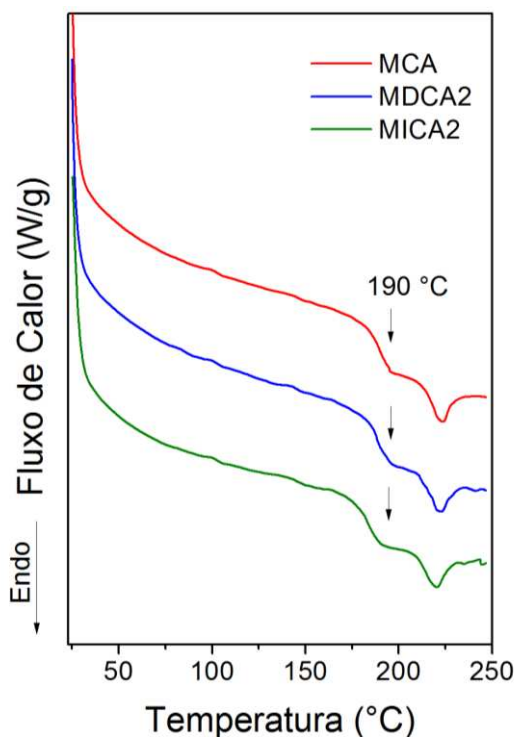


Figura 60. Curvas de DSC obtidas durante o segundo aquecimento para as membranas MCA, MDCA2 e MICA2.

A morfologia da membrana de CA, com nanopartículas de prata formadas *in situ*, foi investigada por TEM. Uma imagem representativa é apresentada na Figura 61a. A micrografia mostra a presença de nanopartículas de prata esféricas, com diâmetro médio de 13 ± 5 nm, como mostrado no histograma da Figura 61b, como também distribuídas de forma relativamente uniforme na matriz polimérica de CA. Por outro lado, as AgNP- β -CD obtidas isoladamente (item 3.3) apresentaram diâmetro médio de $28,0 \pm 8,5$ nm. Essa diferença de diâmetro das nanopartículas de prata pode ser explicada com base no meio reacional em que foram formadas, ou seja, as AgNP- β -CD que foram introduzidas na matriz de CA, pelo método de dispersão, foram preparadas em meio aquoso, enquanto as AgNP formadas *in situ*, foram geradas em uma solução viscosa de CA em acetona. A mudança de meio pode ter sido responsável pela inibição da nucleação e crescimento das AgNP, o que resultou em partículas menores.

Luong e colaboradores [148] prepararam nanofibrilas de acetato de celulose com nanopartículas de prata (CA-AgNP), a partir de uma solução aquosa contendo acetato de celulose e nitrato de prata. O íon prata foi reduzido com boridreto de sódio e após formação da nanopartículas de prata no meio, foi observada a formação de um sólido amarelo que antes da redução do íon prata apresentava coloração branca. A formação das AgNP na matriz de CA foi confirmada por UV-vis, pelo aparecimento de uma banda em 406 nm. A distribuição e o diâmetro médio das AgNP na matriz de CA foi analisada por TEM e os resultados mostraram nanopartículas de diâmetro médio de $2,8 \pm 0,8$ nm, distribuídas uniformemente na matriz de CA.

Embora a preparação de membranas de acetato por inversão de fases já seja bem estabelecida e muito relatada na literatura, ainda é desafiador introduzir nanopartículas bem distribuídas na membrana. Vários estudos são relatados envolvendo a preparação de nanofibras de CA com adição de outras cargas, tais como óxido de titânio [82] e óxido de zinco [149], ou moléculas com propriedades bactericidas, tais como clorexidina [150] e amoxicilina [151]. No entanto, a preparação de membranas assimétricas de CA com AgNP incorporadas, seja por uma simples dispersão da AgNP na matriz polimérica ou por formação *in situ*,

ainda não foi explorada. Neste trabalho foi possível mostrar a formação de nanopartículas de prata esféricas pelo método *in situ*, como comprovado nos resultados aqui apresentados.

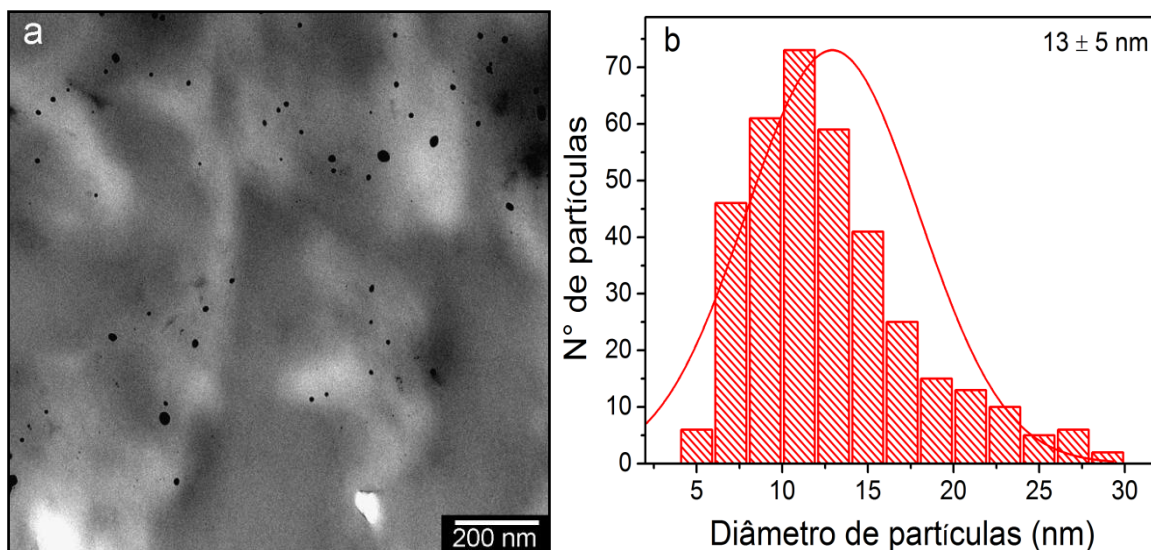


Figura 61. Imagem de TEM: (a) MICA2 e (b) histograma da distribuição de tamanho de AgNP-β-CD.

Foi utilizada a técnica de microscopia de força atômica (AFM) para investigar a rugosidade da superfície da MCA e das membranas contendo nanopartículas de prata. As imagens topográficas de AFM estão apresentadas na Figura 62. As regiões mais claras, observadas nas imagens de AFM, são atribuídas às regiões mais altas, enquanto que as regiões escuras representam os vales. As Figuras 62b, 62d e 62f mostram as imagens 3D das superfícies das membranas de CA pura e das preparadas com incorporação de nanopartículas de prata. As imagens topográficas das membranas complementam as observações realizadas por FESEM. A imagem da superfície da membrana pura (MCA, Figuras 62a e 62b) mostra a presença de nódulos de CA, que são estruturas características em filmes deste polímero [152,153]. Na superfície da MDCA2 (Figuras 62c e 62d) pode-se visualizar a presença de nanopartículas de prata, o que não foi possível identificar por FESEM. Este resultado pode ser um indicativo da boa distribuição e dispersão das nanopartículas na superfície da membrana.

Entretanto, as nanopartículas formadas *in situ* não são evidenciadas na superfície da MICA2 (Figuras 62e e 62f), assim como por FESEM, mas apenas a mudança de rugosidade.

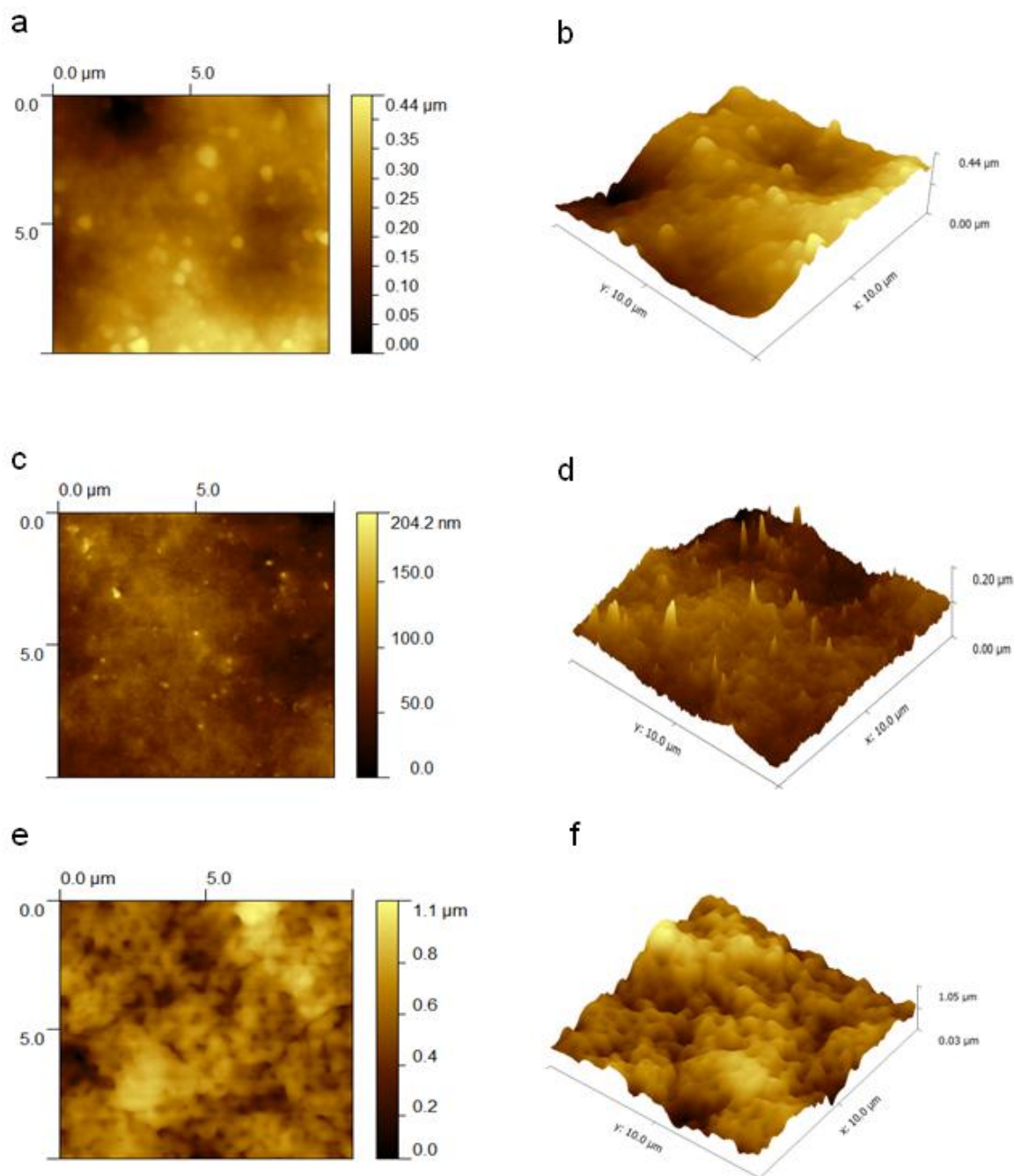


Figura 62. Imagens de AFM: (a, b) MCA, (c, d) MDCA2 e (e, f) MICA2. Imagens topográficas das: (a, c, e) superfícies em contato com o ar e (b, d, f) imagens 3D correspondentes.

O caráter hidrofílico da superfície das membranas de CA foi também investigado por medidas de ângulo de contato. A Tabela 10 traz os valores de ângulo de contato para as amostras de MCA, MDCA e MICA. As medidas foram realizadas sobre a superfície lisa das membranas, ou seja, a que foi formada em contato com o ar. Nota-se que os valores de ângulos de contato foram todos menores para as membranas com nanopartículas de prata, em relação à membrana pura de CA. Quanto à variação da quantidade de AgNP, não houve uma alteração significativa nos valores de ângulo de contato. Estes resultados indicam o aumento do caráter hidrofílico da superfície, causado pela presença de AgNP.

Tabela 10. Valores de ângulo de contato das membranas de CA.

AgNP (%)	Ângulo de contato θ (°)*		
	MCA	MDCA	MICA
	63,3 $\pm$ 0,3	-	
0,5	-	41,7 $\pm$ 0,2	48,1 $\pm$ 0,2
1,0	-	47,8 $\pm$ 0,6	50,6 $\pm$ 0,2
2,0	-	53,9 $\pm$ 0,2	51,6 $\pm$ 0,2

*Superfície em contato com o ar.

A Tabela 11 mostra os valores de fluxo permeado para as membranas de CA. Foi observado o aumento do fluxo de água, com o aumento da concentração de AgNP, para membranas preparadas por dispersão em relação à membrana de CA pura. O mesmo foi observado para membranas obtidas com formação de AgNP *in situ*. O aumento do fluxo de água através dessas membranas pode ser atribuído às mudanças morfológicas observadas por FESEM e AFM, como também ao aumento da hidrofiliabilidade de superfície das membranas com a incorporação de nanopartículas de prata.

Tabela 11. Valores de fluxo de água através das membranas de CA.

AgNP (%)	Fluxo Permeado ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)		
	MCA	MDCA	MICA
0,0	78 ± 31	-	-
0,5	-	143 ± 18	82 ± 13
1,0	-	255 ± 110	230 ± 13
2,0	-	453 ± 256	364 ± 68

4.5. Avaliação das propriedades antimicrobianas dos nanomateriais

Nanopartículas de prata têm sido extensivamente estudadas, devido principalmente às suas notáveis propriedades antimicrobianas. O potencial antimicrobiano das AgNP estabilizadas por PVP e β -CD, preparadas neste trabalho, foram primeiramente avaliadas quanto à atividade contra os microrganismos *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, em concentração na faixa de 10^6 a 10^8 UFC mL^{-1} . Neste teste, a concentração de AgNP-PVP e AgNP- β -CD foi mantida a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o tempo de exposição foi de 3 horas. Os resultados finais foram expressos em termos de porcentagem de inibição de células em relação às soluções de controle (sem adição de prata). As Figuras 63a e 63b mostram que as nanopartículas de prata estabilizadas por PVP e β -CD, respectivamente, foram capazes de reduzir mais de 99% de unidades formadoras de colônias de *E. coli* e *P. aeruginosa*. No entanto, o efeito bactericida contra *S. aureus*, para as AgNP-PVP e AgNP- β -CD foi de $51,3 \pm 14,3\%$ e de $69,0 \pm 8,6\%$, respectivamente. Estes resultados podem ser justificados com base na estrutura da parede celular de cada microrganismo. O principal constituinte da parede celular microbiana é o peptidoglicano, uma estrutura polimérica formada por açúcares e aminoácidos que rodeiam a membrana plasmática. A parede celular de bactérias tipo Gram-positivas é mais espessa do que da parede celular de bactérias Gram-negativas. Em consequência, a parede celular de bactérias Gram-positivas, tais como a *S.*

aureus, pode apresentar uma proteção física adicional contra a ação de nanopartículas de prata, quando comparada com células de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*).

Estes resultados estão de acordo com Martínez-Castañón e colaboradores [154], que também relataram a maior atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata contra microrganismos Gram-negativos. Da mesma forma, Jung e colaboradores [155] sugeriram que a espessura do peptidoglicano em bactérias Gram-positivas impede o efeito antibacteriano de íons prata em solução, uma vez que há uma maior atividade contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*), do que contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*). Tran e colaboradores [156] também reportaram que a atividade antibacteriana das nanopartículas de prata, utilizando quitosana como estabilizante, foi mais efetiva para bactérias Gram-negativas do que para as bactérias Gram-positivas. Este resultado é também justificado pelo fato da bactéria Gram-negativa apresentar lipossacarídeos, contendo grupos fosfatos e pirofosfatos na sua membrana externa, o que a caracteriza como sendo carregada negativamente. Assim, a célula se liga à cadeia do polímero catiônico (quitosana) por interações eletrostáticas.

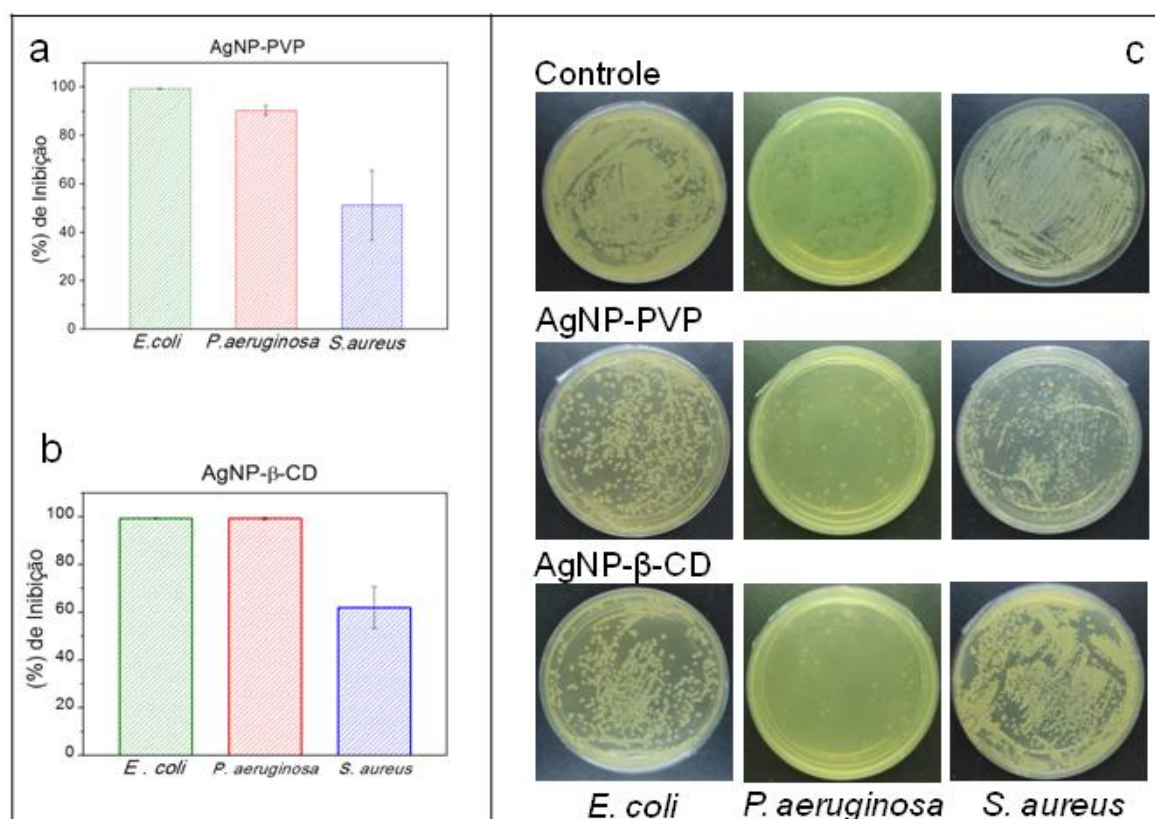


Figura 63. (a) e (b) Porcentagem de inibição da *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* após 3 horas de contato com dispersões a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP-PVP e AgNP-β-CD de. (c) Fotografias das placas de BHI Agar após experimento.

A Figura 64 mostra as curvas de tempo de morte para *E. coli* na presença de diferentes concentrações de AgNP-PVP. A dinâmica do crescimento bacteriano foi monitorada em meio agar BHI, com concentração de 10^6 a 10^8 UFC mL^{-1} de *E. coli*. Foi observado que em concentrações de 0,5 e $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP-PVP, o número de colônias de bactérias cultivadas em placas aumenta com o tempo, o que indica que nestas concentrações apresentam comportamento bacteriostático. Para concentrações de 2,5 a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ observa-se uma redução na UFC mL^{-1} com o tempo, mostrando comportamento bactericida. A concentração inibidora mínima contra *E. coli* foi de $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 3 horas de incubação, e de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 6 horas de incubação, à temperatura de 37°C .

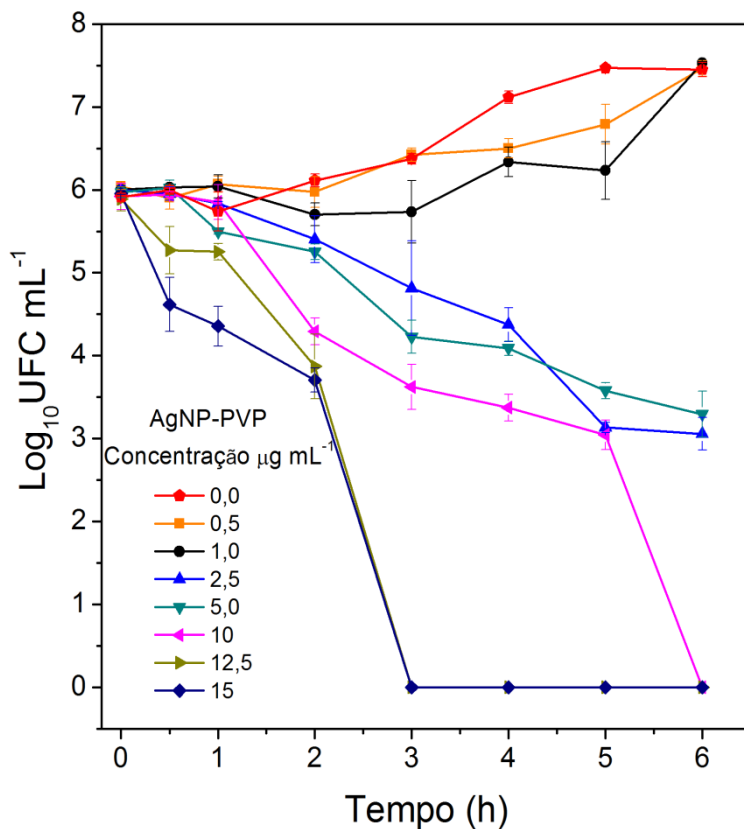


Figura 64. Curvas de tempo morte de *E. coli* inoculada em meio ágar BHI com 10^6 - 10^8 UFC mL⁻¹ de bactérias, na presença de diferentes concentrações de AgNP-PVP.

O desempenho e o estudo cinético da atividade antibacteriana da AgNP-β-CD foi também investigado, utilizando como modelo de microrganismo *E. coli*. Concentrações diferentes de AgNP-β-CD foram incubadas separadamente em água de peptona (0,1% v/v) e adicionado o inóculo de *E. coli* (10^6 - 10^8 UFC mL⁻¹). Foram retiradas alíquotas periódicas, que foram diluídas em série, semeadas em placas de BHI e incubadas durante 12 horas. O número de colônias foi determinado pela contagem de unidades formadoras de colônia em função do tempo, como mostrado na Figura 65. Em geral, a UFC mL⁻¹ da *E. coli* diminui com o aumento na concentração de AgNP-β-CD e com o aumento do tempo de exposição. As concentrações de 0,5 e 1,0 µg mL⁻¹ de AgNP-β-CD resultaram em valores de UFC mL⁻¹ praticamente constantes. Neste caso, as AgNP-β-CD não destroem as células de *E. coli*, mas apenas mantém o mesmo nível inicial, o que é

considerado um efeito bacteriostático. O uso de concentrações de 15 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP- β -CD exibiram excelente capacidade antibacteriana contra *E. coli*, uma vez que nenhuma colônia de bactérias foi encontrada após 2 e 3 horas de incubação, respectivamente.

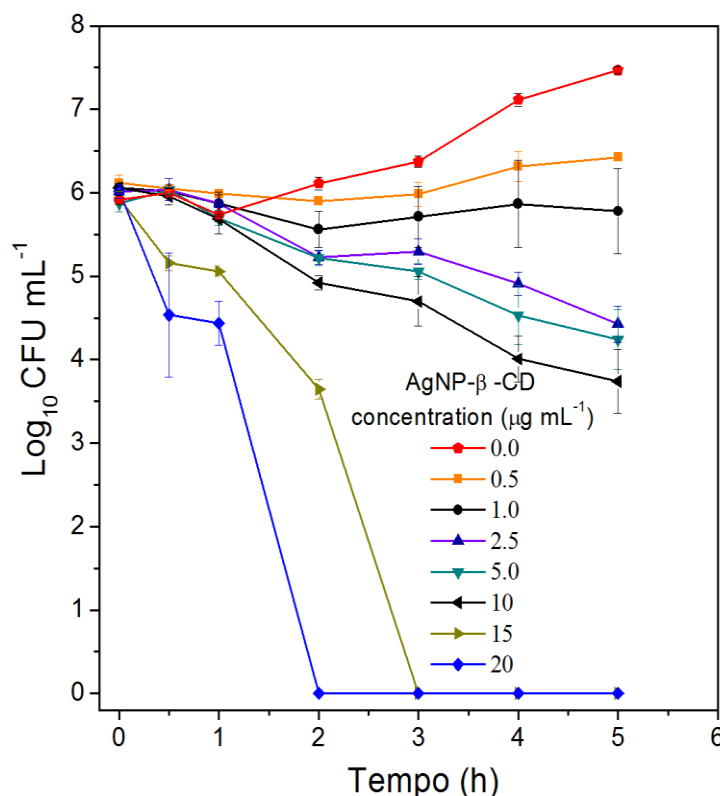


Figura 65. Curvas de tempo morte de *E. coli* inoculada em meio ágar BHI com 10^6 UFC mL^{-1} de bactérias, na presença de diferentes concentrações de AgNP- β -CD.

Raffi e colaboradores [157] observaram que a presença de AgNP, com diâmetro de 16 nm e concentração de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, exibe um efeito completamente tóxico para *E. coli*. As imagens de TEM foram capazes de mostrar a presença de AgNP ligada à parede da célula e no interior das bactérias. Li e colaboradores [158] investigaram a atividade antibacteriana e mecanismos de ação das AgNP contra *E. coli* ATCC 8739. As imagens de TEM mostram a presença de buracos na membrana celular da *E. coli*, quando foi utilizada a concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP. Foi observado também que após exposição das células de *E. coli*, em

uma concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AgNP, os vacúolos da membrana celular apresentam-se desorganizados e dispersos, quando comparado com o arranjo original. Os autores concluíram que as AgNP danificam a parede da membrana celular e diminuem a atividade de algumas enzimas presentes na membrana da bactéria, o que causa eventualmente a morte do microrganismo *E. coli*.

O mecanismo de ação de nanopartículas de prata na superfície bacteriana ainda não está suficientemente estabelecido na literatura. Há uma hipótese que se baseia na interação química de íons Ag^+ com enxofre presente na membrana plasmática da bactéria, oriundo de grupos tióis, e também com grupos azoto presentes em aminoácidos [156]. Também foi proposto que a formação de orifícios pode ser facilitada por atração eletrostática entre a carga positiva dos íons Ag^+ na superfície de AgNP com membranas celulares carregadas negativamente [61]. As partículas AgNP- β -CD e AgNP-PVP estudadas neste trabalho possuem carga negativa na superfície, os resultados sugerem que estas interagem com os componentes estruturais da membrana celular, provocando danos na sua organização e levando a célula à morte. A fim de demonstrar a interação das AgNP com as bactérias, é necessário conduzir este estudo com outra abordagem e aprofundamento. Imagens de TEM permitem a observação direta do efeito de nanopartículas na estrutura das bactérias, permitindo que mais detalhes sejam investigados sobre o mecanismo de ação de AgNP em células de *E. coli*.

A atividade antimicrobiana das membranas de polissulfona contendo 0,5%, 1,0% e 2,0% de nanopartículas de prata foram também avaliadas frente aos microrganismos *E. coli* e *P. aeruginosa*, utilizando o método de diluição seriada e contagem de colônias. Os resultados foram expressos em log UFC e estão listados nas Tabelas 12 e 13.

De acordo com os dados da Tabela 12, pode-se observar que as membranas MI1PSf (preparadas *in situ*) apresentaram atividade bactericida contra *E. coli* em todas as concentrações estudadas (0,5%, 1,0% e 2,0%). Apenas a membrana preparada pelo método de dispersão e que continha 0,5% de AgNP não apresentou efeito bactericida contra a mesma bactéria, quando comparada aos controles. Para os testes microbiológicos realizados contra *P. aeruginosa*, foi

observado que as membranas MDPSf (preparadas pelo método de dispersão), contendo 0,5%, 1,0% e 2,0% de AgNP, não apresentaram atividade antimicrobiana, como mostrado na Tabela 13. Já a membrana MI1PSf2 apresentou 100% de inibição das células de *P. aeruginosa*. No caso das MI2PSf, em que as AgNP foram formadas a partir de 1,0% e 2,0% de AgNO₃, foi verificado 100% de inibição de crescimento contra *P. aeruginosa*. Esse comportamento pode estar associado à disponibilidade das nanopartículas na superfície do material, como foi ilustrado pelas imagens de FESEM dessas membranas, o que possivelmente facilitou a lixiviação das nanopartículas para o meio de cultura (Minimal Davis). Outro ponto que deve ser levado em consideração é que as bactérias *P. aeruginosa* podem utilizar citrato de sódio como fonte de carbono. Dessa forma, essas bactérias podem apresentar menor suscetibilidade às nanopartículas de prata em detrimento da *E. coli* que não possui habilidade de metabolizar citrato do meio de cultura. A habilidade da *P. aeruginosa* em metabolizar citrato de sódio já é relatada na literatura [159] e foi confirmada por meio da turvação do meio de cultivo durante a realização dos ensaios, o que não foi observado nos ensaios realizados com a linhagem de *E. coli*.

Tabela 12. Resultados do crescimento *E. coli* (ATCC 25922) em membranas de PSf durante 12 horas. A concentração microbiana é dada em log UFC mL⁻¹ com desvio padrão de n = 3.

Amostras	Concentração microbiana log ₁₀ (UFC mL ⁻¹)			
	MPSf	MDPSf	MI1PSf	MI2PSf
Controle*	6,04 ± 0,09	-	-	-
MPSf**	5,91 ± 0,09	-	-	-
0,5%***	-	6,17 ± 0,03	Não cresceu	Não cresceu
1,0%***	-	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu
2,0%***	-	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu

*Frasco contendo meio Minimal Davis e bactéria

**Minimal Davis, bactéria e membrana de PSf

***Concentração de AgNP

Tabela 13. Resultados do crescimento *P. aeruginosa* (ATCC 14207) em membranas de PSf durante 12 horas. A concentração microbiana é dada em log UFC mL⁻¹ com desvio padrão de n = 3.

Amostras	Concentração microbiana log ₁₀ (UFC mL ⁻¹)			
	MPSf	MDPSf	MI1PSf	MI2PSf
Controle*	8,30 ± 0,04	-	-	-
MPSf**	8,75 ± 0,04	-	-	-
0,5%***	-	8,21 ± 0,02	8,19 ± 0,06	8,07 ± 0,08
1,0%***	-	8,12 ± 0,07	7,61 ± 0,67	Não cresceu
2,0%***	-	8,37 ± 0,10	Não cresceu	Não cresceu

*Frasco contendo meio Minimal Davis e bactéria

**Minimal Davis, bactéria e membrana de PSf

***Concentração de AgNP

Vários estudos têm sido conduzidos para avaliar a ação bactericida de prata para diversos microrganismos, porém os resultados mostram que ainda é um desafio obter membranas com distribuição uniforme de nanopartículas de prata, o que é essencial para que apresentem boas propriedades bactericidas.

Basri e colaboradores [131] prepararam membranas de PES com 8% em massa de nanopartículas de prata, por inversão de fases. Foi investigado o efeito de diferentes estabilizantes, tais como polivinilpirrolidona e 2, 4, 6-triaminopiridina (TAP), na dispersão das nanopartículas de prata nas membranas PES. Os resultados obtidos mostraram que TAP foi o melhor agente estabilizante, resultando em melhor dispersão das nanopartículas de prata na membrana. A avaliação do potencial antimicrobiano frente a *E. coli* e *S. aureus* para esta membrana mostrou 100% de inibição de crescimento bacteriano.

Zhang e colaboradores [160] desenvolveram membranas de PES/AgNP com concentrações de 0,5, 1,6, 3 e 5% de nanopartículas de prata, também por inversão de fases. Os efeitos do teor de AgNP sobre a estrutura da membrana e seu desempenho em filtração foram investigados sistematicamente. Os resultados demonstraram que nanopartículas de prata se distribuem uniformemente sobre a superfície da membrana. A incorporação de AgNP

aumentou a hidrofiliçidade da membrana de PES e o fluxo permeado. As propriedades antibacterianas e a anti-incrustação da membrana foram testadas com culturas de *E. coli* e *P. aeruginosa* e com uma cultura mista (lodo ativado) pelos métodos de inibição de halo, contagem de colônias e formação de biofilme. As membranas de PES/AgNP, mesmo com o menor teor de prata (0,5%), não só exibiram excelente atividade antimicrobiana como não apresentaram adesão bacteriana na superfície e formação de biofilme.

Para avaliar o crescimento do biofilme nas membranas de PSf e MI1PSf, as mesmas foram expostas ao meio líquido de BHI por 48 h, e neste meio foi inoculada a bactéria *E. coli* em concentrações na faixa de 10^6 a 10^8 UFC mL⁻¹. Os resultados mostraram que as membranas de PSf com 0,5%, 1% e 2% de nanopartículas de prata inibiram o crescimento celular em $87,1 \pm 4,8\%$, $53,7 \pm 3,3\%$ e $97,6 \pm 2,8\%$, respectivamente, como mostra a Figura 66. A diferença nos valores de inibição na formação do biofilme pode estar relacionada à concentração, distribuição e disponibilidade das nanopartículas na superfície da membrana.

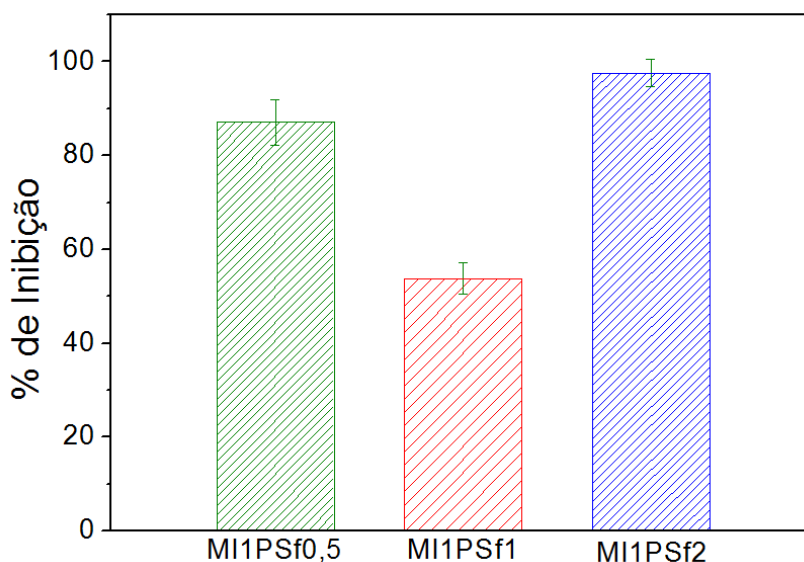


Figura 66. Inibição da formação de biofilme contra *E. coli* para as membranas de MI1PSf com diferentes concentrações de nanopartículas de prata, formadas pelo método *in situ*. O gráfico resume a inibição do crescimento do biofilme após 48 h de incubação a 37 °C, em meio líquido de BHI.

Jain e colaboradores [161] desenvolveram nanocompósitos de poliuretana/AgNP. O interesse nesse estudo foi justificado pela possibilidade de utilizar o material como filtro para descontaminação bacteriana de águas. Os testes foram realizados utilizando um protótipo de filtro de água, sendo que a descontaminação de água com *E. coli* foi atingida em um tempo de contato de apenas um segundo.

A atividade antimicrobiana das membranas de MDCA e MICA contendo 0,5%, 1,0% e 2,0% de AgNP foi também avaliada frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus*, utilizando o método de diluição seriada e contagem de colônias. Os resultados foram expressos em percentagem de redução da viabilidade celular, como mostrado nas Tabelas 14 e 15. De acordo com os dados apresentados, pode-se observar que todas as membranas de MDCA mostraram elevada atividade bactericida contra *E. coli*, apresentando 100% de inibição das células viáveis desse microrganismo após 12 horas de exposição. Da mesma maneira, todas as membranas de MICA apresentaram o mesmo comportamento contra a linhagem de *S. aureus*, ou seja, 100% de redução das células viáveis de *S. aureus*. Visto que ambos *E. coli* e *S. aureus* são considerados indicadores microbiológicos de qualidade de água, as membranas poliméricas porosas de MDCA e MICA possuem grande potencial para aplicação em processos de tratamento e desinfecção da água.

Tabela 14. Resultados do crescimento *E. coli* (ATCC 25922) em membranas de CA durante 12 horas. A concentração microbiana é dada em log UFC mL⁻¹ com desvio padrão de n = 3.

Amostras	Concentração microbiana log ₁₀ (UFC mL ⁻¹)		
	MCA	MDCA	MICA
Controle*	6,09 ± 0,04	-	-
MCA**	6,46 ± 0,06	-	-
0,5%***		Não cresceu	Não cresceu
1,0%***		Não cresceu	Não cresceu
2,0%***		Não cresceu	Não cresceu

*Frasco contendo meio Minimal Davis e bactéria

**Minimal Davis, bactéria e membrana de CA

***Concentração de AgNP

Tabela 15. Resultados do crescimento *S. aureus* (ATCC 29213) em membranas de CA durante 12 horas. A concentração microbiana é dada em log UFC mL⁻¹ com desvio padrão de n = 3.

Amostras	Concentração microbiana log ₁₀ (UFC mL ⁻¹)		
	MCA	MDCA	MICA
Controle*	5,99 ± 0,1	-	-
MCA**	5,95 ± 0,05	-	-
0,5%***		Não cresceu	Não cresceu
1,0%***		Não cresceu	Não cresceu
2,0%***		Não cresceu	Não cresceu

*Frasco contendo meio Minimal Davis e bactéria

**Minimal Davis, bactéria e membrana de CA

***Concentração de AgNP

Foram também avaliados a formação de biofilme das membranas MCA e MDCA. Os resultados mostraram que as membranas de CA contendo 0,5%, 1,0% e 2,0% apresentaram inibição de crescimento celular contra *E. coli* de 87 ± 11%, 94 ± 3 e 89 ± 2% (Figura 67), respectivamente.

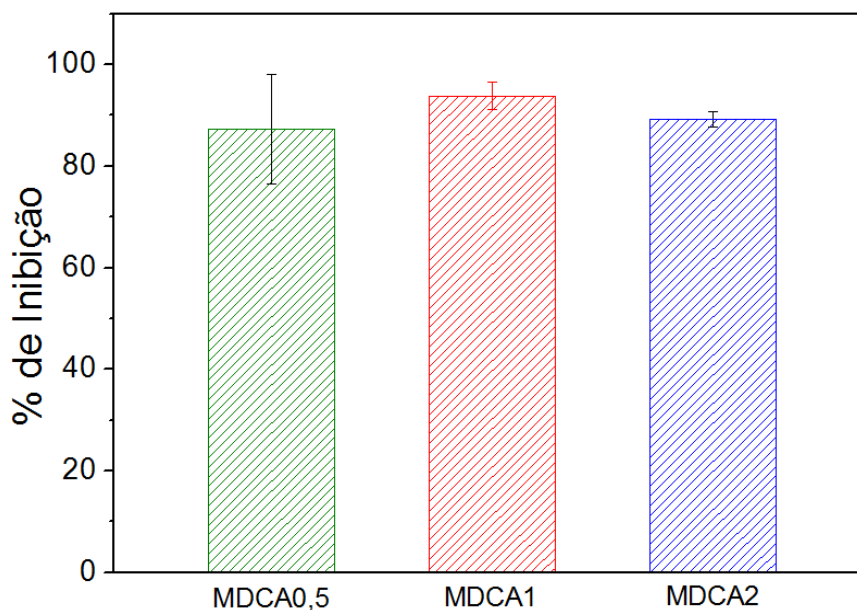


Figura 67. Inibição da formação de biofilme contra *E. coli* para as membranas de MDCA com diferentes concentrações de nanopartículas de prata, formadas pelo método *in situ*. O gráfico resume a inibição do crescimento do biofilme após 48 h de incubação, a 37 °C, em meio líquido de BHI.

Para determinar a quantidade de prata lixiviada durante os ensaios microbiológicos realizados com as membranas de PSf e CA, contendo 0,5% e 2,0% de AgNP, foram realizados experimentos paralelos, onde secções de 1cm x 1cm das membranas foram colocadas em frascos de erlenmeyer contendo 10 mL de água deionizada. Após 12 h de incubação à 37 °C, a quantidade de íons prata lixiviada para o meio foi determinada por ICP-MS. Os resultados estão apresentados na Tabela 16. Os resultados apresentados na Tabela 16 indicam a quantidade de prata lixiviada, em ppb, necessária para inibir 100% do crescimento de células de *E. coli* nas membranas MDPSf e MIPSf (Tabela 12). Vale destacar que esta quantidade de íons prata não foi suficiente para inibir o crescimento de células viáveis de *P. aeruginosa*, como indicado nos resultados da Tabela 13.

Com relação aos resultados das membranas MDCA e MICA, a quantidade de íons prata lixiviada foi maior que a determinada para as membranas de PSf. Embora essa concentração de íons prata tenha sido mais elevado, todos os valores determinados estão na ordem de ppb e portanto são valores muito baixos.

Pode-se observar que essa quantidade de prata lixiviada foi necessária para inibir o crescimento de 100% de células viáveis de *E. coli* e *S. aureus* nas membranas de CA, conforme foi mostrado nas Tabelas 14 e 15.

Desta forma, medindo-se a inibição do crescimento dos microorganismos apenas com base na quantidade de prata lixiviada, este experimento demonstrou que as membranas investigadas liberam uma quantidade ínfima desses íons.

Tabela 16. Determinação por ICP-MS da quantidade de prata lixiviada durante o ensaio microbiológico das membranas de MCA e PSf contendo AgNP.

Amostras	[Ag] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SD*
MDPSf 0,5	0,66	0,05
MDPSf 2	27,03	2,49
MI1PSf 0,5	3,35	1,42
MI1PSf 2	12,27	2,88
MDCA0,5	31,04	2,58
MDCA2	297,31	23,00
MICA0,5	24,73	2,89
MICA2	103,86	12,90

* desvio padrão

Para avaliar a lixiviação de prata durante os ensaios de permeação das membranas, foram realizados experimentos simulando o processo de filtração, que consistiu em filtrar uma quantidade fixa de água através das membranas (PSf e CA contendo 2,0% de AgNP). Alíquotas da água permeada foram analisadas por ICP-MS. Os resultados estão mostrados na Tabela 17. Foi observada a diminuição da concentração de prata em função da quantidade de água permeada, para todas as membranas investigadas.

Tabela 17. Quantidade lixiviada de prata após permeação de 1L de água deionizada através das membranas de CA e PSf contendo AgNP, determinada por ICP-MS.

Alíquotas (250 mL de água)	Membrana	[Ag] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SD*
1	MDPSf2	7,45	0,10
2	MDPSf2	1,40	0,03
3	MDPSf2	1,76	0,03
4	MDPSf2	3,75	0,03
1	MI1PSf2	7,04	0,40
2	MI1PSf2	1,76	0,07
3	MI1PSf2	1,24	0,05
4	MI1PSf2	1,20	0,01
1	MI2PSf2	57,19	1,27
2	MI2PSf2	13,17	0,16
3	MI2PSf2	6,75	0,12
4	MI2PSf2	6,90	0,01
1	MDCA2	11,44	0,23
2	MDCA2	7,25	0,09
3	MDCA2	7,72	0,10
4	MDCA2	6,05	0,12
1	MICA2	11,04	0,17
2	MICA2	7,33	0,08
3	MICA2	12,99	0,17
4	MICA2	17,32	0,24

* desvio padrão

Estes últimos resultados mostram que apenas uma pequena quantidade de íons prata é lixiviada durante a filtração. Essa característica é importante, pois indica que a maior parte das nanopartículas de prata incorporadas permanece nas membranas, favorecendo a inibição de *biofouling* e assim a sua durabilidade.

Capítulo 5

Conclusões

Nanopartículas de prata foram sintetizadas utilizando-se dois estabilizantes diferentes: polivinilpirrolidona e β -ciclodextrina. As nanopartículas estabilizadas com PVP apresentaram diâmetros médios que variaram em função da concentração de precursor e da razão mássica estabilizante/precursor. Utilizando-se concentração de AgNO_3 de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e razão mássica PVP/ AgNO_3 igual a 1,5, foram formadas nanopartículas dispersas de AgNP-PVP com diâmetro médio de 45 nm e espessura média da camada estabilizante de 3,6 nm. As nanopartículas estabilizadas com β -CD, preparadas em condições similares às de AgNP-PVP, apresentaram diâmetro médio de 28 nm e espessura média de estabilizante de 7 nm.

Os resultados dos ensaios microbiológicos realizados com AgNP-PVP e AgNP- β -CD indicaram valores de concentração mínima de inibição de *E. coli* iguais a $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, em tempos de incubação de 3 h e 2 h, respectivamente.

A incorporação de nanopartículas de prata em membranas assimétricas de polissulfona e acetato de celulose foi feita utilizando-se diferentes metodologias: dispersão das nanopartículas na matriz polimérica e formação *in situ*. Membranas de PSf preparadas por dispersão de AgNP-PVP apresentaram distribuição uniforme de nanopartículas esféricas principalmente na superfície dos poros. Membranas de PSf preparadas pela formação *in situ* resultaram em nanopartículas cúbicas, distribuídas preferencialmente sobre as superfícies da membrana. Membranas de CA preparadas por dispersão das nanopartículas apresentaram mudanças na morfologia de superfície. As nanopartículas preparadas *in situ* apresentaram diâmetros menores. Os resultados deste trabalho indicam que é possível preparar membranas de PSf e CA contendo AgNP bem distribuídas e de tamanho uniforme.

A presença de nanopartículas de prata nas membranas de PSf e CA não alterou a estabilidade térmica das matrizes poliméricas, entretanto, aumentou o caráter hidrofílico e, conseqüentemente, o fluxo de água através das membranas. Todas as membranas de PSf contendo AgNP apresentaram 100% de inibição de crescimento de *E. coli*, como também todas as membranas de CA e AgNP frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*, independente do método utilizado na preparação das membranas. Em relação à formação de biofilme a partir do contato com *E. coli*, as membranas de PSf e CA, contendo 2% de AgNP, apresentaram redução de $89 \pm 1\%$ e $98 \pm 3\%$, respectivamente.

Os métodos propostos neste trabalho foram adequados para a preparação de nanopartículas de prata a partir de modificações do método convencional relatado na literatura, bem como permitiram combinar estas nanopartículas com matrizes poliméricas porosas de forma a produzir membranas com características adequadas, utilizando um processo simples, reprodutível e de baixo custo. Particularmente, o método *in situ* mostrou-se apropriado para essa finalidade, uma vez que as nanopartículas foram formadas diretamente no interior da solução polimérica e apresentaram tamanhos adequados e distribuição uniforme na membrana. Estas membranas podem ser úteis em diferentes aplicações, tais como tratamento de água e recuperação de águas residuais.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

- [1] M. Maskos, R. H. Stauber. Characterization of Nanoparticles in Biological Environments, in: *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier Ltd., **2011**: pp. 329-339.
- [2] T. P. J. Linsinger, G. Roebben, D. Gilliland, L. Calzolari, F. Rossi, N. Gibson, C. Klein. Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term. *European Commission* **2012**, pp 1-56.
- [3] S. Chang, K. Chen, Q. Hua, Y. Ma, W. Huang. Evidence for the growth mechanisms of silver nanocubes and nanowires. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, 115, 7979-7986.
- [4] L. Huang, Y. Zhai, S. Dong, J. Wang. Efficient preparation of silver nanoplates assisted by non-polar solvents. *Journal of Colloid Interface Science* **2009**, 331, 384-388.
- [5] A. Sarkar, S. Kapoor, T. Mukherjee. Synthesis of silver nanoprisms in formamide. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 287, 496-500.
- [6] M. Faraday. The bakerian lecture: Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, 147, 145-181.
- [7] A. Dowling, R. Clift, N. Grobert, D. D. Hutton, R. Oliver, B. O. O'Neill, et al. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, in: *The Royal Society and the Royal Academy of Engineering: London*, **2004**, pp. 1-116.
- [8] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, 11, 55-75.
- [9] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 7, 801-802.
- [10] J. Z. Zhang, C. Noguez. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. *Plasmonics* **2008**, 3, 127-150.

-
- [11] C. Noguez. Surface plasmons on metal nanoparticles the influence of shape and physical environment. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, 3806-3819.
- [12] L. M. Liz-Marzán. Nanometals : formation and color. *Materials Today* **2004**, 7, 26-31.
- [13] J. Q. Hu, Q. Chen, Z. X. Xie, G. B. Han, R. H. Wang, B. Ren, et al. A simple and effective route for the synthesis of crystalline silver nanorods and nanowires. *Advanced Functional Materials* **2004**, 14, 183-189.
- [14] S. S. Mansouri, S. Ghader. Experimental study on effect of different parameters on size and shape of triangular silver nanoparticles prepared by a simple and rapid method in aqueous solution. *Arabian Journal of Chemistry* **2009**, 2, 47-53.
- [15] G. F. Fanta, J. A. Kenar, F. C. Felker, J. A. Byars. Preparation of starch-stabilized silver nanoparticles from amylose-sodium palmitate inclusion complexes. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 92, 260-268.
- [16] K. B. Narayanan, N. Sakthivel. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science* **2010**, 156, 1-13.
- [17] N. M. Huang, S. Radiman, H. N. Lim, P. S. Khiew, W. S. Chiu, K. H. Lee, A. Syahida, R. Hashim, C. H. Chia. γ -Ray assisted synthesis of silver nanoparticles in chitosan solution and the antibacterial properties. *Chemical Engineering Journal* **2009**, 155, 499-507.
- [18] C. B. Murray, C. R. Kagan. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annual Review of Materials Research* **2000**, 30, 545-610.
- [19] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Reviews* **2005**, 105, 1025-1102.
- [20] D. H. Everett, Basic Principles of Colloid Science, 1st ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1988**.
- [21] A. W. Adamson, A. P. Gast, Physical Chemistry of Surfaces, 3 rd ed, John Wiley & Sons, Carlifornia, **1976**.
- [22] P. C. Hiemenz, R. Rajagopalan, Principles of colloid and surface chemistry, 3 rd ed, Marcel Dekker, New York, **1997**.

-
- [23] D. Myers, Surfaces, Interfaces, and Colloids, 2 nd ed, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, **1999**.
- [24] D. Hotza. Artigo revisão : colagem de folhas cerâmicas. *Cerâmica*, **1997**, 43, 157-164.
- [25] G. Fritz, V. Schädler, N. Willenbacher, N. J. Wagner. Electrosteric stabilization of colloidal dispersions. *Langmuir* **2002**, 18, 6381-6390.
- [26] S. Komarneni, H. Katsuki, D. Li, A. S. Bhalla. Microwave–polyol process for metal nanophases. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2004**, 16, S1305-S1312.
- [27] P. Jiang, S. Y. Li, S. S. Xie, Y. Gao, L. Song. Machinable long PVP-stabilized silver nanowires. *Chemistry European Journal* **2004**, 10, 4817-4821.
- [28] Z. Zhang, B. Zhao, L. Hu. PVP Protective mechanism of ultrafine silver powder synthesized by chemical reduction processes. *Journal of Solid State Chemistry* **1996**, 121, 105-110.
- [29] J. L. Elechiguerra, L. Larios-Lopez, C. Liu, D. Garcia-Gutierrez, A. Camacho-Bragado, M. J. Yacaman. Corrosion at the nanoscale: the case of silver nanowires and nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2005**, 17, 6042-6052.
- [30] F. Kim, S. Connor, H. Song, T. Kuykendall, P. Yang. Platonic gold nanocrystals. *Angewandte Chemie* **2004**, 116, 3759-3763.
- [31] Y. Sun, B. Mayers, T. Herricks, Y. Xia. Polyol synthesis of uniform silver nanowires: a plausible growth mechanism and the supporting evidence. *Nano Letters* **2003**, 3, 955-960.
- [32] D. Pencheva, R. Bryaskova, T. Kantardjiev. Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering C* **2012**, 32, 2048-2051.
- [33] P. Vasileva, B. Donkova, I. Karadjova, C. Dushkin. Synthesis of starch-stabilized silver nanoparticles and their application as a surface plasmon resonance-based sensor of hydrogen peroxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2011**, 382, 203-210.
- [34] S. Li, W. C. Purdy. Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. *Chemical Reviews* **1992**, 92, 1457-1470.
- [35] E. M. M. Del Valle. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* **2004**, 39, 1033-1046.
-

- [36] J. Szejtli. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews* **1998**, 98, 1743-1753.
- [37] C. G. Venturini, J. Nicolini, C. Machado, V. G. Machado. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova* **2008**, 31, 360-368.
- [38] P. Raveendran, J. Fu, S. L. Wallen. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal American Chemistry Society* **2003**, 125, 13940-13941.
- [39] K. P. Bankura, D. Maity, M. M. R. Mollick, D. Mondal, B. Bhowmick, M. K. Bain, J. Sarkar, K. Acharya, D. Chattopadhyay. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium. *Carbohydrate Polymers* **2012**, 89, 1159-1165.
- [40] F. M. Reicha, A. Sarhan, M. I. Abdel-Hamid, I. M. El-Sherbiny. Preparation of silver nanoparticles in the presence of chitosan by electrochemical method. *Carbohydrate Polymers* **2012**, 89, 236-244.
- [41] E. S. Abdel-Halim, S. S. Al-Deyab. Utilization of hydroxypropyl cellulose for green and efficient synthesis of silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86, 1615-1622.
- [42] Y. Liu, S. Chen, L. Zhong, G. Wu. Preparation of high-stable silver nanoparticle dispersion by using sodium alginate as a stabilizer under gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry* **2009**, 78, 251-255.
- [43] S. Jaiswal, B. Duffy, A. K. Jaiswal, N. Stobie, P. McHale. Enhancement of the antibacterial properties of silver nanoparticles using β -cyclodextrin as a capping agent. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2010**, 36, 280-283.
- [44] X. Chen, S. G. Parker, G. Zou, W. Su, Q. Zhang. β -Cyclodextrin-functionalized silver nanoparticle for the naked eye detection of aromatic isomers. *ACS Nano* **2010**, 4, 6387-6394.
- [45] A. Abou-Okeil, A. Amr, F. A. Abdel-Mohdy. Investigation of silver nanoparticles synthesis using aminated β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers* **2012**, 89, 1-6.
- [46] N. Vigneshwaran, N. M. Ashtaputre, P. V. Varadarajan, R. P. Nachane, K. M. Paralikar, R. H. Balasubramanya. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials Letters* **2007**, 61, 1413-1418.

-
- [47] S. Sharma, N. Ahmad, A. Prakash, V. N. Singh, A. K. Ghosh, B. R. Mehta. Synthesis of crystalline Ag nanoparticles (AgNPs) from microorganisms. *Materials Sciences and Applications* **2010**, 1, 1-7.
- [48] A. Callegari, D. Tonti, M. Chergui. Photochemically grown silver nanoparticles with wavelength-controlled size and shape. *Nano Letters* **2003**, 3, 1565-1568.
- [49] J. Zou, Y. Xu, B. Hou, D. Wu, Y. Sun. Controlled growth of silver nanoparticles in a hydrothermal process. *China Particuology* **2007**, 5, 206-212.
- [50] S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song. 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* **2007**, 73, 1712-1720.
- [51] V. K. Sharma, R. A. Yngard, Y. Lin. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* **2009**, 145, 83-96.
- [52] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolár, R. Vecerová, N. Pizúrová, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 16248-16253.
- [53] D. Roe, B. Karandikar, N. Bonn-Savage, B. Gibbins, J. B. Roullet. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2008**, 61, 869-876.
- [54] L. S. Acosta-Torres, I. Mendieta, R. E. Nuñez-Anita, M. Cajero-Juárez, V. M. Castaño. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *International Journal of Nanomedicine* **2012**, 7, 4777-4786.
- [55] C. Marambio-Jones, E. M. V. Hoek. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* **2010**, 12, 1531-1551.
- [56] J. Nordberg, E. S. J. Arnér. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, 31, 1287-1312.

- [57] Y. H. Hsin, C. F. Chen, S. Huang, T. S. Shih, P. S. Lai, P. J. Chueh. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters* **2008**, 179, 130-139.
- [58] P. V. Asharani, G. L. K. Mun, M. P. Hande, S. Valiyaveetil. Cytotoxicity and genotoxicity of silver in human cells. *ACS Nano* **2009**, 3, 279-290.
- [59] O. Choi, K. K. Deng, N. J. Kim, L. Ross, R. Y. Surampalli, Z. Hu. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* **2008**, 42, 3066-3074.
- [60] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 52, 662-668.
- [61] I. Sondi, B. Salopek-Sondi. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, 275, 177-182.
- [62] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2007**, 3, 95-101.
- [63] I. Chopra. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**, 59, 587-590.
- [64] L. Y. Ng, A. W. Mohammad, C. P. Leo, N. Hilal. Polymeric membranes incorporated with metal/metal oxide nanoparticles: A comprehensive review. *Desalination* **2013**, 308, 15-33.
- [65] A. C. Habert, C. P. Borges, R. Nobrega. Processos de Separação por membranas. E-papers, Rio de Janeiro, **2006**.
- [66] M. Aroon, A. F. Ismail, M. M. Montazer-Rahmati, T. Matsuura. Morphology and permeation properties of polysulfone membranes for gas separation: Effects of non-solvent additives and co-solvent. *Separation and Purification Technology* **2010**, 72, 194-202.
- [67] H. Ohya, S. Shiki, H. Kawakami. Fabrication study of polysulfone hollow-fiber microfiltration membranes: Optimal dope viscosity for nucleation and growth. *Journal of Membrane Science* **2009**, 326, 293-302.

-
- [68] G. R. Guillen, Y. Pan, M. Li, E. M. V. Hoek. Preparation and characterization of membranes formed by nonsolvent induced phase separation a review. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2011**, 50, 3798-3817.
- [69] I. M. Wienk, R. M. Boom, M. A. M. Beerlage, A. M. W. Bulte, C. A. Smolders, H. Strathmann. Recent advances in the formation of phase inversion membranes made from amorphous or semi-crystalline polymers. *Journal of Membrane Science* **1996**, 113, 361-371.
- [70] P. van de Witte, P. J. Dijkstra, J. W. A. van den Berg, J. Feijen. Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation. *Journal of Membrane Science* **1996**, 17, 1-31.
- [71] Roberto Bentes de Carvalho, Fibras ocas compostas para nanofiltração e osmose inversa preparadas pela técnica de precipitação por imersão de duas soluções poliméricas extrusadas simultaneamente, Universidade Federal de Rio de Janeiro - COOPE/UFRJ, **(2005)**, 298.
- [72] M. Sivakumar, D. R. Mohan, R. Rangarajan. Studies on cellulose acetate-polysulfone ultrafiltration membranes - II. Effect of additive concentration. *Journal of Membrane Science* **2006**, 268, 208-219.
- [73] P. Tenke, C. R. Riedl, G. L. Jones, G. J. Williams, D. Stickler, E. Nagy. Bacterial biofilm formation on urologic devices and heparin coating as preventive strategy. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2004**, 23S1, S67-S74.
- [74] S. Y. Lee, H. J. Kim, R. Patel, S. J. Im, J. H. Kim, B. R. Min. Silver nanoparticles immobilized on thin film composite polyamide membrane: characterization, nanofiltration, antifouling properties. *Polymers for Advanced Technologies* **2007**, 18, 562-568.
- [75] V. M. Kochkodan, N. Hilal, V. V. Goncharuk, L. Al-Khatib, T. I. Lebadna. Effect of the surface modification of polymer membranes on their microbiological fouling. *Colloid Journal* **2006**, 68, 267-273.
- [76] W. J. Work, K. Horie, M. Hess, R. F. T. Stepto. Definitions of terms related to polymer blends, composites, and multiphase polymeric materials. *Pure and Applied. Chemistry* **2004**, 76, 1985-2007.
- [77] K. Zodrow, L. Brunet, S. Mahendra, D. Li, A. Zhang, Q. Li, P. J. J. Alvarez. Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. *Water Research* **2009**, 43, 715-723.

- [78] J. S. Taurozzi, H. Arul, V. Z. Bosak, A. F. Burban, T. C. Voice, M. L. Bruening, V. V. Tarabara. Effect of filler incorporation route on the properties of polysulfone-silver nanocomposite membranes of different porosities. *Journal of Membrane Science* **2008**, 325, 58-68.
- [79] D. Y. Koseoglu-Imer, B. Kose, M. Altinbas, I. Koyuncu. The production of polysulfone (PS) membrane with silver nanoparticles (AgNP): Physical properties, filtration performances, and biofouling resistances of membranes. *Journal of Membrane Science* **2013**, 428, 620-628.
- [80] I. Sawada, R. Fachrul, T. Ito, Y. Ohmukai, T. Maruyama, H. Matsuyama. Development of a hydrophilic polymer membrane containing silver nanoparticles with both organic antifouling and antibacterial properties. *Journal of Membrane Science* **2012**, 387-388, 1-6.
- [81] C. S. Meireles, G. R. Filho, M. F. Ferreira Jr., D. A. Cerqueira, R. M. N. Assunção, E. A. M. Ribeiro, P. Poletto, M. Zeni. Characterization of asymmetric membranes of cellulose acetate from biomass: Newspaper and mango seed. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 80, 954-961.
- [82] R. Abedini, S. M. Mousavi, R. Aminzadeh. A novel cellulose acetate (CA) membrane using TiO₂ nanoparticles: Preparation, characterization and permeation study. *Desalination* **2011**, 277, 40-45.
- [83] C. Lv, Y. Su, Y. Wang, X. Ma, Q. Sun, Z. Jiang. Enhanced permeation performance of cellulose acetate ultrafiltration membrane by incorporation of Pluronic F127. *Journal of Membrane Science* **2007**, 294, 68-74.
- [84] W. L. Chou, D. G. Yu, M. C. Yang. The preparation and characterization of silver-loading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment. *Polymers for Advanced Technologies* **2005**, 16, 600-607.
- [85] W. K. Son, J. H. Youk, W. H. Park. Antimicrobial cellulose acetate nanofibers containing silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **2006**, 65, 430-434.
- [86] W. K. Son, J. H. Youk, T. S. Lee, W. H. Park. Preparation of Antimicrobial Ultrafine Cellulose Acetate Fibers with Silver Nanoparticles. *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, 25, 1632-1637.
- [87] D. R. Monteiro, L. F. Gorup, A. S. Takamiya, A. C. Ruvollo-Filho, E. R. de Camargo, D. B. Barbosa. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2009**, 34, 103-110.

-
- [88] X. Xu, Q. Yang, Y. Wang, H. Yu, X. Chen, X. Jing. Biodegradable electrospun poly(l-lactide) fibers containing antibacterial silver nanoparticles. *European Polymer Journal* **2006**, 42, 2081-2087.
- [89] X. Zhu, R. Bai, K. H. Wee, C. Liu, S. L. Tang. Membrane surfaces immobilized with ionic or reduced silver and their anti-biofouling performances. *Journal of Membrane Science* **2010**, 363, 278-286.
- [90] Y. M. Mohan, K. Vimala, V. Thomas, K. Varaprasad, B. Sreedhar, S. K. Bajpai, K. M. Raju. Controlling of silver nanoparticles structure by hydrogel networks. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, 342, 73-82.
- [91] U. Samuel, J. P. Guggenbichler. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2004**, 23S1, S75-S78.
- [92] D. A. Ladner, M. Steele, A. Weir, K. Hristovski, P. Westerhoff. Functionalized nanoparticle interactions with polymeric membranes. *Journal of Hazardous Materials* **2012**, 211-212, 288-295.
- [93] C. Zhao, J. Xue, F. Ran, S. Sun. Modification of polyethersulfone membranes – A review of methods. *Progress in Materials Science* **2013**, 58, 76-150.
- [94] H. Wang, X. Qiao, J. Chen, X. Wang, S. Ding. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics* **2005**, 94, 449-453.
- [95] H. Basri, A. F. Ismail, M. Aziz. Polyethersulfone (PES)–silver composite UF membrane: effect of silver loading and PVP molecular weight on membrane morphology and antibacterial activity. *Desalination* **2011**, 273, 72–80.
- [96] R. B. Romero, C. A. P. Leite, M. D. C. Gonçalves. The effect of the solvent on the morphology of cellulose acetate/montmorillonite nanocomposites. *Polymer* **2009**, 50, 161-170.
- [97] E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, H. J. Shadomy. Manual of Clinical Microbiology. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., **1985**.
- [98] T. Dadosh. Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size. *Materials Letters* **2009**, 63, 2236-2238.
- [99] T. Endo, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa. Quantitative determination of hydrogen peroxide using polymer coated Ag nanoparticles. *Measurement* **2008**, 41, 1045-1053.
-

- [100] V. Uvarov, I. Popov. Metrological characterization of X-ray diffraction methods at different acquisition geometries for determination of crystallite size in nano-scale materials. *Materials Characterization* **2013**, 85, 111-123.
- [101] T. C. Deivaraj, N. L. Lala, J. Y. Lee. Solvent-induced shape evolution of PVP protected spherical silver nanoparticles into triangular nanoplates and nanorods. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 289, 402-409.
- [102] N. Sheikh, A. Akhavan, M. Z. Kassaei. Synthesis of antibacterial silver nanoparticles by γ -irradiation. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2009**, 42, 132-135.
- [103] C. Luo, Y. Zhang, X. Zeng, Y. Zeng, Y. Wang. The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 288, 444-448.
- [104] B. He, J. J. Tan, K. Y. Liew, H. Liu. Synthesis of size controlled Ag nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2004**, 221, 121-126.
- [105] D. Kim, S. Jeong, J. Moon. Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. *Nanotechnology* **2006**, 17, 4019-4024.
- [106] G. K. Vertelov, Y. A. Krutyakov, O. V. Efremenkova, A. Y. Olenin, G. V. Lisichkin. A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2008**, 19, 1-7.
- [107] H. S. Shin, H. J. Yang, S. B. Kim, M. S. Lee. Mechanism of growth of colloidal silver nanoparticles stabilized by polyvinyl pyrrolidone in γ -irradiated silver nitrate solution. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, 274, 89-94.
- [108] T. M. D. Dang, T. T. T. Le, E. Fribourg-Blanc, M. C. Dang. Influence of surfactant on the preparation of silver nanoparticles by polyol method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2012**, 3, 1-4.
- [109] K. S. Chou, C. Y. Ren. Synthesis of nanosized silver particles by chemical reduction method. *Materials Chemistry and Physics* **2000**, 64, 241-246.
- [110] T. Zhao, R. Sun, S. Yu, Z. Zhang, L. Zhou, H. Huang, R. Du. Size-controlled preparation of silver nanoparticles by a modified polyol method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, 366, 197-202.

- [111] C. George, S. Kuriakose, B. Prakashkumar, T. Mathew. Synthesis, characterisation and antibacterial applications of water-soluble, silver nanoparticle-encapsulated β -cyclodextrin. *Supramolecular Chemistry* **2010**, 22, 511-516.
- [112] P. R. Gopalan. Cyclodextrin-stabilized metal nanoparticles: synthesis and characterization. *International Journal of Nanoscience* **2010**, 9, 487-494.
- [113] P. R. Gopalan, A. G. Annaselvi, P. Subramaniam. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin capped silver nanoparticles. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2013**, 3, 26-30.
- [114] O. Egyed. Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. *Vibrational Spectroscopy* **1990**, 1, 225-227.
- [115] H. J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda. NMR Studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical Reviews* **1998**, 98, 1755-1785.
- [116] E. Gaidamauskas, E. Norkus, E. Butkus, D. C. Crans, G. Grinciene. Deprotonation of β -cyclodextrin in alkaline solutions. *Carbohydrate Research* **2009**, 344, 250-254.
- [117] W. Li, B. Lu, A. Sheng, F. Yang, Z. Wang. Spectroscopic and theoretical study on inclusion complexation of β -cyclodextrin with permethrin. *Journal of Molecular Structure* **2010**, 981, 194-203.
- [118] Y. Liu, K. B. Male, P. Bouvrette, J. H. T. Luong. Control of the size and distribution of gold nanoparticles by unmodified cyclodextrins. *Chemistry Materials* **2003**, 15, 4172-4180.
- [119] S. Pande, S. K. Ghosh, S. Praharaj, S. Panigrahi, S. Basu, S. Jana, et al. Synthesis of normal and inverted gold-silver core-shell architectures in β -cyclodextrin and their applications in SERS. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, 10806-10813.
- [120] P. K. Khanna, N. Singh, S. Charan, A. K. Viswanath. Synthesis of Ag/polyaniline nanocomposite via an in situ photo-redox mechanism. *Materials Chemistry and Physics* **2005**, 92, 214-219.
- [121] P. K. Khanna, N. Singh, S. Charan, V. V. S. Subbarao, R. Gokhale, U. P. Mulik. Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method. *Materials Chemistry and Physics* **2005**, 93, 117-121.

- [122] A. Mollahosseini, A. Rahimpour, M. Jahamshahi, M. Peyravi, M. Khavarpour. The effect of silver nanoparticle size on performance and antibacteriability of polysulfone ultrafiltration membrane. *Desalination* **2012**, 306, 41-50.
- [123] A. I. Schäfer, I. Akanyeti, A. J. C. Semião. Micropollutant sorption to membrane polymers: a review of mechanisms for estrogens. *Advances in Colloid and Interface Science* **2011**, 164, 100-117.
- [124] G. Chen, H. Hu, T. Wu, P. Tong, B. Liu, B. Zhu, y. Du. Rapid and sensitive determination of plasticizer diethylhexyl phthalate in drink by diffuse reflectance UV spectroscopy coupled with membrane filtration. *Food Control*. **2014**, 35, 218-222.
- [125] V. Vatanpour, S. S. Madaeni, A. R. Khataee, E. Salehi, S. Zinadini, H. A. Monfared. TiO₂ embedded mixed matrix PES nanocomposite membranes: Influence of different sizes and types of nanoparticles on antifouling and performance. *Desalination* **2012**, 292, 19-29.
- [126] X. Cao, M. Tang, F. Liu, Y. Nie, C. Zhao. Immobilization of silver nanoparticles onto sulfonated polyethersulfone membranes as antibacterial materials. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* **2010**, 81, 555-562.
- [127] J. Kim, M. Kang, C. K. Kim. Fabrication of membranes for the liquid separation Part 1. Ultrafiltration membranes prepared from novel miscible blends of polysulfone and poly(1-vinylpyrrolidone-co-acrylonitrile) copolymers. *Journal of Membrane Science* **2005**, 265, 167-175.
- [128] E. J. Moon, J. W. Kim, C. K. Kim. Fabrication of membranes for the liquid separation Parte 2: Microfiltration membranes prepared from immiscible blends containing polysulfone and poly(1-vinylpyrrolidone-co-acrylonitrile) copolymers. *Journal of Membrane Science* **2006**, 274, 244-251.
- [129] Y. Furushima, K. Ishikiriya, Y. Ueno, H. Sugaya. Analysis of the state of water in polyvinylpyrrolidone aqueous solutions using DSC method. *Thermochimica Acta* **2012**, 538, 43-47.
- [130] Y. Yang, H. Zhang, P. Wang, Q. Zheng, J. Li. The influence of nano-sized TiO₂ fillers on the morphologies and properties of PSF UF membrane. *Journal of Membrane Science* **2007**, 288, 231-238.
- [131] H. Basri, A. F. Ismail, M. Aziz, K. Nagai, T. Matsuura, M. S. Abdullah, B. C. NG. Silver-filled polyethersulfone membranes for antibacterial applications - effect of PVP and TAP addition on silver dispersion. *Desalination* **2010**, 261 264-271.

- [132] J. F. Li, Z. L. Xu, H. Yang, L. Y. Yu, M. Liu. Effect of TiO₂ nanoparticles on the surface morphology and performance of microporous PES membrane. *Applied Surface Science* **2009**, 255, 4725-4732.
- [133] L. Wan, Z. Xu, Z. Wang. Leaching of PVP from polyacrylonitrile/PVP blending membranes: A comparative study of ssymmetric and dense membranes. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. **2006**, 44, 1490-1498.
- [134] L. Y. Lafrenière, F. D. F. Talbot, T. matsuura, S. Sourirajan. Effect of Polyvinylpyrrolidone Additive on the Performance of Polyethersulfone Ultrafiltration Membranes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1987**, 26, 2385-2389.
- [135] S. A. Al Malek, M. N. Abu Seman, D. Johnson, N. Hilal. Formation and characterization of polyethersulfone membranes using different concentrations of polyvinylpyrrolidone. *Desalination* **2012**, 288, 31-39.
- [136] B. Tylkowski, B. Trusheva, V. Bankova, M. Giamberini, G. Peev, A. Nikolova. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. *Journal of Membrane Science* **2010**, 348, 124-130.
- [137] J. Zhang, Y. Zhang, Y. Chen, L. Du, B. Zhang, H. Zhang, J. Liu, K. Wang. Preparation and characterization of novel polyethersulfone hybrid ultrafiltration membranes bending with modified halloysite nanotubes loaded with silver nanoparticles. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2012**, 51, 3081-3090.
- [138] D. Zhao, Q. Feng, L. Lv, J. Li. Fabrication and Characterization of cellulose acetate ultrafine fiber containing silver nanoparticles by electrospinning. *Advanced Materials Research* **2011**, 337, 116-119.
- [139] J. W. Kwon, S. H. Yoon, S. S. Lee, K. W. Seo, I. W. Shim. Preparation of silver nanoparticles in cellulose acetate polymer and the reaction chemistry of silver complexes in the polymer. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2005**, 26, 837-840.
- [140] R. M. Rasal, A. V. Janorkar, D. E. Hirt. Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science* **2010**, 35, 338-356.
- [141] J. Song, N. L. Birbach, J. P. Hinestroza. Deposition of silver nanoparticles on cellulosic fibers via stabilization of carboxymethyl groups. *Cellulose* **2012**, 19, 411-424.

-
- [142] A. N. Vasiliev, E. A. Gulliver, J. G. Khinast, R. E. Riman. Highly dispersible polymer-coated silver nanoparticles. *Surface and Coatings Technology* **2009**, 203, 2841-2844.
- [143] G. M. Raghavendra, T. Jayaramudu, K. Varaprasad, R. Sadiku, S. S. Ray, K. M. Raju. Cellulose-polymer-Ag nanocomposite fibers for antibacterial fabrics/skin scaffolds. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 93, 553-560.
- [144] V. V. Vodnik, D. K. Božanić, E. Džunuzović, J. Vuković, J. M. Nedeljković. Thermal and optical properties of silver-poly(methylmethacrylate) nanocomposites prepared by in-situ radical polymerization. *European Polymer Journal* **2010**, 46, 137-144.
- [145] C. W. Chou, S. Hsu, H. Chang, S. M. Tseng, H. R. Lin. Enhanced thermal and mechanical properties and biostability of polyurethane containing silver nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability* **2006**, 91, 1017-1024.
- [146] C. Varsha, S. K. Bajpai, C. Navin. Investigation of water vapour permeation and antibacterial properties of nano silver loaded cellulose acetate film. *International Food Research Journal* **2010**, 17, 623-639.
- [147] S. S. Madaeni, A. A. Tina. Preparation and characterization of microfiltration membrane embedded with silver nanoparticles. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering* **2010**, 29, 105-111.
- [148] N. D. Luong, Y. Lee, J. D. Nam. Highly-loaded silver nanoparticles in ultrafine cellulose acetate nanofibrillar aerogel. *European Polymer Journal* **2008**, 44, 3116-3121.
- [149] S. Anitha, B. Brabu, D. J. Thiruvadigal, C. Gopalakrishnan, T. S. Natarajan. Optical, bactericidal and water repellent properties of electrospun nanocomposite membranes of cellulose acetate and ZnO. *Carbohydrate Polymers* **2012**, 87, 1065-1072.
- [150] L. Chen, L. Bromberg, T. A. Hatton, G. C. Rutledge. Electrospun cellulose acetate fibers containing chlorhexidine as a bactericide. *Polymer* **2008**, 49, 1266-1275.
- [151] M. M. Castillo-Ortega, A. G. Montaña-Figueroa, D. E. Rodríguez-Félix, G. T. Munive, P. J. Herrera-Franco. Amoxicillin embedded in cellulose acetate-poly(vinyl pyrrolidone) fibers prepared by coaxial electrospinning: Preparation and characterization. *Materials Letters* **2012**, 76, 250-254.
- [152] M. M. F. Ferrarezi, G. V. Rodrigues, M. I. Felisberti, M. D. C. Gonçalves. Investigation of cellulose acetate viscoelastic properties in different solvents and microstructure. *European Polymer Journal* **2013**, 49, 2730-2737.
-

- [153] L. R. Brandão, I. V. P. Yoshida, M. I. Felisberti, M. D. C. Gonçalves. Preparation and characterization of cellulose acetate/polysiloxane composites. *Cellulose* **2013**, 20, 2791-2802.
- [154] G. A. Martínez-Castañón, N. Niño-Martínez, F. Martínez-Gutierrez, J. R. Martínez-Mendoza, F. Ruiz. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research* **2008**, 10, 1343-1348.
- [155] W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, Y. H. Park. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, 74, 2171-2178.
- [156] H. V. Tran, L. D. Tran, C. T. Ba, H. D. Vu, T. N. Nguyen, D. G. Pham, D. G. Pham, P. X. Nguyen. Synthesis, characterization, antibacterial and antiproliferative activities of monodisperse chitosan based silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering* **2010**, 360, 32-40.
- [157] M. Raffi, F. Hussain, T. M. Bhati, J. I. Akhter, A. Hameed, M. M. Hasan. antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. Coli* ATCC-15224. *Journal of Materials Science & Technology* **2008**, 24, 192-196.
- [158] W. R. Li, X. B. Xie, Q. S. Shi, H. Y. Zeng, Y. S. Ou-Yang, Y. B. Chen. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, 85, 1115-1122.
- [159] C. F. Murray, R. G. E. Brenner, D. J. Bryant, M. P.; Holt, J.G. Krieg, N. R. Moulder, J. W. Pfennig, N. Sneath, P. H. A. Staley, J. T. Lapage, S. P. Lautop, H. Liston, J. Niven, Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, 1st ed., **1984**.
- [160] M. Zhang, K. Zhang, B. De Gusseme, W. Verstraete. Biogenic silver nanoparticles (bio-Ag⁰) decrease biofouling of bio-Ag⁰/PES nanocomposite membranes. *Water Research* **2012**, 46, 2077-2087.
- [161] P. Jain, T. Pradeep. Potential of silver nanoparticle coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 90, 59-63.