

PATRÍCIA ÉRICA FERNANDES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F363s
2014

Fernandes, Patrícia Érica, 1981-

Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata / Patrícia Érica Fernandes. – Viçosa, MG, 2014.

xii, 87f. : 1. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nélío José de Andrade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Nanopartículas. 2. Nanopartículas de prata - Efeito antimicrobiano. 3. Nanopartículas de prata - Síntese.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

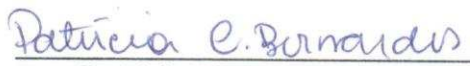
CDD 22 ed. 620.18923

PATRÍCIA ÉRICA FERNANDES

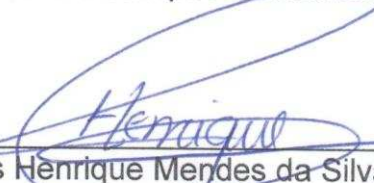
**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AÇÃO ANTIMICROBIANA
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 1º de agosto de 2014.


Patrícia Campos Bernardes


Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto


Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)


Hilário Cuquetto Mantovani
(Coorientador)


Nélcio José de Andrade
(Orientador)

À minha amada avó, Lilita,
exemplo de bondade e amor sincero.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e pela presença constante em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento dessa pesquisa.

Ao professor Nélcio José de Andrade, pelos ensinamentos, pela amizade, orientação durante todos esses anos, incentivo e pela confiança.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pelas sugestões, valorização do trabalho, pela disponibilidade e conhecimentos proporcionados.

Ao professor Luis Henrique Mendes da Silva, pelos ensinamentos proporcionados e valiosas sugestões.

Ao professor Wilmer Edgard pela preciosa colaboração, ensinamentos e sugestões.

Ao professor Álvaro Vianna N. de C. Teixeira, pela ajuda, ensinamentos e pela disposição.

Aos professores Luís Antônio Minin, Paulo César Stringheta e Regina Célia S. Mendonça, pela disponibilização dos equipamentos.

Ao professor Leandro Licursi, pela preciosa ajuda e pela disposição.

À professora Patrícia Campos Bernardes, pela participação na banca examinadora, pelos conselhos e, sobretudo pela amizade ao longo desses anos.

À Dr.^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Às estagiárias Maíra e Daiene, pelo esforço, dedicação, pela valiosa ajuda na condução do trabalho e pela amizade.

À Priscila Fidelis, pela valiosa ajuda e pela disposição.

Ao Natan e à Roberta Teodoro, pela preciosa ajuda, pela amizade e pela companhia agradável.

Aos meus pais Sebastião e Rita, pelo amor incondicional, pela ajuda, pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus filhos Lucas e Gabriel, simplesmente por existirem e fazerem parte da minha vida.

Ao meu esposo André, pelo amor e carinho durante todos esses anos.

Aos meus irmãos André e Leandro, pela amizade, apoio e por acreditarem em mim.

À minha sogra Penha, pelo incentivo e por cuidar muito bem dos meus filhos.

Às minhas cunhadas Ana Paula, Carolina, Fabiana e Virgínia, pela amizade.

À minha família, pelo apoio e incentivo.

Ao meu amigo João, pelo apoio, incentivo, pelos conselhos e principalmente pela amizade.

Aos colegas de Laboratório, Elaine Figueredo, Evenlyn, Hiasmyne, Juninho, Jorge, Guilherme e Poliana, pela convivência agradável.

Aos profissionais do Centro de Microscopia da UFMG, pela ajuda e disposição,

Aos funcionários do DTA/UFV, especialmente, Geralda, Poliana, Pio e Valério pela colaboração.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

PATRÍCIA ÉRICA FERNANDES, filha de Sebastião Fausto Fernandes e Rita Maria Lopes da Silva Fernandes, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 27 de janeiro de 1981. Em 2003, iniciou o curso em Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em agosto de 2007. Nesse mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 3 de fevereiro de 2010. Neste mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado em Ciência Tecnologia de Alimentos, na mesma instituição, submetendo-se à defesa da tese em 1º de agosto de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Síntese de nanopartículas metálicas	3
2.2. Estabilidade de nanopartículas	6
2.3. Potencial zeta (ζ)	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. Síntese e revestimento das nanopartículas de prata	8
3.1.1. Síntese de nanopartículas de prata com citrato de sódio (Ag-NPC)..	8
3.1.2. Síntese de nanopartículas de prata com borohidreto de sódio (Ag-NPB)	9
3.1.3. Revestimento das nanopartículas de prata	9
3.2. Caracterização físico-química das nanopartículas de prata	9
3.2.1. Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)	9
3.2.2. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	10
3.2.3. Potencial zeta (ζ)	10
3.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	11
3.2.5. Absorção atômica	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1. Espectroscopia de UV-Vis	12
4.2. Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de prata	14
4.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	15
5. CONCLUSÃO	18
6. REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Considerações gerais	24
2.2. Mecanismos de ação da prata	25
2.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação de lipídeos	27

2.4. Adesão microbiana e formação de biofilmes	28
2.5. Hidrofobicidade	29
2.5.1. Medida do ângulo de contato	30
2.6. Modelos matemáticos para descrever a cinética e a inativação microbiana	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Síntese e revestimento das nanopartículas de prata	35
3.2. Determinação do espectro de ação	36
3.2.1. Preparo do inóculo.....	36
3.2.2. Inoculação das placas e leitura dos resultados	37
3.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Bactericida (CMB).....	37
3.4. Determinação da adesão microbiana	38
3.5. Determinação da hidrofobicidade	39
3.6. Microscopia eletrônica de transmissão/espectroscopia de energia dispersiva de raio-x (MET/EDS)	41
3.7. Efeito de agentes antioxidantes na atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata e do nitrato de prata	42
3.8. Peroxidação de lipídeos.....	42
3.9. Liberação de íons Ag^+ a partir das nanopartículas de prata	43
3.10. Cinética de inativação.....	43
3.10.1. Ajuste dos modelos cinéticos	44
3.11. Análise estatística	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata e do nitrato de prata sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas	45
4.1.1. Inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar	45
4.1.2. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Bactericida (CMB)	46
4.1.3. Efeito de concentrações subinibitórias de nanopartículas de prata e de nitrato de prata na adesão microbiana	49
4.1.3.1. Análise da energia livre global de interação hidrofóbica ($\Delta G_{\text{sas}}^{\text{TOT}}$)	53
4.2. Modo de ação das nanopartículas de prata e do nitrato de prata sobre células microbianas	55
4.2.1. Microscopia eletrônica de transmissão/espectroscopia de energia dispersiva de raio-x (MET/EDS)	55
4.2.2. Efeito de agentes antioxidantes sobre a atividade bactericida das nanopartículas de prata e do nitrato de prata	63
4.2.3. Peroxidação de lipídeos	65
4.2.4. Liberação de íons Ag^+ pelas nanopartículas de prata	66

4.3. Cinética de inativação de células planctônicas de <i>P. aeruginosa</i> tratadas com nanopartículas de prata ou com nitrato de prata sob diferentes condições.....	68
4.3.1. Em água deionizada a 25 °C	68
4.3.2. Em água deionizada a 37 °C	71
4.2.3. Em caldo <i>Müller-Hinton</i> a 37 °C.....	73
5. CONCLUSÃO	78
6. REFERÊNCIAS.....	78
CONCLUSÃO GERAL	87

RESUMO

FERNANDES, Patrícia Érica, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2014. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata.** Orientador: Nélcio José de Andrade. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani, Luis Henrique Mendes da Silva e Wilmer Edgard Luera Peña.

Nanopartículas de prata (Ag-NPs) têm sido amplamente incorporadas em diversos produtos como têxteis, utensílios domésticos, produtos médicos, produtos de higiene pessoal e embalagens de alimentos, devido a sua conhecida atividade antimicrobiana e seu amplo espectro de ação. O efeito antimicrobiano das Ag-NPs é bem estabelecido, no entanto, seu mecanismo de ação antimicrobiana não está totalmente esclarecido. Além disso, é importante compreender melhor o efeito das Ag-NPs na adesão microbiana. Os objetivos desta pesquisa foram: 1) determinar o efeito antimicrobiano e os prováveis mecanismos de ação das Ag-NPs e dos íons Ag^+ , provenientes do nitrato de prata (AgNO_3), sobre espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, 2) determinar o efeito de concentrações subinibitórias de Ag-NPs e de íons Ag^+ na adesão microbiana, 3) caracterizar a cinética de inativação de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com Ag-NPs e com íons Ag^+ sob diferentes condições. As Ag-NPs foram sintetizadas com citrato de sódio (Ag-NPC) ou borohidreto de sódio (Ag-NPB) como agentes redutores e revestidas com polivinilpirrolidona ou carboximetilcelulose. A caracterização das Ag-NPs foi feita por espectroscopia na região do ultravioleta e visível, espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta (ζ), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e absorção atômica. Ambas Ag-NPs apresentaram ressonância plasmônica de superfície típica o que confirmou a formação das mesmas durante a síntese. O tamanho médio determinado por DLS foi $3,4 \pm 1,2$ nm para Ag-NPC e $3,1 \pm 0,9$ nm para as Ag-NPB. O tamanho das Ag-NPC observado por MET foi de 3,86 nm corroborando com o resultado obtido por DLS. O potencial ζ das Ag-NPC e Ag-NPB foi de $-31,9 \pm 8,6$ mV e $-33,2 \pm 1,7$ mV, respectivamente. As bactérias gram-negativas foram mais sensíveis às Ag-NPC e ao AgNO_3 do que as bactérias gram-positivas. A presença das Ag-NPC em concentrações subinibitórias diminuiu a adesão de *P. aeruginosa* em

superfícies de poliestireno. Entretanto, concentrações subinibitórias de Ag-NPC ou AgNO₃ aumentaram a adesão das bactérias gram-positivas em comparação com o grupo controle, provavelmente, em resposta ao estresse. Por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão/Energia Dispersiva de raios-X, observou-se que a prata penetra nas células de *P. aeruginosa* e de *Staphylococcus aureus* e complexa com enxofre e fósforo, formando-se uma região de condensação no centro das bactérias. Os danos causados em *S. aureus* foram menos intensos comparados aos danos provocados em *P. aeruginosa*. As Ag-NPC e o AgNO₃ perderam a atividade antimicrobiana na presença de substâncias antioxidantes, sugerindo o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ERO) na sua atividade antimicrobiana. Entretanto, não foi verificada peroxidação de lipídeos nas células tratadas com Ag-NPC ou AgNO₃. Os resultados utilizando-se membranas de diálise indicaram que a atividade antimicrobiana das Ag-NPC está relacionada com a liberação de íons Ag⁺. As cinéticas de inativação de células planctônicas de *P. aeruginosa* foram ajustadas por modelos bifásicos, o que demonstrou uma heterogeneidade na resistência microbiana. O tempo de inativação microbiana diminuiu com o aumento da concentração de prata e da temperatura. A atividade antimicrobiana das Ag-NPC e do AgNO₃ foi reduzida em meio de cultura comparado com suas atividades em água, provavelmente, pela complexação das Ag-NPC ou do AgNO₃ com os constituintes do meio, como enxofre e fosfatos.

ABSTRACT

FERNANDES, Patrícia Érica, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2014. **Synthesis, characterization and antimicrobial action of silver nanoparticles.** Adviser: Nélcio José de Andrade. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani, Luis Henrique Mendes da Silva and Wilmer Edgard Luera Peña.

Silver nanoparticles (Ag-NPs) have been widely incorporated into various products such as textiles, household items, medical products, toiletries and food packaging because of its known antimicrobial activity and its broad spectrum of action. The antimicrobial effect of Ag-NPs is well established, however, their antimicrobial mechanism of action is not fully understood. Furthermore, it is important to better understand the effect of Ag-NP in microbial adhesion. The objectives of this study were 1) to determine the antimicrobial effect and probable mechanisms of action of Ag-NPs and Ag^+ ions, from the silver nitrate (AgNO_3), on species of gram-positive and gram-negative bacteria; 2) to determine the effect of subinhibitory concentrations of Ag-NPs and Ag^+ ions on microbial adhesion, 3) characterize the inactivation kinetics of planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* treated with Ag-NPs and Ag^+ ions under different conditions. The Ag-NPs were synthesized with sodium citrate (Ag-NPC) or sodium borohydride (Ag-NPB) as reducing agents and coated with polyvinylpyrrolidone or carboxymethylcellulose. The characterization of Ag-NPs was made by spectroscopy in the ultraviolet and visible, dynamic light scattering (DLS), zeta potential (ζ), transmission electron microscopy (TEM) and atomic absorption. Both Ag-NPs showed typical surface plasmon resonance, which confirmed their formation during the synthesis. The average particle size determined by DLS was 3.4 ± 1.2 nm for the Ag-NPC and 3.1 ± 0.9 nm for the Ag-NPB. The size of the Ag-NPC observed by TEM was 3.86 nm confirming the result obtained by DLS. The potential ζ of Ag-NPC and Ag-NPB was -31.9 ± 8.6 mV and -33.2 ± 1.7 mV, respectively. Gram-negative bacteria are more sensitive to Ag-NPC and AgNO_3 than gram-positive bacteria. The presence of Ag-NPC at subinhibitory concentrations decreased the adherence of *P. aeruginosa* onto polystyrene surfaces. However, subinhibitory concentrations of Ag-NPC or AgNO_3 increased adhesion of gram-positive bacteria compared with

the control group, probably in response to stress. Through Transmission Electron Microscopy / Energy Dispersive X-rays, it was observed that the silver penetrates in *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells and complex with sulfur and phosphorus, forming a condensation region in the center of the bacteria. Damage to *S. aureus* was less intense compared to the damage in *P. aeruginosa*. The Ag-NPC and the AgNO₃ lost their antimicrobial activity in the presence of antioxidants agents, suggesting the involvement of reactive oxygen species (ROS) in its antimicrobial activity. However, it was not verified lipid peroxidation in cells treated with Ag-NPC or AgNO₃. The results using dialysis membranes indicated that the antimicrobial activity of Ag-NPC is related to the release of Ag⁺ ions. The kinetics of inactivation of planktonic cells of *P. aeruginosa* was adjusted for biphasic model, which demonstrated heterogeneity in microbial resistance. The microbial inactivation time decreased with increasing of silver concentration and temperature. The antimicrobial activity of Ag-NPC and AgNO₃ was reduced in culture medium compared to its activity in water, probably due to the complexation of Ag-NPC or AgNO₃ with the medium constituents such as sulfur and phosphates.

INTRODUÇÃO GERAL

Considerando o aumento de micro-organismos multirresistentes aos antibióticos, pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de desenvolver novos agentes antimicrobianos para o controle de micro-organismos de importância para a medicina humana, veterinária e para a indústria de alimentos. Tal problema tem levado ao ressurgimento do uso de antissépticos à base de prata, que possuem amplo espectro antimicrobiano e são menos propensos a selecionar estirpes bacterianas resistentes em comparação a alguns antibióticos utilizados para fins terapêuticos. De acordo com Kim et al. (2007), o problema mais importante causado por agentes antimicrobianos químicos é o desenvolvimento de resistência multidrogas.

Com o advento da nanotecnologia, muitos pesquisadores têm proposto o uso da prata, na forma de nanopartículas, como potencial agente antimicrobiano, associado ao seu tamanho reduzido (<100 nm) e grande área superficial. Não está claro se as Ag-NPs apresentam um mecanismo de ação específico, ou se sua atividade antimicrobiana está somente associada à liberação de íons Ag^+ , que é a forma bioativa. Ao compreender a base do mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos, é possível identificar combinações potencialmente sinérgicas com outros biocidas, ou mesmo indicar um melhor agente antimicrobiano no caso de resistência microbiana.

Nesse contexto, objetivou-se sintetizar, caracterizar e avaliar o efeito antimicrobiano de Ag-NPs sobre diferentes espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas por diferentes metodologias e comparar a atividade antimicrobiana das Ag-NPs com a atividade antimicrobiana dos íons Ag^+ .

CAPÍTULO 1

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

RESUMO: O tamanho e a carga superficial das Ag-NPs apresentam papel importante na sua atividade antimicrobiana e tem sido demonstrado boa correlação entre a inibição microbiana e a fração de Ag-NPs com tamanhos menores que 5 nm. O objetivo foi sintetizar Ag-NPs por redução química com citrato de sódio (Ag-NPC) ou borohidreto de sódio (Ag-NPB) como agentes redutores e caracterizá-las por diferentes técnicas. As Ag-NPs obtidas foram revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) e com carboximetilcelulose (CMC) e foram caracterizadas por espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta (ζ), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e absorção atômica. Ambas Ag-NPs apresentaram ressonância plasmônica de superfície típica, o que confirmou a formação delas nas dispersões coloidais. Ambas Ag-NPs apresentaram tamanhos similares por DLS, $3,4 \pm 1,2$ nm para Ag-NPC e $3,1 \pm 0,9$ nm para as Ag-NPB. O tamanho das Ag-NPC observado por MET foi de $3,86 \pm 0,43$ nm corroborando com o resultado obtido por DLS. O potencial ζ das Ag-NPC e das Ag-NPB foi de $-31,9 \pm 8,6$ mV e $-33,2 \pm 1,7$ mV, respectivamente, indicando que as nanopartículas apresentam boa estabilidade na ausência de agentes estabilizadores. A adição de PVP aumentou o potencial ζ das Ag-NPC e das Ag-NPB para $-21,9 \pm 2,8$ mV e $-19,4 \pm 0,3$ mV, respectivamente. A adição de CMC diminuiu o potencial ζ das Ag-NPC e das Ag-NPB para $-58,8 \pm 6,9$ mV e $-73,9 \pm 6,0$ mV, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

Associado à sua grande área superficial e alta reatividade, partículas metálicas na escala nanométrica apresentam notáveis propriedades físicas, químicas e biológicas (LOK et al., 2007). Nanopartículas com tamanho entre 1 e 100 nm em pelo menos uma dimensão têm aplicações versáteis em muitos produtos (LEE et al., 2012). Dentre os nanomateriais mais importantes, as Ag-NPs destacam-se devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana e seus efeitos de ressonância plasmônica de superfície (SONG et al., 2009). Essas nanopartículas têm sido amplamente utilizadas em instrumentos cirúrgicos, próteses, válvulas cardíacas, tecidos, produtos de higiene pessoal e recipientes para alimentos. As Ag-NPs podem ser obtidas por vários métodos de síntese, entretanto, a síntese por redução química é a mais comumente

utilizada e pode produzir nanopartículas com diferentes formas e tamanhos. É bem documentado na literatura que a atividade antimicrobiana das Ag-NPs é influenciada pelo tamanho e forma das partículas, sendo as menores (~ 5 nm) e com estrutura triangular as mais eficientes. Também há relatos de que as cargas das Ag-NPs influenciam sua atividade antimicrobiana, sendo as positivamente carregadas as mais eficientes.

Objetivou-se sintetizar Ag-NPs por duas rotas, usando citrato de sódio ou borohidreto de sódio como agentes redutores; caracterizar as Ag-NPs obtidas por espectroscopia de UV-Vis, para confirmar a sua formação; determinar o tamanho e a carga das Ag-NPs por espalhamento dinâmico de luz e medida do potencial zeta, respectivamente; determinar o tamanho e forma por microscopia eletrônica de transmissão; determinar a concentração de prata nas dispersões coloidais por absorção atômica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Síntese de nanopartículas metálicas

Na síntese coloidal, as nanopartículas são produzidas na fase líquida. A primeira síntese coloidal de nanopartículas metálicas documentada foi realizada por Faraday, em meados do século XIX. Desde então, um amplo conjunto de métodos foi desenvolvido para a produção de nanopartículas coloidais. Entretanto, apenas nos últimos 30 anos, os métodos modernos de síntese e as técnicas de caracterização foram aprimorados. Assim, foi possível a obtenção de amostras de nanopartículas de diferentes materiais com alta qualidade e controle fino de suas características, como tamanho, composição química e formas, como prismas, bastões, cubos, cilindros e discos, entre outros (ZHAO et al., 2007).

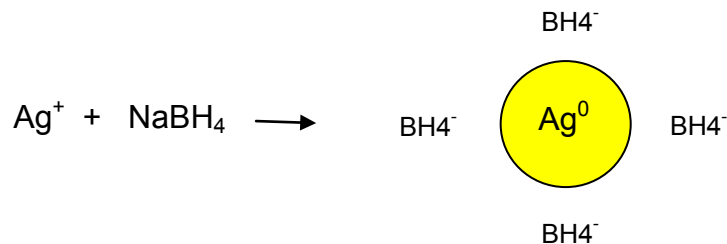
Há diversos métodos relatados na literatura para a síntese de nanopartículas em fase líquida. Apesar de cada método possuir características específicas, de modo geral, a síntese coloidal de nanopartículas se baseia em quatro componentes: meio, precursor, agente redutor e estabilizante. Assim, o meio é a fase líquida onde a reação ocorrerá. O composto químico que irá fornecer o metal é o precursor, geralmente o sal do metal, no caso de

nanopartículas metálicas. O agente redutor é geralmente um composto químico que fornece elétrons e que reduzirá o íon, transformando-o na espécie metálica. O agente estabilizante ou de revestimento é a molécula que recobre a superfície das nanopartículas, mantendo-as afastadas e dispersas no meio (ROCHA, 2008).

O método mais comum para sintetizar nanopartículas de ouro é o método de Turkevich, que envolve a redução do ácido cloráutico com citrato de sódio, produzindo partículas de 10 nm e com estreita distribuição de tamanho (EVANOFF; CHUMANOV, 2005). Um método comum para obtenção de Ag-NPs é o método de Lee e Meisel, em que nitrato de prata (AgNO_3) é usado como fonte do metal. Esse método é uma variação do método de Turkevich, porém produz partículas com ampla distribuição de tamanhos. Outro método comum para a síntese de Ag-NPs é proposto por Creighton, em que AgNO_3 é reduzido utilizando-se borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor. Esse procedimento de síntese permite a obtenção de partículas de aproximadamente 10 nm e com estreita distribuição de tamanho (EVANOFF; CHUMANOV, 2005).

O uso de agentes redutores fracos como o ácido cítrico requer aumento da temperatura para que o processo ocorra e pode produzir nanopartículas grandes e com larga distribuição de tamanhos. Entretanto, o uso de agentes redutores fortes como NaBH_4 não requer elevação da temperatura e permite a obtenção de nanopartículas pequenas e com estreita distribuição de tamanhos (BERNI NETO, 2010).

O NaBH_4 deve ser adicionado em excesso em relação ao AgNO_3 durante a síntese, uma vez que esse reagente atua simultaneamente como agente redutor dos íons prata e estabilizador das nanopartículas que se formam. Os íons NaBH_4 adsorvem-se na superfície das nanopartículas gerando cargas nestas superfícies, que criam uma repulsão eletrostática, evitando a agregação das nanopartículas como mostrado na Figura 1 (GARCIA, 2011).

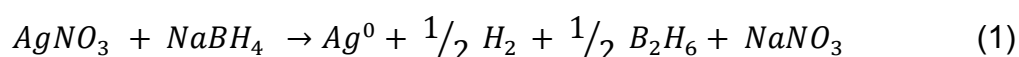


Fonte: Garcia (2011).

Figura 1 - Obtenção de nanopartículas de prata contendo íons NaBH_4 adsorvidos, que criam forças repulsivas capazes de estabilizar a dispersão coloidal.

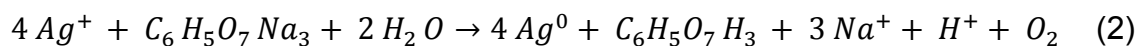
O NaBH_4 deve ser adicionado na proporção de 2:1 em relação ao AgNO_3 e se esta relação for modificada, a agregação das Ag-NPs pode ocorrer em menos de 1 h. Entretanto, a adição de NaBH_4 em excesso pode aumentar a força iônica do meio, facilitando a agregação das partículas (MELO JR. et al., 2012).

A pureza dos reagentes utilizados na síntese de Ag-NPs também é um fator importante, pois a presença de impurezas pode servir como sítio de nucleação das Ag-NPs (MELO JR et al., 2012). De acordo com Solomon et al. (2000), a pureza do AgNO_3 e do NaBH_4 deve ser maior que 99%. A obtenção de Ag-NPs utilizando NaBH_4 pode ser descrita pela Equação 1:



As Ag-NPs obtidas por este método apresentam tamanhos entre 5 a 20 nm de diâmetro que podem ser caracterizadas por espectroscopia de absorção UV-Vis na faixa entre 380 – 400 nm (GARCIA, 2011).

A redução com citrato de sódio produz Ag-NPs com diâmetro maior, entre 50-100 nm, e podem ser caracterizadas pela espectroscopia de absorção UV-Vis ao redor de 420 nm (GARCIA, 2011). A reação entre os íons Ag^+ e o íon citrato é dada pela Equação 2.



A espectroscopia de UV-Vis é um dos métodos mais utilizados na caracterização de Ag-NPs. Pode-se observar na Tabela 1 a correlação entre o diâmetro médio das nanopartículas e o comprimento de onda observado no pico.

Tabela 1 - Correlação entre tamanho (nm) das partículas e o comprimento de onda (nm) observado no pico

Tamanho da partícula (nm)	Comprimento de onda (nm)
5-10	380-390
10-14	395-405
35-50	420-435
60-80	438-450

Fonte: Solomon et al. (2007).

2.2. Estabilidade de nanopartículas

Partículas na escala nanométrica são termodinamicamente instáveis (ATKINS, 1994). Por possuírem grande área superficial por volume, as nanopartículas apresentam alta tendência de agregarem-se para minimizar a energia total ou interfacial do sistema. A aglomeração das partículas é causada pela força atrativa de van der Waals e/ou forças que tendem a minimizar a energia total de superfície do sistema. Portanto, para evitar a agregação das partículas, forças repulsivas devem sobrepor às atrativas (JIANG et al., 2009). Forças repulsivas podem ser alcançadas pela estabilização estérica, eletrostática ou eletroestérica. A estabilização estérica se dá pela adsorção de um polímero não carregado ou surfactantes não iônicos sobre a superfície das nanopartículas, o que impede a agregação por meio de repulsão estérica (EL BADAWY et al., 2010). Já a estabilização eletroestérica ocorre quando um polieletrólito adsorve sobre a superfície da partícula coloidal. Polieletrólitos são polímeros com grupos ionizáveis, sendo classificados em aniônicos ou catiônicos de acordo com seu grupo funcional, ou seja, é um polímero cujas unidades de repetição suportam um grupo eletrólito que se dissocia em solução aquosa, fazendo com que o polímero fique carregado (EL BADAWY et al.,

2010). Então, a estabilidade é provocada pela repulsão estérica, bem como eletrostática. Alguns dos polímeros usados para estabilização de Ag-NPs são: polivinilpirrolidona (PVP) (WILEY et al., 2005; EL BADAWY et al., 2010), polivinil álcool (PVA) (PENCHEVA et al., 2012), polietilenoglicol (PEG) (POPA et al., 2007), poliacrilamida (CHEN et al., 2006), carboximetilcelulose (GARCIA, 2011).

2.3. Potencial zeta (ζ)

O potencial ζ representa a carga na superfície das nanopartículas e pode variar no tipo (negativo/positivo), bem como em magnitude, de acordo com o agente de revestimento ou dos reagentes utilizados na síntese (EL BADAWY et al., 2011). As partículas coloidais podem adquirir cargas devido à ocorrência de alguns fenômenos como, possibilidade de íons saírem da partícula e irem para solução, possibilidade de íons saírem da solução e irem para a partícula coloidal, adsorção preferencial de íons na superfície da partícula coloidal e ionização de grupos funcionais na superfície da partícula (ADAMSON, 1997). De acordo com a teoria DLVO (DERJAGUIN; LANDAU, 1941; VERWEY; OVERBEEK, 1948) partículas com potencial ζ maior que +30 mV e menor que -30 mV são normalmente consideradas estáveis na ausência de estabilizadores estéricos.

Sob a ação de um campo elétrico, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é denominado de potencial ζ (BEDÊ, 2010). O potencial ζ não pode ser medido diretamente. Assim, utiliza-se algum tipo de medida indireta, a partir da qual seu valor é calculado. A técnica mais usada e mais aceita é mobilidade eletroforética. Neste caso, uma dispersão coloidal diluída é introduzida em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à dispersão. As partículas com carga elétrica líquida se movem na direção do eletrodo de carga contrária, tão rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado (LAMEIRAS et al., 2008; ABREU, 2011). Por representar a carga efetiva nas partículas, o potencial ζ está relacionado com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da dispersão (BEDÊ, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As Ag-NPs foram obtidas por síntese coloidal em meio aquoso, sendo utilizadas duas diferentes rotas: i) utilizando-se citrato de sódio como agente redutor; ii) utilizando-se NaBH_4 como agente redutor.

As vidrarias utilizadas na síntese e estocagem das Ag-NPs foram lavadas com 10% ácido nítrico e enxaguadas com água deionizada (MiliQ). Todas as soluções também foram preparadas em água deionizada.

3.1. Síntese e revestimento das nanopartículas de prata

3.1.1. Síntese de nanopartículas de prata com citrato de sódio (Ag-NPC)

As Ag-NPC foram obtidas pela redução do AgNO_3 com citrato de sódio, como descrito por Monteiro et al. 2009, com pequenos ajustes. Foram aquecidos 100 mL de 1 mM AgNO_3 (Sigma-Aldrich, USA) em um balão de três-pescoço, acoplado em um condensador, e após 2 min de ebulição foram adicionados 10 mL de 36 mM citrato de sódio (Sigma-Aldrich, USA). A solução foi mantida em ebulição até começar aparecer uma coloração amarelo-pálido (~ 3,0 min). Então, a fonte de calor foi desligada e o balão permaneceu em contato com a malha de aquecimento por mais alguns minutos (~2 min) até obtenção da cor amarela, indicando a formação das Ag-NPs. A dispersão foi então retirada da fonte de calor e resfriada em temperatura ambiente.

A permanência do balão na malha de aquecimento por tempo prolongado, leva à formação de uma dispersão amarela-acinzentada, associada à agregação das Ag-NPC, podendo-se observar precipitados acinzentados no fundo do balão. Além disso, forma uma película cinza na parede do balão, indicando perda de prata.

3.1.2. Síntese de nanopartículas de prata com borohidreto de sódio (Ag-NPB)

As Ag-NPB foram obtidas pela redução do AgNO_3 (Sigma-Aldrich, USA) com NaBH_4 (Vetec, Brasil) (KIM et al., 2007; MELO JR. et al., 2012). Foram adicionados gota a gota (1 gota por segundo), utilizando bomba peristáltica, 25 mL de 1 mM AgNO_3 à 75 mL de 2 mM NaBH_4 imerso em banho gelo. A solução de NaBH_4 foi previamente resfriada ($\sim 2^\circ\text{C}$). Durante a mistura, os íons Ag^+ foram reduzidos e agrupados para formar Ag-NPs em uma dispersão aquosa transparente e amarela.

3.1.3. Revestimento das nanopartículas de prata

As Ag-NPs foram revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma-Aldrich, USA), peso molecular 55.000 e com carboximetilcelulose (CMC) (GARCIA, 2011). As dispersões de Ag-NPC e Ag-NPB foram misturadas com soluções aquosas de PVP 0,3% e CMC 0,5%, na proporção de 1:1 (v/v), sendo denominadas Ag-NPC-PVP, Ag-NPC-CMC, Ag-NPB-PVP e Ag-NPB-CMC, respectivamente.

3.2. Caracterização físico-química das nanopartículas de prata

3.2.1. Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)

O espectro de absorção UV-Vis das Ag-NPs foi adquirido em um espectrofotômetro modelo UV-1601 PC Shimadzu, em uma faixa de comprimento de onda de 290 nm a 700 nm usando-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. O experimento foi realizado em três repetições no Laboratório de Pigmentos e Compostos Bioativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

3.2.2. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio) das Ag-NPs foi determinado por DLS utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Southborough, UK) do Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

O instrumento utiliza espectroscopia de correlação de fótons para medir o tamanho das partículas. O movimento aleatório das partículas, Browniano ou térmico, faz com que a intensidade da luz dispersa a partir de partículas varie com o tempo. Partículas grandes movem-se mais lentamente que as pequenas, deste modo, a taxa de variação da luz dispersa é mais lenta. A espectroscopia de correlação de fótons utiliza a taxa de alteração destas flutuações de luz para determinar a distribuição de tamanho das partículas (YE; SINGH, 2007).

A faixa de diâmetro de partículas e número de contagens de fótons por segundo (quilo Contagem por segundo (kCps) foram avaliadas a 25 °C. Para evitar efeitos de espalhamento múltiplo as amostras foram diluídas em água deionizada para uma concentração de, aproximadamente, 1 µg·mL⁻¹.

As medições de tamanho foram reportadas como diâmetro médio volumétrico $\left(d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}\right)$, em que n_i corresponde ao número de partículas de diâmetro d_i . Cada resultado individual foi automaticamente calculado como a média de três medidas com 20 submedidas cada. O experimento foi realizado em três repetições.

3.2.3. Potencial zeta (ζ)

Medidas de potencial ζ foram realizadas com instrumento de eletroforese de partícula (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Southborough, UK). O potencial ζ foi determinado por meio da medida da direção e velocidade do movimento de uma partícula em um campo elétrico bem definido (HOLMBERG et al., 2002).

As amostras foram diluídas para uma concentração de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizando água deionizada. Em seguida, as partículas foram dispostas em células capilares equipadas com eletrodos de ouro e analisadas a um ângulo de espalhamento de 173° .

A mobilidade eletroforética ($\text{V}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) foi calculada a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, conforme a Equação 3, para partículas esféricas.

$$\mu = \frac{UE}{\omega} \quad (3)$$

em que U é a velocidade da partícula ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), ω a frequência (s^{-1}) e E o campo elétrico efetivo ($\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$). O potencial ζ (mV) foi calculado usando a Equação de Smoluchoski (4).

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\varepsilon} \quad (4)$$

em que ε é a permissividade elétrica ($\text{F}\cdot\text{m}^{-1}$) e η a viscosidade do solvente ($\text{Pa}\cdot\text{s}$). A conversão da mobilidade eletroforética em potencial ζ foi feita automaticamente pelo software de análise dos dados Zetasizer Software (Malvern. UK). Os valores de potencial ζ foram determinados em triplicata e o desvio padrão foi calculado por pelo menos 10 medidas de uma mesma amostra. O experimento foi realizado em três repetições.

3.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

MET foi empregada para determinação do tamanho e do formato das Ag-NPs. A análise foi realizada no centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, utilizando o microscópio Tecnai – G2-20-FEI, 2006 com voltagem de 200 KV.

As amostras foram preparadas pingando-se uma gota da dispersão coloidal em *grids* de cobre recobertas com um fino filme de carbono amorfo. Após secagem, as amostras foram observadas no microscópio.

3.2.5. Absorção atômica

A concentração de prata nas dispersões coloidais foi determinada utilizando espectrofotômetro de absorção atômica com emprego de chama (Specttr AA-200, VARIAN). A análise foi realizada no Laboratório de Química Verde (QUIVECON) do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Foi feita uma curva padrão de AgNO_3 nas concentrações entre $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $3,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. As dispersões de Ag-NPs foram adequadamente diluídas em água deionizada. O experimento foi realizado em três repetições.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Espectroscopia de UV-Vis

As Ag-NPC e as Ag-NPB apresentaram ressonância plasmônica de superfície típica, Figuras 2 e 3, respectivamente, com pico em torno de 400 nm.

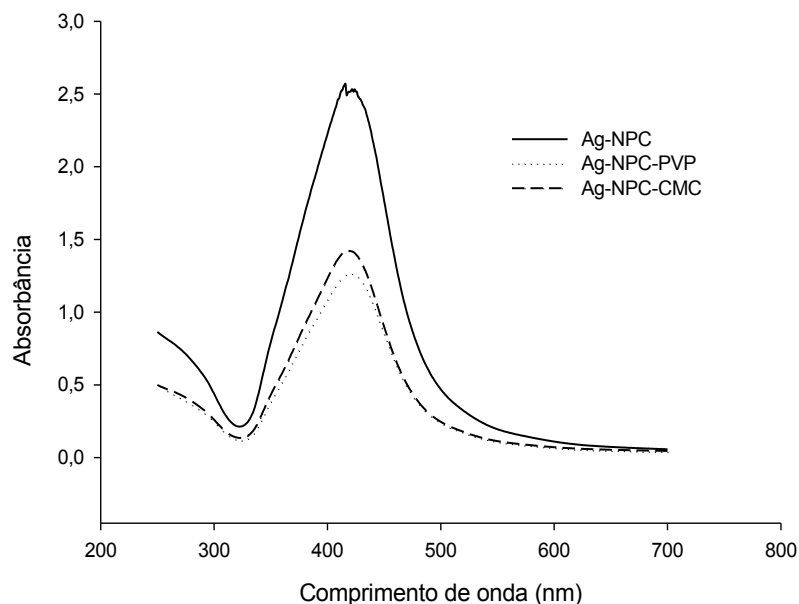


Figura 2 - Espectro de absorção óptica de nanopartículas de prata sintetizadas com citrato de sódio sem revestimento (Ag-NPC), revestidas com polivinilpirrolidona (Ag-NPC-PVP) e revestidas com carboximetilcelulose (Ag-NPC-CMC).

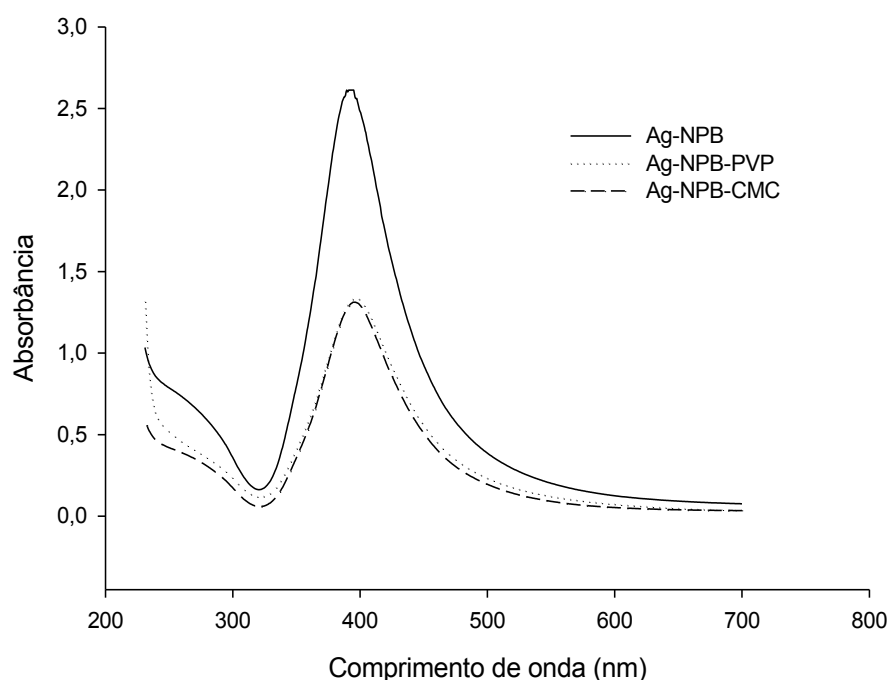


Figura 3 - Espectro de absorção óptica de nanopartículas de prata sintetizadas com borohidreto de sódio sem revestimento (Ag-NPB), revestidas com polivinilpirrolidona (Ag-NPB-PVP) e revestidas com carboximetilcelulose (Ag-NPB-CMC).

A espectroscopia de UV-Vis é um dos métodos mais utilizados na caracterização estrutural de Ag-NPs (PAL et al., 2007; AWASTHI et al., 2013). Uma característica de metais nobres sob a forma de nanopartículas é a forte coloração de suas dispersões coloidais (GARCIA, 2011). De acordo com Berni Neto (2010) a mudança de cor durante a síntese das nanopartículas é associado ao fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície, que é a excitação coletiva de elétrons na interface entre um condutor e um isolante. O tamanho e o formato das nanopartículas são os principais fatores que determinam a faixa espectral de absorção, isto é, onde ocorre a ressonância. Outros fatores que interferem são a densidade eletrônica, massa efetiva e a interação com seus estabilizadores e com o meio em que se encontram (SOLOMON et al., 2007).

De acordo com Brause et al. (2002), o espectro de absorção óptica das nanopartículas metálicas desloca para comprimentos de onda maiores quando as partículas aumentam de tamanho. O comprimento de onda no pico foi de

418 $\pm$ 3,2 nm para as Ag-NPC e 389 $\pm$ 0,5 nm para as Ag-NPB. Isso indica que as Ag-NPC são maiores que as Ag-NPB, pois apresentaram absorção máxima em comprimento de onda maior. A adição de PVP ocasionou o deslocamento do comprimento de onda das Ag-NPB de 389 nm para 397,5 nm, o que indicou que o PVP não foi um bom estabilizante para estas nanopartículas.

De acordo com a teoria de Mie, para nanopartículas esféricas é esperado apenas uma banda de ressonância plasmônica de superfície, enquanto que partículas anisotrópicas dão origem a duas ou mais bandas, dependendo do formato das partículas. Assim, nanopartículas esféricas, discos e triangulares irão fornecer um, dois ou mais picos respectivamente (SOSA et al., 2003). Podemos observar pela ressonância plasmônica de superfície que tanto as Ag-NPC (Figura 2), quanto as Ag-NPB (Figura 3), adicionadas ou não dos polímeros, são esféricas, pela formação de apenas um pico.

4.2. Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de prata

O tamanho médio determinado por DLS e o potencial ζ das Ag-NPs estão descritos na Tabela 2. O resultado por UV-Vis indicou que as Ag-NPC são maiores que as Ag-NPB, por apresentarem absorção máxima em um comprimento de onda maior, entretanto, ambas apresentaram tamanhos similares por DLS.

As Ag-NPC e Ag-NPB apresentaram potencial ζ de -31,9 mV e -33,2 mV, respectivamente, o que indicou que as Ag-NPs apresentam boa estabilidade na ausência de agentes estabilizantes. A adição de CMC, um polímero aniônico, diminuiu o potencial ζ de ambas Ag-NPs, aumentando a densidade de cargas negativas, o que promove aumento na repulsão eletrostática e estabilidade das nanopartículas. Entretanto, o potencial ζ das Ag-NPs revestidas com PVP foi menos negativo do que sem estabilizante. A adição de PVP diminuiu a densidade de carga negativa das Ag-NPs, o que pode provocar a diminuição da estabilidade associado à diminuição da repulsão eletrostática.

Tabela 2 - Valores médios do tamanho (nm) e desvio padrão, desvio padrão (σ) da distribuição de tamanhos (nm) e potencial zeta (mV) das nanopartículas de prata sintetizadas com citrato de sódio sem revestimento (Ag-NPC), revestidas com polivinilpirrolidona (Ag-NPC-PVP) e revestidas com carboximetilcelulose (Ag-NPC-CMC) enanopartículas de prata sintetizadas com borohidreto de sódio sem revestimento (Ag-NPB), revestidas com polivinilpirrolidona (Ag-NPB-PVP) e revestidas com carboximetilcelulose (Ag-NPB-CMC)

Nanopartículas	Tamanho (nm)*	σ (nm)*	Potencial zeta (mV)*
Ag-NPC	3,4 $\pm$ 1,2	1,8	- 31,9 $\pm$ 8,6
Ag-NPC-PVP	6,9 $\pm$ 1,2	2,5	- 21,9 $\pm$ 2,8
Ag-NPC-CMC	3,4 $\pm$ 0,2	3,2	- 58,8 $\pm$ 6,9
Ag-NPB	3,1 $\pm$ 0,9	2,9	- 33,2 $\pm$ 1,7
Ag-NPB-PVP	5,7 $\pm$ 0,5	6,3	- 19,4 $\pm$ 0,3
Ag-NPB-CMC	4,8 $\pm$ 1,2	10,7	-73,9 $\pm$ 6,0

*Média de três repetições.

Em trabalho realizado por Kittler et al. (2010), o potencial ζ das Ag-NPs também aumentou de -30 mV para -17 mV com a adição de PVP. Apesar de ter alterado o potencial ζ , esses polímeros promovem principalmente uma estabilização estérica.

4.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens observadas por MET (Figura 4) revelaram que as Ag-NPs são, aproximadamente, esféricas o que confirmou o resultado observado por UV-vis. O tamanho médio das Ag-NPC determinado pela distribuição de tamanhos (Figura 5) foi de 3,86 $\pm$ 0,43 nm e o desvio padrão de 1,5 $\pm$ 0,4 nm, corroborando com os resultados obtidos por DLS. Já o tamanho das Ag-NPC-CMC foi maior que o obtido por DLS (Figura 4d).

A distribuição de tamanhos das Ag-NPC (Figura 5) foi determinada a partir da Figura 4a.

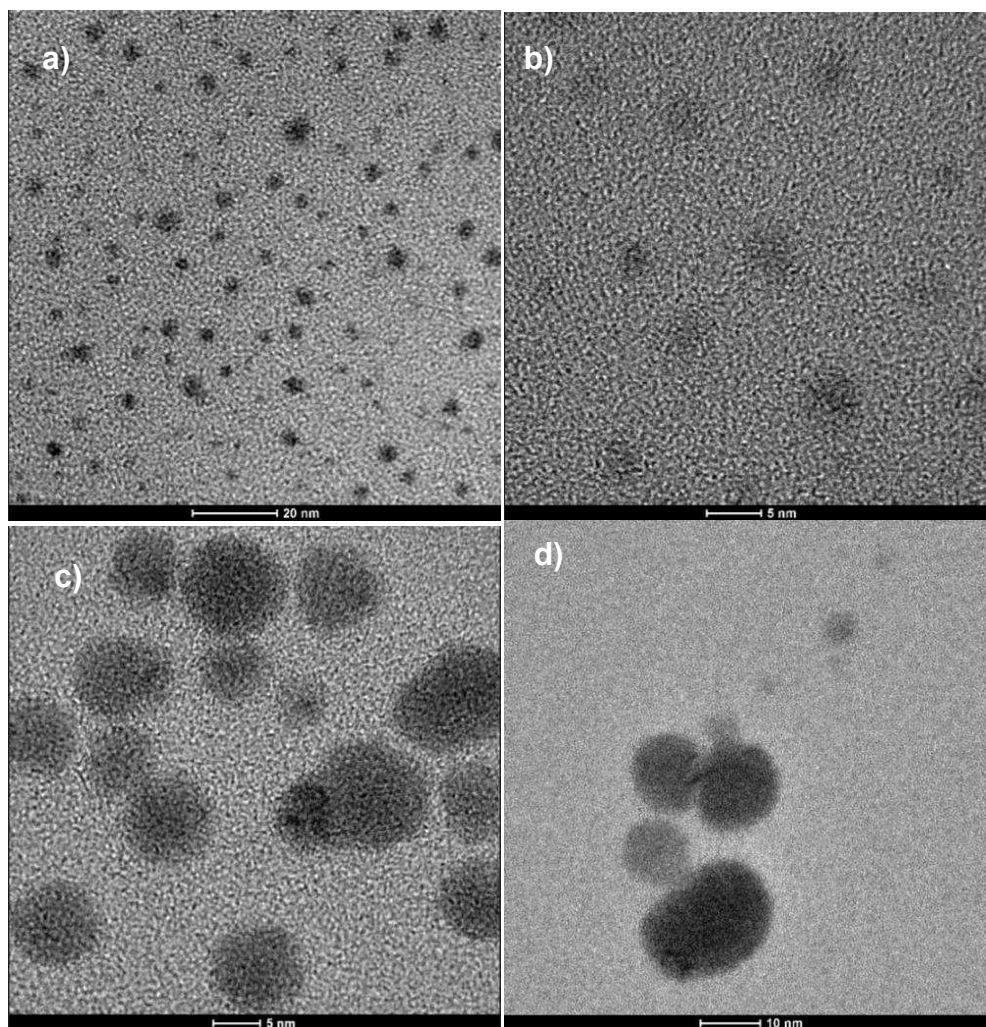


Figura 4 - Nanopartículas de prata sintetizadas com citrato de sódio (Ag-NPC), observadas por microscopia eletrônica de transmissão. a e b) sem revestimento em diferentes ampliações; c) revestidas com polivinilpirrolidona (Ag-NPC-PVP); d) revestidas com carboximetilcelulose (Ag-NPC-CMC).

Como pode ser visualizado na Figura 6, as Ag-NPB são bem pequenas, confirmando os resultados de DLS. Entretanto, não foi possível determinar a distribuição de tamanhos dessas nanopartículas pelo pequeno número de partículas obtidas na imagem.

A concentração de prata na dispersão de Ag-NPC foi de $95,6 \pm 1,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Já na dispersão de Ag-NPB foi de $31 \pm 0,04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A maior concentração de prata na primeira é associada às proporções de reagentes adicionados na síntese.

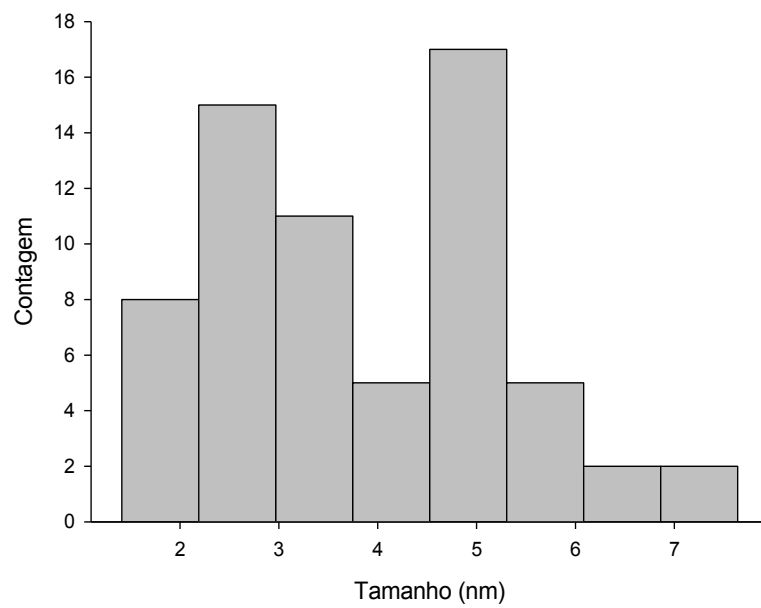


Figura 5 - Distribuição de tamanhos das nanopartículas de prata sintetizadas com citrato de sódio (Ag-NPC), obtida a partir da Figura 4a.

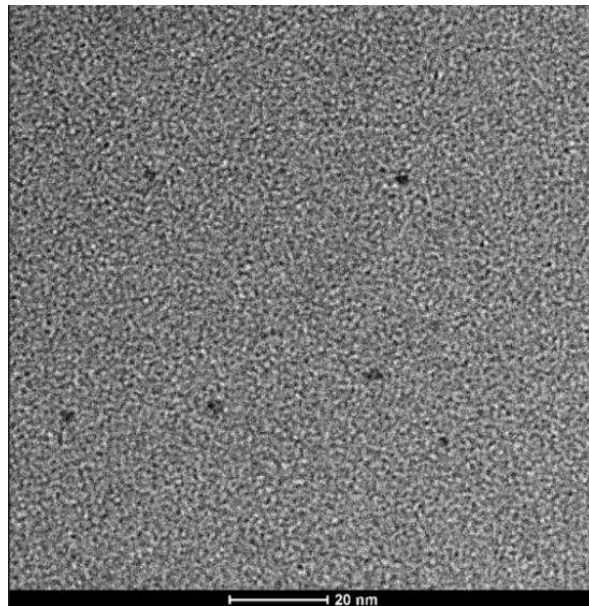


Figura 6 - Nanopartículas de prata sintetizadas com borohidreto de sódio (Ag-NPB), observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

5. CONCLUSÃO

A presença da ressonância plasmônica de superfície típica confirmou a formação das Ag-NPs nas dispersões coloidais. As Ag-NPC e as Ag-NPB apresentaram potencial ζ menor que - 30 mV, característica que indica boa estabilidade das dispersões coloidais. Ambas Ag-NPs apresentaram tamanhos menores que 5 nm, por DLS e por MET, que são indicadas para aplicações microbiológicas. Entretanto, as Ag-NPC são obtidas em concentração maior, o que favorece sua utilização como agente antimicrobiano.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, S.L. **Caracterização e dispersão em meio aquoso da α -Alumina com tamanho de partícula submicrométrico e nanométrico**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2011.

ADAMSON, A.W. **Physical chemistry of surfaces**. 6.ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 784p.

ATKINS, P.W. **Physical chemistry**. 5.ed. New York: Oxford University Press, 1994.

AWASTHI, K.K.; AWASTHI, A.; KUMAR, N.; ROY, P.; AWASTHI, K.; JOHN, P.J. Silver nanoparticle induced cytotoxicity, oxidative stress, and DNA damage in CHO cells. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 15, p.1-12, 2013.

BEDÊ, P.M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomédica**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

BERNI NETO, E.A. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas**. 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

BRAUSE, R.H.; MOELTGEN, K.; KLEINERMANN, A. Characterization of laser-ablated and chemically reduced silver colloids in aqueous solution by UV/VIS spectroscopy and STM/SEM microscopy. **Applied of Physical B**, v. 75, p. 711-716, 2002.

CHEN, M.; WANG, L.Y.; HAN, J.T.; ZHANG, J.Y.; LI, Z.Y.; QIAN, D.J.J. Preparation and study of polyacryamide-stabilized silver nanoparticles through a one-pot process. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p.11224-31, 2006.

CREIGHTON, J.A.; BLATCHFORD, C.G.; ALBRECHT, M.G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions II**, v. 75, p. 790-798, 1979.

DERJAGUIN, B.V.; LANDAU, L.D. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Acta Physicochim URSS**, v. 14, p. 733-762, 1941.

EL BADAWY, A.M.; LUXTON, T.; SILVA, R.G.; SCHECKEL, K.; SUIDAN, M.; TOLAYMAT, T. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 1260-1266, 2010.

EL BADAWY, A.M.; SILVA, R.G.; MORRIS, B.; SCHECKEL, K.G.; SUIDAN, M.T.; TOLAYMAT, T.M. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 283-287, 2011.

EVANOFF, D.D.J.; CHUMANOV, G. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. **Chemical Physics and Physical Chemistry**, v. 6, p. 1221-1231, 2005.

GARCIA, M.V.D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

HOLMBERG, K.; SHAH, D.O.; SCHWUGER, M.J. **Handbook of applied surface and colloid chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2002.

JIANG, J.; OBERDORSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, p. 77-89, 2009.

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

KITTLER, S.; GREULICH, C.; DIENDORF, J.; KOLLER, M.; EPPLER, M. Toxicity of silver nanoparticle increases during storage because of slow dissolution under released of silver ions. **Chemistry of Materials**, v. 22, p. 4548-4554, 2010.

LAMEIRAS, F.S.; SOUZA, A.L.; MELO, V.A.R.; NUNES, E.H.; BRAGA, I.D. Measurement of the zeta potencial of planar surfaces with a rotating disk. **Material Research**, v. 11, p. 217-219, 2008.

LEE, P.C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 86, p. 3391-3395, 1982.

LEE, Y.J.; KIM, J.; OH, J.; BAE, S.; LEE, S.; HONG, I.S.; KIM, S.H. Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 155-159, 2012.

LOK, C.N.; HO, C.M.; CHEN, R.; HE, Q.Y.; YU, W.Y.; SUN, H.; TAM, P.K.H.; CHIU, J.F. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, p. 527-534, 2007.

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

MIE, G. Contributions to the optics of turbid media, especially colloidal metal solutions. **Annals of Physics**, v. 25, p. 377-445, 1908.

MONTEIRO, D.R.; GORUP, L.F.; TAKAMIYA, A.S.; FILHO, A.C.R.; CAMARGO, E.R.; BARBOSA, D.B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International Journal of Antimicrobia Agents**, v. 34, p.103-110, 2009.

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

PENCHEVA, D.; BRYASKOVA, R.; KANTARDJIEV. Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/Ag-NPs) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. **Material Science and Engineering: C**, v. 32, p. 2048-2051, 2012.

POPA, M.; PRADELL, T.; CRESPO, D.; CALDERON-MORENO, J.M. Colloids Surfaces A. **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 303, p. 184, 2007.

ROCHA, T.C.R. **Nanopartículas metálicas anisotrópicas**: mecanismo de formação e propriedades ópticas. 2008. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

SOLOMON, S.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAN, A.; RUTKOWSKY, S.; BORITZ, C. Synthesis and study of silver nanoparticles. **EUA: Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.

SONG, K.C.; LEE, S.M.; PARK, T.S.; LEE, B.S. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 153-155, 2009.

SOSA, I.O.; NOGUEZ, C.; BARRERA, R.G. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, p. 6269-6275, 2003.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussion of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.

WILEY, B.; SUN, Y.; MAYERS, B.; XIA, Y. Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: the case of silver. **Chemistry - A European Journal**, v.11, p.454-463, 2005.

YE, A.; SINGH, H. Adsorption behaviour of lactoferrin in oil-in-water emulsions as influenced by interactions with β -lactoglobulin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 295, n. 1, p. 249-254, 2006.

ZHAO, Y.Y.; FROST, R.L.; MARTENS, W.N. Synthesis and characterization of gallium oxide nanostructures via a soft-chemistry route. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 162-190, 2007.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

RESUMO: Nanopartículas de prata (Ag-NPs) foram sintetizadas por redução química utilizando citrato de sódio (Ag-NPC) e foram revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) e carboximetilcelulose (CMC). Foi determinado o espectro de ação, a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) das Ag-NPC e dos íons Ag^+ , provenientes do nitrato de prata (AgNO_3), sobre espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Caracterizou-se o efeito de concentrações subinibitórias de Ag-NPC e de íons Ag^+ na adesão microbiana em superfícies de poliestireno. Os prováveis mecanismos de ação antimicrobiana foram avaliados por meio de microscopia eletrônica de transmissão com análise dispersiva de raios-x, pelo uso de agentes antioxidantes, determinação da peroxidação de lipídeos e pela avaliação da liberação de íons Ag^+ pelas Ag-NPC, utilizando-se membrana de diálise. Foi caracterizada a cinética de inativação de células planctônicas de *P. aeruginosa* tratadas com Ag-NPC e com AgNO_3 , sob diferentes condições. As Ag-NPC e o AgNO_3 demonstram atividade antimicrobiana sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas, pelo teste da inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar. Entretanto, a CMI das Ag-NPC e do AgNO_3 foi menor sobre as bactérias gram-negativas. A CMB das Ag-NPC e do AgNO_3 sobre as bactérias gram-negativas foi de 4 a 8 vezes maior que a CMI. Tanto as Ag-NPC quanto o AgNO_3 apresentaram efeito bacteriostático sobre as bactérias gram-positivas, não apresentando efeito bactericida na maior concentração testada, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A CMI das Ag-NPC revestidas com PVP e revestidas com CMC foi igual à CMI das Ag-NPs sem revestimento, não sendo demonstrado o efeito do potencial zeta na atividade antimicrobiana das Ag-NPC. Concentrações subinibitórias de Ag-NPC diminuíram a adesão de *P. aeruginosa* na superfície de poliestireno. Entretanto, aumentaram a adesão das bactérias gram-positivas em relação ao grupo controle. As Ag-NPC e o AgNO_3 não alteraram a hidrofobicidade da superfície de poliestireno, sendo assim, esses antimicrobianos podem ter interferido em algum mecanismo envolvido na adesão e formação de biofilme, em resposta ao estresse. Por microscopia eletrônica de transmissão/espectroscopia dispersiva de raios-x verificou-se que a prata penetra nas células microbianas, complexa com enxofre e fósforo formando uma região de condensação no centro das bactérias. Os danos causados em *S. aureus* foram menos intensos comparados com os danos em *P. aeruginosa*. Os danos provocados pelas Ag-NPC nas células microbianas foram semelhantes aos causados pelo AgNO_3 . Agentes antioxidantes como ácido ascórbico, L-cisteína e tiossulfato de sódio inibiram o efeito antimicrobiano das Ag-NPC e do AgNO_3 , sugerindo o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ERO) na atividade antimicrobiana das Ag-NPC e do AgNO_3 . Entretanto, não se verificou a peroxidação de lipídeos nas células tratadas. Os resultados em membranas de diálise indicaram que a atividade antimicrobiana das Ag-NPC está relacionada com a liberação de íons Ag^+ . As cinéticas de inativação de células planctônicas de *P. aeruginosa* tratadas com

Ag-NPC e com AgNO_3 em diferentes condições, foram ajustadas por modelos bifásicos, demonstrando uma heterogeneidade na resistência microbiana. O tempo de inativação microbiana diminuiu com o aumento da concentração e da temperatura. A atividade antimicrobiana das Ag-NPC e do AgNO_3 foi reduzida em meio de cultura comparado com suas atividades em água, provavelmente, pela complexação das Ag-NPC e do AgNO_3 com os constituintes do meio, como enxofre e fosfatos.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de nanomateriais em diversos produtos tem aumentado muito nos últimos anos. Dentre os produtos contendo nanomateriais, os que contêm Ag-NPs são hoje mais amplamente comercializados. Isso se deve à conhecida atividade antimicrobiana da prata e seu amplo espectro de ação.

O principal interesse na utilização de agentes antimicrobianos com prata é associado ao aumento no número de bactérias resistentes aos antibióticos. As bactérias apresentam baixa propensão de desenvolverem resistência contra a prata, considerando o seu amplo modo de ação. Além disso, a toxicidade para células humanas é considerada baixa quando comparada à toxicidade em relação às bactérias (VOLKER et al., 2004). A atividade antimicrobiana das Ag-NPs pode ser influenciada por diversos fatores como tamanho, forma, estrutura cristalográfica, carga superficial, agregação e dissolução de íons.

Há relatos de que a liberação de íons Ag^+ a partir das Ag-NPs é responsável por sua atividade antimicrobiana. Entretanto, não está claro se o mecanismo de ação antimicrobiana das Ag-NPs está relacionado apenas com a liberação de íons ou se as próprias Ag-NPs apresentam uma toxicidade específica (NAVARRO, 2008). Vários trabalhos têm sido realizados nos últimos anos, na tentativa de esclarecer esta questão, entretanto o mecanismo não foi totalmente esclarecido. Discernir a contribuição dos íons Ag^+ na atividade antimicrobiana das Ag-NPs têm sido um desafio para os pesquisadores.

De acordo com Radzig et al. (2013), para aplicar as Ag-NPs com sucesso é importante entender o seu mecanismo de ação não apenas nas células em suspensão, mas também em biofilmes. Pois, acima de 99% das bactérias encontram-se nos ecossistemas, na forma de biofilmes, aderidas em diferentes superfícies. É importante enfatizar que a formação de biofilmes em

dispositivos implantados a exemplo de válvulas cardíacas, cateteres e lentes de contato, pode promover infecções crônicas. Além disso, a formação de biofilmes pode acarretar vários problemas para a indústria de alimentos como, prejudicar o processo de cloração da água, diminuir a transferência de calor em trocadores de calor, diminuir o fluxo em tubulações, provocar corrosão dos equipamentos e, principalmente, contaminar os alimentos.

Objetivou-se: 1) Determinar o espectro de ação antimicrobiana, a concentração mínima inibitória (CMI), e a concentração mínima bactericida (CMB) sobre espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas; 2) Determinar o efeito de concentrações subinibitórias de Ag-NPC e de AgNO₃ na adesão de bactérias gram-positivas e gram-negativas na superfície de poliestireno; 3) Determinar os prováveis mecanismos de ação das Ag-NPs e do AgNO₃, por microscopia eletrônica de transmissão com análise dispersiva de raios-x, pelo uso de agentes antioxidantes, determinação da peroxidação de lipídeos e liberação de íons Ag⁺ pelas Ag-NPC; 4) Caracterizar a cinética de inativação de células planctônicas de *P. aeruginosa* tratadas com Ag-NPC e com AgNO₃, sob diferentes condições.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais

O uso indevido de antibióticos promove a seleção de estirpes de bactérias resistentes (KYRIACOU et al., 2004) o que representa um problema sério de saúde pública e, portanto, há forte incentivo para desenvolver novos agentes bactericidas (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004). De acordo com Morones et al. (2005), as atuais pesquisas com nanomateriais antimicrobianos são particularmente oportunas.

A atividade antimicrobiana da prata é bem conhecida desde os tempos antigos (SHRIVASTAVA et al., 2007) e tem sido demonstrado que em baixas concentrações, a prata não é tóxica para células humanas (PAL et al., 2007). De acordo com Zhao e Stevens (1998), quando comparada com outros metais, a prata exibe alta toxicidade para micro-organismos e baixa toxicidade para células animais. Além disso, é bem conhecido que a prata possui amplo

espectro de atividade antimicrobiana sobre bactérias, fungos e vírus (BALAZS et al., 2004).

A atividade antimicrobiana das Ag-NPs é influenciada pelo tamanho e formato das partículas (MORONES et al., 2005; PAL et al., 2007). Assim, Ag-NPs com tamanho reduzido, aproximadamente 5 nm, e sem agregação são preferíveis. Outro fator importante é a estrutura cristalina que as Ag-NPs apresentam. Estudos mostram que, quanto maior o número de facetas nas partículas, maior a sua reatividade (MORONES et al., 2005), sendo o tamanho e microestrutura das nanopartículas dependentes da temperatura e concentração do precursor e das propriedades de síntese (JING et al., 2009). Ag-NPs triangulares são mais eficazes na inibição da multiplicação microbiana em comparação com as Ag-NPs esféricas (PAL et al., 2000; DONG et al., 2012; LIU et al., 2013).

2.2. Mecanismos de ação da prata

Íons Ag^+ apresentam tendência em complexar com substâncias contendo enxofre ou fósforo, como R-S-R, R-SH, RS_- ou PR_3 (PAL et al., 2007). Deste modo, proteínas que contêm enxofre e elementos que contêm fósforo, como o DNA, são os sítios preferenciais de ligação com a prata. Acredita-se que o efeito inibitório dos íons Ag^+ , é associado à sua adsorção à parede celular carregada negativamente e desativação de enzimas celulares, com comprometimento da permeabilidade da membrana (PERCIVAL et al., 2005) e, por último, morte e eventual lise celular (RATTE, 1999; SAMBHY et al., 2006).

As interações eletrostáticas entre as cargas negativas da superfície bacteriana e as Ag-NPs carregadas positivamente parecem ser fundamentais para a atividade antimicrobiana das Ag-NPs (STOIMENOV et al., 2002). No entanto, há indicações de que Ag-NPs com cargas negativas também apresentam efeito antimicrobiano (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004; FAYAZ et al., 2009). O mecanismo de interação das Ag-NPs carregadas negativamente com os constituintes da membrana ainda não está compreendido (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004).

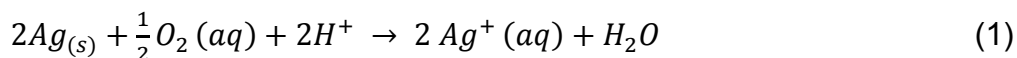
As Ag-NPs apresentam efeito bactericida maior sobre bactérias gram-negativas do que sobre bactérias gram-positivas, em razão da diferença estrutural da parede celular dessas bactérias (SHRIVASTAVA et al., 2007; FAYAZ et al., 2009). Entretanto, os fatores que afetam a atividade bactericida das Ag-NPs sobre células bacterianas ainda não estão completamente elucidados.

De acordo com Martínez-Castañón et al. (2008), Ag-NPs menores são mais eficientes associado à sua maior área superficial por volume, o que permite melhor contato com as células microbianas. Esses autores avaliaram o efeito antimicrobiano de Ag-NPs de três tamanhos diferentes (7 nm, 29 nm e 89 nm). Os valores de CMI para *S. aureus* e *E. coli* aumentaram com o aumento do tamanho das Ag-NPs, sendo que as de 7 nm apresentaram os melhores efeitos antimicrobianos.

Com base nos resultados por MET, Morones et al. (2005) relataram que as Ag-NPs e os íons Ag^+ atuam sobre as bactérias por mecanismos diferentes. Entretanto, de acordo com Xiu et al. (2012), a atividade antimicrobiana das Ag-NPs é explicada exclusivamente pela liberação de íons Ag^+ e que as Ag-NPs não apresentam um efeito direto específico da partícula. As Ag-NPs perderam a capacidade antimicrobiana sob condições anaeróbias, em que a liberação de íons Ag^+ é cessada, enquanto os íons Ag^+ mantiveram sua atividade sob aerobiose e anaerobiose (XIU et al., 2011). No entanto, a atividade antimicrobiana das Ag-NPs aumentou gradativamente quando foram expostas ao ar por 6 h ou 48 h. Esses autores ainda reportaram que fatores como tamanho, forma, revestimento de superfícies (estabilizantes) e carga superficial, afetam a atividade antimicrobiana das Ag-NPs, provavelmente, por afetarem a taxa, a extensão ou o tempo de liberação de íons Ag^+ . A atividade antimicrobiana das Ag-NPs está relacionada com a presença de íons Ag^+ adsorvidos na superfície das Ag-NPs, considerando que apenas as Ag-NPs parcialmente oxidadas apresentaram atividade antimicrobiana, enquanto as reduzidas (Ag^0) não (LOK et al., 2007).

Há indicações de que a liberação de íons Ag^+ pela oxidação da prata metálica (Ag^0) em contato com a água e oxigênio dissolvido está envolvida no mecanismo de ação bactericida das Ag-NPs (XIU et al., 2011). De acordo com

a Equação 1, íons Ag^+ são liberados a partir das Ag-NPs (prata elementar) na presença de água e oxigênio (HOSKINS et al., 2002).



Entretanto, não está claro se a liberação de íons Ag^+ é responsável por toda atividade antimicrobiana das Ag-NPs ou se as próprias Ag-NPs possuem um efeito específico da partícula. Distinguir a atividade antimicrobiana entre Ag-NPs e íons Ag^+ tem sido um desafio para os pesquisadores, pois os experimentos são normalmente realizados na presença de oxigênio e as duas formas, Ag-NPs e íons Ag^+ , coexistem nestas condições (XIU et al., 2012). Ag-NPs têm sido lavadas em água pura para remover os íons Ag^+ antes dos ensaios toxicológicos (SONDI; SOLOPEK-SONDI, 2004; LIU; HURT, 2010). Membranas de diálise que permitem a passagem dos íons, mas não das Ag-NPs, também têm sido utilizadas para separar as Ag-NPs dos íons Ag^+ (KITTLER et al., 2010).

2.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação de lipídeos

As ERO compreendem não somente os radicais livres como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxil ($\text{HOO}^{\cdot}$), radical hidroxil ($\text{HO}^{\cdot}$), radical peroxil ($\text{ROO}^{\cdot}$) e radical alcóxil ($\text{RO}^{\cdot}$), mas também não radicais como, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e ácido hipocloroso (HClO) (MURRAT; REID, 2001). Por definição, radicais livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo (ARAÚJO, 2008). Uma característica comum entre as diferentes ERO é a capacidade de causar algum dano oxidativo nas células. Os alvos biológicos para as ERO são DNA, RNA, proteínas e lipídeos, sendo os lipídeos os principais alvos durante o estresse oxidativo (CABISCOL et al., 2000). Radicais livres podem atacar diretamente ácidos graxos poli-insaturados e iniciar a peroxidação de lipídeos. De acordo com Cabiscol et al. (2000), o efeito primário da peroxidação de lipídeos é a diminuição da fluidez da membrana. Vários autores têm reportado que a atividade antimicrobiana das Ag-NPs está

relacionada com a formação de ERO (KIM et al., 2007; KIM et al., 2011; KORA et al., 2011).

A reação das ERO com os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) presentes nas membranas celulares, inicia um processo em cadeia denominado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001). A peroxidação de lipídeos se dá pela incorporação de oxigênio molecular a um AGPI para produzir um hidroperóxido lipídico como produto primário inicial (LIMA; ABDALLA, 2001). Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lipídeos é o teste do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de AGPI. A condensação do MDA com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA) forma um cromógeno róseo, em meio ácido e alta temperatura, que pode ser determinado por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência ($\lambda_{exc} = 515$ nm e $\lambda_{em} = 553$ nm). Neste teste utiliza-se como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano ou tetraetoxipropano (YU et al., 1986).

2.4. Adesão microbiana e formação de biofilmes

Bactérias são capazes de aderir e formar biofilme na superfície de diversos materiais como aço inoxidável, vidro, granito, plástico e borracha (HOOD; ZOTTOLA, 1997). A adesão bacteriana é importante em diferentes campos, desde a microbiologia médica e patologia à indústria de alimentos (UBBINK; ZAMMARETTI, 2007).

No processo de adesão da bactéria à superfície ocorre inicialmente a adsorção reversível regulada pela atração eletrostática e por forças físicas, como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. Estas forças de adesão dependem das propriedades físico-químicas da superfície de adesão e da superfície da bactéria, como hidrofobicidade e carga elétrica. A adesão inicial da bactéria é a etapa crítica para o desenvolvimento do biofilme (RAZATOS et al., 1998). Para o início da formação de um biofilme é necessário que primeiro ocorra adsorção de resíduos orgânicos à superfície o que leva a formação de um filme condicionante sobre o qual as bactérias iniciam a adesão (SHENG et al., 2007).

De acordo com Bernardes (2008), é importante entender como as propriedades do substrato influenciam o processo de adesão bacteriana, para ajudar a desenvolver alterações nas superfícies de forma que a adesão seja controlada.

As características do substrato podem influenciar na taxa e na extensão da adesão microbiana. De modo geral, superfícies mais rugosas e hidrofóbicas são mais susceptíveis à formação de biofilme, entretanto, qualquer substrato colocado num ambiente fluido adquire uma película ou revestimento condicionante composto basicamente por material proteico presente no líquido. Este revestimento irá conferir propriedades químicas sobre a superfície do substrato que pode mascarar totalmente as propriedades do próprio substrato (DONLAN, 2001).

2.5. Hidrofobicidade

Segundo van Oss e Giese (1995), a hidrofobicidade é expressa como energia hidrofóbica de atração e estabelece o grau de interação entre as moléculas de um material imerso em água. A hidrofobicidade é definida em termos de energia livre de interação hidrofóbica entre as moléculas das superfícies imersas em água (ΔG_{sas}^{TOT}). Quando a energia livre global de interação hidrofóbica entre as moléculas imersas em água é atrativa, ou seja, o valor de ΔG_{sas}^{TOT} é negativo, significa que as moléculas do sólido têm maior afinidade entre si do que pela água. Assim, uma superfície hidrofóbica apresenta valores de ΔG_{sas}^{TOT} negativos. Quando a energia livre global de interação hidrofóbica entre as moléculas de um sólido imerso em água é suficientemente repulsiva, ou seja, o valor de ΔG_{sas}^{TOT} é positivo, a superfície é considerada hidrofílica.

Uma superfície que não possui grupos polares ou iônicos ou locais de ligação de hidrogênio, não tem afinidade pela água é considerada hidrofóbica. Para que a adesão entre duas superfícies ocorra em meio aquoso, é preciso que o filme de água que as separa seja removido e a hidrofobicidade contribui para essa remoção (van LOOSDRECHT et al., 1990).

Existem vários métodos para determinar a hidrofobicidade como a adesão microbiana a hidrocarbonetos, cromatografia de interação hidrofóbica,

adesão a superfícies hidrofóbicas, agregação por adição de sais, partição hidrofóbica num sistema aquoso bifásico e medida do ângulo de contato. No entanto, o único método que permite determinar um valor quantitativo da hidrofobicidade é a medida do ângulo de contato, pois os demais fornecem apenas um valor relativo para comparação entre micro-organismos ou superfícies (CHAVES, 2004).

2.5.1. Medida do ângulo de contato

A determinação da energia livre de interação hidrofóbica da superfície pode ser realizada pela medição do ângulo de contato, que é um método clássico e que permite medir a interação entre uma superfície e um determinado líquido. Para o uso desta técnica os sólidos devem ser planos, lisos e homogêneos. O ângulo de contato (θ) formado por uma gota de um líquido sobre uma superfície sólida (Figura 1) é o ângulo entre um plano tangente a uma gota e a superfície onde o líquido encontra-se depositado. Este ângulo permite avaliar a molhabilidade dessa superfície. Se o líquido for a água, o ângulo formado será relacionado à hidrofobicidade da superfície.



Figura 1- Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. As tensões interfaciais da superfície do sólido (γ_S), do líquido em equilíbrio com o vapor (γ_{LV}) e superfície/líquido (γ_{sl}).

Qualitativamente, consideram-se a superfície hidrofílica quando o ângulo de contato formado com a água obtiver valores inferiores a 65° e a superfície será hidrofóbica quando o ângulo de contato for superior a 65° (VOGLER, 1998). Entretanto, outros autores como van Oss e Giese (1995), consideram uma superfície hidrofílica quando os ângulos de contato formados

pela água sobre uma superfície são inferiores a 50°, para valores superiores trata-se de uma superfície hidrofóbica.

2.6. Modelos matemáticos para descrever a cinética e a inativação microbiana

Os modelos preditivos podem ser definidos como equações matemáticas que descrevem o crescimento, sobrevivência, inativação ou processo bioquímico de um dado micro-organismo, sob determinadas condições (McDONALD; SUN, 1999). Os dados obtidos experimentalmente e ajustados por um modelo resultam em uma curva semilogarítmica de sobreviventes.

Por muito tempo, a inativação microbiana foi descrita como um modelo cinético de primeira ordem ou modelo de Bigelow (Equação 2) (MATOS, 2013). Neste caso, assume-se que todos os micro-organismos são idênticos e que, quando expostos a uma condição adversa, a destruição ocorre de forma exponencial.

$$\log \left(\frac{N_t}{N_0} \right) = -kt \quad (2)$$

em que $N(t)$ é a população de micro-organismos ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) no instante t (tempo), N_0 é a população inicial do micro-organismo ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), e k é o inverso do valor D (tempo para reduzir a população de micro-organismos em um ciclo logarítmico).

A representação gráfica do logaritmo decimal de sobreviventes, em relação ao tempo de exposição a uma condição constante, pode resultar em uma curva linearizada decrescente. A variação do número de sobreviventes com o tempo de exposição é função do número inicial de micro-organismos, como descrito na Equação 3:

$$\log(N_f) = \text{Log}(N_0) - (2,303/k)t \quad (3)$$

em que $\text{Log}(N_f)$ é o logaritmo decimal da população sobrevivente, após um tempo (t) de exposição; $\text{Log}(N_0)$ é logaritmo decimal da população no tempo

inicial ($t=0$); k é a constante de velocidade específica de inativação por unidade de tempo (t).

Quando a microbiota é heterogênea ou com variações de resistência dentro da mesma espécie, são obtidas curvas de sobrevivência semilogarítmicas curvilíneas. Esses tipos de curvas são obtidos com mais frequência do que curvas logarítmicas lineares, em que a inativação é equivalente à cinética química de uma reação de primeira ordem (HOLDSWORTH, 2004). De acordo com Pflug (1990), pode existir dentro de uma mesma população a presença de grande número de organismos com resistência muito baixa e um pequeno número de organismos muito resistentes.

Quando a inativação microbiana não obedece à cinética de primeira ordem, os métodos tradicionais para estimar o valor D , não são apropriados para tratar cinéticas complexas não lineares (PFLUG, 1990). No entanto, há na literatura vários modelos para descrever curvas de sobrevivência semilogarítmicas não lineares complexas e multifásicas com ombros e caudas (ANTUNES, 2009).

O modelo clássico de Weibull, descrito por Mafart et al. (2002), Equação 4, tem como vantagem a sua simplicidade matemática e a grande flexibilidade. Este modelo assume que as células microbianas de uma população apresentam diferentes resistências (ZIMMERMANN, 2012).

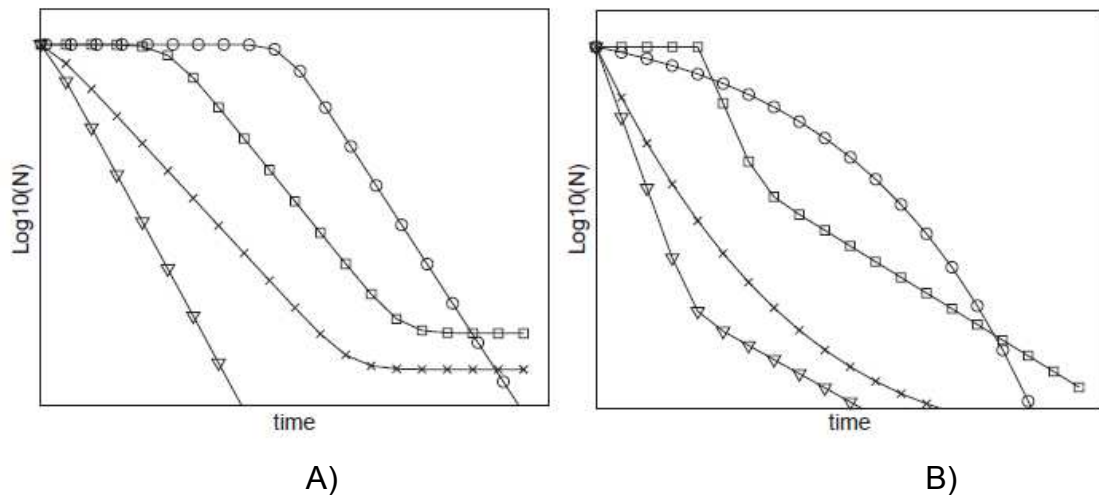
$$\log \left(\frac{N_t}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{\Delta} \right)^p \quad (4)$$

em que $N(t)$ é a população de micro-organismos ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) no instante t (tempo), N_0 é a população inicial do micro-organismo ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), p é o fator de forma, e Δ (h^{-1}) é o fator de localização, sendo que os parâmetros ajustáveis são p e Δ .

Quando $p > 1$, as curvas apresentam concavidades voltadas para baixo (forma VIII, Figura 2). Isso indica que o tempo para inativar um mesmo número de micro-organismos diminui progressivamente. Quando $p < 1$, as curvas apresentam concavidades para cima (forma VI, Figura 2) indicando que a população microbiana reduz rapidamente. Entretanto, à medida que o processo

de destruição ocorre, uma cauda é formada, indicando que a população residual é altamente resistente (PELEG, 2006; ARAGAO et al., 2007). Quando $p = 1$, a curva de sobreviventes é linear (forma I, Figura 2), considerada como cinética de primeira ordem.

Na Figura 2, estão representados alguns exemplos de curvas de inativação.



Fonte: Geeraerd et al. (2005).

Figura 2 - Exemplos de curvas de inativação comumente encontradas na literatura: A) log-linear (Δ , forma I); log-linear + cauda ($\times$, forma II); ombro+log linear+cauda (sigmoidal) ($\square$, forma III); ombro + log-linear ($\circ$, forma IV). B) bifásica (Δ , forma V); côncava ($\times$, forma VI); ombro + bifásica ($\square$, forma VII); convexa ($\circ$, forma VIII).

O modelo bifásico descrito por Cerf (1977) (Equação 5) assume a existência de duas sub-populações, apresentando cada inativação isoladamente, como sendo cinética de primeira ordem, das quais cada sub-população assume sua própria velocidade de inativação k_{max} .

$$\log 10(N_t) = \log 10(N_0) + \log 10(f \cdot \exp(-k_{max1} \cdot t) + (1 - f) \cdot \exp(-k_{max2} \cdot t)) \quad (5)$$

em que $N(t)$ é a população de micro-organismos ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) no instante t (tempo), N_0 é a população inicial do micro-organismo ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), f é a fração da população sensível ao tratamento, $1-f$ é a fração da população que é

considerada resistente ao tratamento, sendo k_{max1} (min^{-1}) e k_{max2} (min^{-1}) as velocidades específicas de inativação das duas populações, respectivamente.

Curvas de inativação bifásicas têm sido observadas em diferentes trabalhos, entretanto, curvas bifásicas precedidas de um ombro (forma VII, Figura 2), são mais incomuns e mais complexas (GEERAERD et al., 2005). Para descrever estas curvas, Geeraerd et al. (2005) propuseram uma nova estrutura de modelo (Equação 6), combinando as características dos modelos propostos por Geeraerd et al. (2000) (forma II, III e IV, Figura 2) com as características do modelo bifásico proposto por Cerf (1997) (forma V, Figura 2).

$$\begin{aligned} \log_{10}(N_t) = & \log_{10}(N_0) + \\ & \log_{10}((f \cdot \exp(k_{max1} \cdot t) + \\ & (1 - f) \cdot \exp(-k_{max2} \cdot t)) \cdot \left(\frac{e^{k_{max1} \cdot SI}}{1 + (e^{k_{max1} \cdot SI} - 1) \cdot e^{-k_{max1} \cdot t}} \right) \end{aligned} \quad (6)$$

em que $N(t)$ é a população de micro-organismos ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) no instante t (tempo), N_0 é a população inicial do micro-organismo ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), f é a fração da população sensível ao tratamento, $1-f$ é a fração da população que é considerada resistente ao tratamento, sendo k_{max1} (min^{-1}) e k_{max2} (min^{-1}) as velocidades específicas de inativação das duas populações, respectivamente e SI (min) representa o ombro.

A qualidade do ajuste dos dados experimentais aos modelos matemáticos é avaliada por meio de parâmetros estatísticos, sendo que os mais comumente utilizados são o coeficiente de determinação (R^2) e o erro médio quadrático (EMQ). O coeficiente de determinação indica a confiabilidade de um modelo e descreve o ajuste do modelo em toda a extensão da curva (MATOS, 2013). O R^2 varia entre 0 e 1, assim, quanto mais próximo de 1, melhor é a predição do modelo. O EMQ (Equação 7) é uma medida da variabilidade residual, ou seja, descreve o quanto os valores preditos estão próximos dos valores observados. Quanto mais próximo de zero é este índice, melhor é o ajuste do modelo (MATOS, 2013).

$$EMQ = \sum \frac{(\text{predito} - \text{observado})^2}{n-p} \quad (7)$$

em que n é o número de observações e p é o número de parâmetros a ser estimado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

As análises para determinar o espectro de ação, a Concentração Mínima Inibitória (CMI), a Concentração Mínima Bactericida (CMB) e o efeito de concentrações subinibitórias de Ag-NPs e de AgNO₃ na adesão microbiana foram realizadas sobre as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Bacillus cereus* estirpe G1, isolado de tanque de resfriamento de leite (BARRETO, 2012) e sobre as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13076 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. As análises de microscopia eletrônica de transmissão e peroxidação de lipídeos foram realizadas sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*. As demais análises como, efeito de agentes antioxidantes na inibição da atividade antimicrobiana das Ag-NPs e do AgNO₃, liberação de íons a partir das Ag-NPs e cinética de inativação, foram realizadas sobre *P. aeruginosa*.

As suspensões de células vegetativas foram obtidas pela ativação das bactérias, mantidas a 4 °C em tubos de ensaio contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI, Himédia®) inclinado, em caldo BHI (Himédia®) seguida de incubação a 37 °C, por 18 h.

3.1. Síntese e revestimento das nanopartículas de prata

As Ag-NPs foram obtidas pela redução do AgNO₃ com citrato de sódio (Ag-NPC), como descrito por Monteiro et al. (2009), com pequenas modificações. Foram aquecidos 100 mL de 1 mM AgNO₃ (Sigma-Aldrich, USA)

em um balão de três-pescoço, acoplado em um condensador, e após 2 min de ebulição foram adicionados 10 mL de 36 mM citrato de sódio (Sigma-Aldrich, USA). A solução foi mantida em ebulição até começar aparecer uma coloração amarelo-pálido (~ 3,0 min). Então, a fonte de calor foi desligada e o balão permaneceu em contato com a malha de aquecimento por mais alguns minutos (~ 2 min) até obtenção da cor amarela, indicando a formação das Ag-NPs. A dispersão foi então retirada da fonte de calor e resfriada em temperatura ambiente.

As Ag-NPC foram revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma-Aldrich, USA), peso molecular 55.000 e com carboximetilcelulose (CMC) (GARCIA, 2011). A dispersão de Ag-NPC foi misturada com soluções aquosas de PVP 0,3% ou CMC 0,5%, na proporção de 1:1 (v/v), sendo denominadas Ag-NPC-PVP ou Ag-NPC-CMC, respectivamente.

3.2. Determinação do espectro de ação

O espectro de ação antimicrobiana foi determinado pela técnica da inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar, de acordo com a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003), com modificações.

O ágar *Müller-Hinton* (Himedia®) foi preparado conforme as instruções do fabricante. Imediatamente após a esterilização a 121 °C, por 15 min, o meio foi resfriado em estufa entre 42 °C e 45 °C e 25 mL foram distribuídos em placas de Petri, para garantir uma profundidade uniforme de, aproximadamente, 4 mm.

3.2.1. Preparo do inóculo

As bactérias foram ativadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C, por 18 h. Em seguida, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 4000 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas por duas vezes com solução salina 0,85% m/v. O inóculo foi preparado fazendo-se suspensão direta do *pellet* obtido, em solução salina. A absorbância foi ajustada para 0,100 a 625 nm utilizando espectrofotômetro (SP 22, Biospectro),

disponível no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica da Universidade Federal de Viçosa, o que corresponde ao padrão McFarland 0,5, que contém, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹. Esta suspensão foi utilizada para inocular as placas.

3.2.2. Inoculação das placas e leitura dos resultados

Um *swab* de algodão esterilizado foi imerso na suspensão preparada anteriormente até 15 min após ajustar a turbidez. O *swab* foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para retirar o excesso de inóculo.

A superfície seca da placa de ágar *Müller-Hinton* foi inoculada passando-se o *swab* em toda a superfície do ágar. O procedimento foi repetido outras duas vezes, girando a placa, aproximadamente, 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, o *swab* foi passado na margem da placa contendo o meio de cultura.

Poços foram perfurados no ágar utilizando-se moldes de plástico, previamente cortados e autoclavados a 121 °C, por 15 min, de forma a padronizar o diâmetro da perfuração em 5 mm. Foram inoculados 30 µL de cada antimicrobiano, em cada poço. As placas foram mantidas sob refrigeração na temperatura entre 7 °C a 10 °C *overnight* para difusão dos antimicrobianos e, em seguida, incubadas a 37 °C, por 18 h. Após este período os halos foram medidos (em centímetros) com a placa de Petri invertida, utilizando-se uma régua milimetrada. O experimento foi realizado em duplicata e com três repetições.

3.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Bactericida (CMB)

A CMI foi determinada pelo método da macrodiluição em tubos de acordo com a norma CLSI, 2003. Foram feitas diluições seriadas de duas vezes em caldo *Müller-Hinton* em que a concentração variou de 0,098 µg·mL⁻¹ a 50 µg·mL⁻¹ para as Ag-NPC sem revestimento e para o AgNO₃ e de 0,098 µg·mL⁻¹ a 25 µg·mL⁻¹ para as Ag-NPC revestidas com polivinilpirrolidona (Ag-

NPC-PVP) e revestidas com carboximetilcelulose (Ag-NPC-CMC). Os tubos foram inoculados com, aproximadamente, $5,0 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹ de cada bactéria e incubados a 37 °C, por 18 h. Foram considerados tubos positivos, aqueles que apresentarem turbidez visível a olho nu e negativos os que não apresentaram turbidez visível. A CMI foi a menor concentração do antimicrobiano que inibiu a multiplicação microbiana.

Para confirmar se houve morte, efeito bactericida, ou inibição do crescimento, efeito bacteriostático, os tubos classificados como negativos foram analisados. Após homogeneização em vortex, todo o líquido foi transferido para tubos *falcon* de 15 mL, previamente autoclavados. A amostra foi centrifugada a 4000 x *g* por 5 min e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas por duas vezes com 10 mL de solução salina 0,85% m/v para retirada do antimicrobiano. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 100 µL de solução salina e todo volume foi inoculado em placas de Petri contendo ágar padrão para contagem (PCA) (Himédia®). As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h. A CMB foi a menor concentração que inibiu o crescimento microbiano nas placas.

3.4. Determinação da adesão microbiana

Para determinar o efeito de concentrações subinibitórias de Ag-NPC e de AgNO₃ na adesão de bactérias gram-negativas e gram-positivas, 150 µL de caldo *Müller-Hinton* suplementado com doses subinibitórias de Ag-NPC ou de AgNO₃ foram inoculados com, aproximadamente, $5,0 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹ de cada suspensão de bactéria. O experimento foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 h e após este período o crescimento planctônico foi determinado pela medida da densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) em leitora de microplacas (Multiskan GO 1510, *Thermo Scientific*). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas à superfície foram coradas com 150 µL de 0,1% (m/v) de cristal violeta durante 30 min. Em sequência, o cristal violeta foi removido e a placa foi lavada três vezes com água. Após secagem durante 20 min a 40 °C, foram adicionados 150 µL de 95% (v/v) de etanol em cada poço.

As células aderidas (sésseis) foram determinadas pela medida da absorbância a 590 nm (VIANA, 2009).

3.5. Determinação da hidrofobicidade

Cupons de poliestireno (20 mm x 20 mm) foram lavados empregando-se água e detergente líquido, enxaguados com água destilada, seguidos de imersão em álcool etílico 95%, por 30 min, para remoção de resíduos de gordura. Os cupons foram novamente rinsados com água destilada, secos à temperatura ambiente e esterilizados por radiação ultra-violeta (UV), por 15 min de cada lado. Após este procedimento, os cupons foram condicionados pela imersão em 30 mL de caldo *Müller-Hinton* sem antimicrobiano e caldo *Müller-Hinton* acrescido de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AgNPC ou AgNO_3 , seguidos de incubação a 37 °C, por 48 h. Como controle, os cupons também foram condicionados com água. A determinação da hidrofobicidade (energia livre de interação hidrofóbica) foi realizada pela medida do ângulo de contato entre as superfícies de poliestireno pré-condicionadas e três líquidos com diferentes polaridades (água (Mili Q), formamida (LGC Bio, Brazil) e α -bromonaftaleno (MERCK, Brazil)) utilizando goniômetro (DAS 100, Kruss®, Alemanha) disponível no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

O ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes sobre a superfície foi determinado para se obter os três componentes da tensão interfacial das superfícies. A equação de Young-Good-Girifalco-Fowkes (Equação 8) relaciona o ângulo de contato formado pelo líquido sobre uma superfície sólida com os componentes da tensão interfacial do líquido (γ_l^{LW} , γ_l^+ , γ_l^-) e da superfície (γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^-).

$$(1 + \cos\theta)\gamma_l^{\text{TOT}} = 2(\sqrt{\gamma_s^{\text{LW}}\gamma_l^{\text{LW}}} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^-\gamma_l^+}) \quad (8)$$

em que γ_l^{TOT} é a tensão interfacial total do líquido; γ_l^{LW} é a tensão interfacial das forças de interações de Lifshitz-van der Waals; γ_l^+ é a tensão interfacial do componente aceptor de elétrons do componente ácido-base e γ_l^- é a tensão

interfacial do componente doador de elétrons do componente ácido-base e os subscritos s e l indicam superfície e líquido, respectivamente.

Utilizando os valores contidos na Tabela 1 e aplicando-se a Equação 8 para cada um dos líquidos usados obteve-se o seguinte sistema de equações:

$$\gamma_s^{LW} = 11,1(1 + \cos\theta_B)^2 \quad (9)$$

$$5,049\sqrt{\gamma_s^+} + 5,049\sqrt{\gamma_s^-} = 36,4(1 + \cos\theta_A) - 15,55(1 + \cos\theta_B) \quad (10)$$

$$6,293\sqrt{\gamma_s^+} + 1,510\sqrt{\gamma_s^-} = 29(1 + \cos\theta_F) - 20,806(1 + \cos\theta_B) \quad (11)$$

em que, θ_B é o ângulo de contato formado com α -bromonaftaleno, θ_A é o ângulo de contato formado com a água e θ_F é o ângulo de contato formado com a formamida.

Na Tabela 1 estão apresentados os componentes da tensão interfacial de alguns líquidos, a 25 °C.

Tabela 1 - Componentes da tensão de interfacial de líquidos a 25 °C.

Líquido	Tensão interfacial (mJ.m ⁻²)			
	γ_l^{Tot}	γ_l^{LW}	γ_l^+	γ_l^-
Di-iodometano	50,8	50,8	0,0	0,0
α -Bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Água	72,8	21,8	25,50	25,5
Glicerol	64,0	34,0	3,92	57,4
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6
Decano	23,8	23,8	0,0	0,0

Fonte: van der Mei et al. (1998).

Os três componentes da tensão interfacial da superfície, γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^- , foram determinados pela resolução das três últimas equações.

A energia livre global de interação hidrofóbica (ΔG_{sas}^{TOT}) entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (a) é calculada pelo somatório das

componentes apolar e polar da energia livre de interação, ΔG_{sas}^{LW} e ΔG_{sas}^{AB} respectivamente, conforme a Equação 12.

$$\Delta G_{sas}^{TOT} = \Delta G_{sas}^{LW} + \Delta G_{sas}^{AB} \quad (12)$$

A componente apolar é determinada de acordo com a Equação 13.

$$\Delta G_{sas}^{LW} = -2(\sqrt{\gamma_s^{LW}} - \gamma_a^{LW}) \quad (13)$$

A componente polar é calculada de acordo com a Equação 14.

$$\Delta G_{sas}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_a^-} - \sqrt{\gamma_a^+ \gamma_s^-}\right) \quad (14)$$

Quanto maior o valor absoluto de ΔG_{sas}^{TOT} mais hidrofóbica é a superfície por apresentar valores negativos ou mais hidrofílica quando apresenta valores positivos (van OSS; GIESE, 1995).

3.6. Microscopia eletrônica de transmissão/espectroscopia de energia dispersiva de raio-x (MET/EDS)

P. aeruginosa e *S. aureus* foram ativados em caldo BHI e incubados a 37 °C, por 18 h. A densidade óptica (DO₆₃₀) foi ajustada para 0,4 a 630 nm (LIU et al., 2004). Um mililitro da suspensão bacteriana foi centrifugado a 4.000 x g, por 10 min. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em 10 mL de caldo *Müller-Hinton* (controle) ou caldo *Müller-Hinton* acrescido de 50 µg·mL⁻¹ de Ag-NPC ou AgNO₃. Após incubação a 37 °C por 2 h, a suspensão foi centrifugada e as células lavadas duas vezes em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7.2. As células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em PBS 0,1 M, por 24 h. Posteriormente, pós-fixadas em 1% (p/v) de tetraóxido de ósmio (OsO₄) em PBS 0,1 M, por 2 h em temperatura ambiente, lavadas uma vez no mesmo tampão e desidratadas por meio de transferências sequenciais em uma série graduada de soluções de etanol. Sessões finas das amostras foram cortadas com lâminas de diamante utilizando ultramicrômetro. Os cortes foram duplamente corados com acetato de uranila e citrato de chumbo saturados e observados

utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (TECNAI G2-20-FEI, 2006) com detector de EDS, disponível no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.7. Efeito de agentes antioxidantes na atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata e do nitrato de prata

Para verificar se a geração de ERO está envolvida na atividade antimicrobiana da prata, $5,0 \times 10^5$ UFC·mL⁻¹ de *P. aeruginosa* foram inoculados em caldo *Müller-Hinton* acrescido de 25 µg·mL⁻¹ de Ag-NPs ou AgNO₃ e em caldo *Müller-Hinton* acrescido de 25 µg·mL⁻¹ de Ag-NPs ou AgNO₃ e de 10 mM de ácido ascórbico, L-cisteína ou tiosulfato de sódio. Foi feito o controle com caldo *Müller-Hinton* sem adição de Ag-NPC ou AgNO₃ e caldo *Müller-Hinton* acrescido de 10 mM de ácido ascórbico, L-cisteína ou tiosulfato de sódio. Após incubação a 37 °C, por 24 h, a multiplicação microbiana foi determinada pela leitura da densidade óptica a 600 nm. O experimento foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços, em três repetições.

3.8. Peroxidação de lipídeos

A análise de peroxidação de lipídeos foi realizada de acordo com Becerra et al. (2006), com algumas adaptações. Amostras de 1 mL contendo 50 µg de Ag-NPC ou AgNO₃ foram inoculadas com, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC de *P. aeruginosa* ou *S. aureus* e incubadas a 37 °C, por 1 h. Em seguida, foi adicionado 1 mL de 35% (p/v) de ácido tricloroacético. Após 20 min, 1 mL de 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico foi adicionado e as amostras aquecidas a 80 °C, por 30 min. As amostras foram resfriadas e centrifugadas a 4000 x g, por 5 min. A absorbância foi determinada a 535 nm utilizando espectrofotômetro (SP 22, Biospectro). Foram feitos os controles com água e com 2,2'-azobios (2-methyl-propionamide) dihydrochloride (AAPH, Sigma-Aldrich, USA), um gerador de ERO. Foi feita uma curva padrão de malonaldeído obtido pela hidrólise do 1'1'3'3'- tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich, USA).

3.9. Liberação de íons Ag^+ a partir das nanopartículas de prata

Para verificar liberação de íons Ag^+ a partir das Ag-NPC, 2,0 mL de caldo *Müller-Hinton* inoculado com, aproximadamente, $1,0 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de células planctônicas de *P. aeruginosa* foi introduzido em tubos de diálise (6000-8000 MWCO, Cellu-Sep), que tiveram suas extremidades firmemente amarradas com linha de nylon. Os tubos de diálise foram introduzidos em frascos contendo 38 mL de $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Ag-NPC ou AgNO_3 ou água deionizada (controle). Os frascos foram incubados a 25°C , por 6 h ou 24 h. Após o período de incubação, as células foram removidas assepticamente do tubo de diálise utilizando seringa com agulha e diluições decimais apropriadas foram realizadas em água peptonada 0,1%. Alíquotas foram inoculadas por espalhamento em superfície em placas de Petri contendo PCA. Após incubação a 37°C , por 24 h, as colônias foram enumeradas. Procedimento semelhante foi realizado para certificar que as Ag-NPs não atravessaram a membrana de diálise. Neste caso, a suspensão de células dentro do tubo de diálise foi substituída por água deionizada. Após 24 h, as amostras foram retiradas de dentro do tubo de diálise e analisadas por espectroscopia UV-Vis e espalhamento dinâmico de luz (DLS).

3.10. Cinética de inativação

Aproximadamente $1,0 \times 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de células planctônicas de *P. aeruginosa*, obtidas pela ativação em caldo BHI a 37°C , por 18 h, foram tratadas com $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ou $12,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Ag-NPC ou AgNO_3 diluídos em água deionizada e incubados a 25°C ou 37°C , ou diluídos em caldo *Müller-Hinton* e incubados a 37°C . Em determinados intervalos de tempo, que variou em cada tratamento, alíquotas foram retiradas e diluições decimais foram feitas em água peptonada 0,1% acrescida de 10 mM de tiosulfato de sódio, para neutralizar a prata. Diluições decimais seriadas foram realizadas em água peptonada 0,1% e diluições apropriadas foram inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície em placas de Petri contendo PCA. As placas foram incubadas a 37°C , por 24 h e o número de colônias contadas.

3.10.1. Ajuste dos modelos cinéticos

Os dados experimentais obtidos foram ajustados aos modelos cinéticos utilizando o programa GlnaFIT, versão 1.6 (GEERAERD et al., 2005). Os dados foram ajustados aos seguintes modelos:

- 1) bifásico com ombro, Equação 6 (GEERAERD et al., 2005).
- 2) bifásico, Equação 5 (Cerf, 1977).
- 3) Log linear com ombro (GEERAERD et al., 2000), Equação 15.

$$N(t) = N_0 \cdot \exp(-K_{max} \cdot t) \cdot \frac{\exp(K_{max} \cdot S)}{1 + (\exp(K_{max} \cdot S) - 1) \exp(-k_{max} \cdot t)} \quad (15)$$

em que $N(t)$ é a população de micro-organismos ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) no instante t (tempo), N_0 é a população inicial do micro-organismo ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), $k_{max}(\text{min}^{-1})$ é a velocidade específica de inativação e S (min) representa o ombro.

- 4) Log linear com ombro e cauda (Equação 16) proposto por Geeraerd et al. (2000) (SUN, 2012).

$$\log N = \log \left\{ (10^{\log N_0} - 10^{\log N_{res}}) \cdot \exp(-k_d t) \left(\frac{\exp(k_d S)}{1 + (\exp(k_d S) - 1) \exp(-k_d t)} \right) + 10^{\log N_{res}} \right\} \quad (16)$$

em que N é a população de micro-organismos ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) no instante t (tempo), N_0 é a população inicial do micro-organismo ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$), N_{res} é a população residual, k (min^{-1}) é a velocidade específica de inativação e S (min) representa o ombro.

3.11. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Uma vez verificada a significância da interação pelo teste F da ANOVA, foi realizado o teste Tukey com 5% de probabilidade para comparação de médias.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *Statistical Analysis System*, (SAS®), versão 9.1 (*Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata e do nitrato de prata sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas

4.1.1. Inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar

Constatou-se por meio do teste da inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar que tanto as Ag-NPC quanto o AgNO₃ apresentaram amplo espectro de ação, o que demonstrou a atividade antimicrobiana sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Não houve diferença ($p > 0,05$) no diâmetro do halo de inibição entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas tratadas com Ag-NPC ou com AgNO₃ (Tabela 2).

Tabela 2 - Diâmetro médio (cm) do halo de inibição microbiana por ação de nanopartículas de prata (Ag-NPC) e nitrato de prata (AgNO₃)

Bactérias	Diâmetro do halo de inibição (cm)	
	Média* $\pm$ desvio padrão	
	Ag-NPC	AgNO ₃
<i>S. aureus</i>	1,6 $\pm$ 0,6 a	1,6 $\pm$ 0,5 a
<i>B. cereus</i>	1,4 $\pm$ 0,5 a	1,5 $\pm$ 0,5 a
<i>E. faecalis</i>	1,6 $\pm$ 0,3 a	1,4 $\pm$ 0,2 a
<i>P. aeruginosa</i>	2,2 $\pm$ 0,3 a	2,0 $\pm$ 0,4 a
<i>E. coli</i>	2,4 $\pm$ 0,4 a	2,1 $\pm$ 0,7 a
<i>S. Typhimurium</i>	2,2 $\pm$ 0,4 a	2,1 $\pm$ 0,6 a

*Média de três repetições. Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com Montanari et al. (2012), o tamanho do halo de inibição pode ser influenciado pela capacidade de difusão de cada antimicrobiano. O método padronizado pela CLSI foi desenvolvido para análise de agentes antimicrobianos convencionais como antibióticos. Essas substâncias são, em geral, hidrofílicas e difundem-se mais facilmente em ágar. Entretanto, substâncias voláteis, viscosas, insolúveis em água ou que possuem uma

composição química complexa, como os óleos essenciais, podem ter uma difusão comprometida (MONTANARI et al., 2012).

4.1.2. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Bactericida (CMB)

As Ag-NPC e o AgNO₃ apresentaram maior efeito antimicrobiano sobre as bactérias gram-negativas do que sobre às gram-positivas. A CMI das Ag-NPC foi 50 µg·mL⁻¹ e 6,25 µg·mL⁻¹, sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente (Tabela 3). Fayaz et al. (2009) também encontraram menores valores de CMI de Ag-NPs sobre bactérias gram-negativas em relação às gram-positivas. Para as bactérias gram-negativas *E. coli* e *Salmonella* Typhi a CMI foi 30 µg·mL⁻¹ e 35 µg·mL⁻¹, respectivamente. Para as bactérias gram-positivas *S. aureus* e *Micrococcus luteus* a CMI foi 80 µg·mL⁻¹ e 65 µg·mL⁻¹, respectivamente.

O AgNO₃ foi mais efetivo do que as Ag-NPC sobre as bactérias gram-positivas, apresentando CIM de 25 µg·mL⁻¹. Sobre as bactérias gram-negativas, o AgNO₃ foi mais efetivo do que as Ag-NPC sobre *P. aeruginosa* apresentando CIM de 3,125 µg·mL⁻¹, entretanto apresentou a mesma CMI das Ag-NPC sobre *E. coli* e *S. Typhimurium* (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) de nanopartículas de prata sintetizadas com citrato de sódio (Ag-NPC) e nitrato de prata (AgNO₃) sobre diferentes bactérias

Bactérias	CMI (µg·mL ⁻¹)		CMB (µg·mL ⁻¹)	
	Ag-NPC	AgNO ₃	Ag-NPC	AgNO ₃
<i>S. aureus</i>	50	25	>50	>50
<i>B. cereus</i>	50	25	>50	>50
<i>E. faecalis</i>	50	25	>50	>50
<i>P. aeruginosa</i>	6,25	3,125	25	25
<i>E. coli</i>	6,25	6,25	25	25
<i>S. Typhimurium</i>	6,25	6,25	50	25

A concentração mínima inibitória foi definida como a menor concentração de Ag-NP ou AgNO₃ que inibiu completamente o crescimento microbiano após 18 h de incubação, a 37 °C, em caldo *Müller-Hinton*.

Outros autores também encontraram menores valores de CMI para o AgNO_3 em comparação com Ag-NPs (XIU et al., 2011; RADZIG et al., 2013). De acordo com Xiu et al. (2011), os íons Ag^+ apresentaram maior atividade antimicrobiana em relação às Ag-NPs. De acordo com os autores a maior biodisponibilidade e potencial de captação dos íons Ag^+ em comparação com as Ag-NPs, pode explicar sua maior toxicidade.

A CMB das Ag-NPC e do AgNO_3 sobre as bactérias gram-negativas foi de 4 a 8 vezes maior que a CMI. Não foi determinado a CMB das Ag-NPC e do AgNO_3 sobre as bactérias gram-positivas, mesmo na maior concentração estudada, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, indicando que tanto as Ag-NPs quanto o AgNO_3 apresentaram somente efeito bacteriostático sobre estas bactérias.

Em estudo realizado por Jain et al. (2009), também não se determinou a CMB sobre *S. aureus*, pois as Ag-NPs apresentaram somente efeito bacteriostático, mesmo na maior concentração testada ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Egger et al. (2009) reportaram que as bactérias gram-positivas também foram mais tolerantes à prata em relação as bactérias gram-negativas com exceção de *E. faecalis* que apresentou CMI e CMB similar às bactérias gram-negativas.

De acordo com vários autores, a menor eficiência das Ag-NPs e do AgNO_3 contra as bactérias gram-positivas em comparação com as gram-negativas, pode ser associado à diferença estrutural da parede celular entre essas bactérias (FENG et al., 2000; KIM et al., 2007; SHRIVASTAVA et al., 2007). Bactérias gram-negativas apresentam uma membrana externa, composta de proteínas, lipopolissacarídeos e fosfolopídeos, seguida de uma fina camada de peptídeoglicano ($\sim 10 \text{ nm}$), enquanto as bactérias gram-positivas possuem uma espessa camada de peptídeoglicano ($\sim 20\text{-}80 \text{ nm}$) e são desprovidas da membrana externa.

Não foi verificada a influência do potencial zeta (ζ) sobre a atividade antimicrobiana das Ag-NPC, pois a CMI das Ag-NPC revestidas com PVP ($\zeta = -21,9 \pm 2,8 \text{ mV}$) ou revestidas com CMC ($\zeta = -58,8 \pm 6,9 \text{ mV}$) sobre as bactérias gram-negativas (Tabela 4), foi igual a CMI das Ag-NPC sem revestimento ($\zeta = -31,9 \pm 8,6 \text{ mV}$) (Tabela 3).

A CMI das Ag-NPC-PVP e das Ag-NPC-CMC sobre as bactérias gram-positivas, não foi determinada, em função da baixa concentração de prata nas amostras. Como foi demonstrado, a CMI das Ag-NPC sobre as bactérias gram-

positivas é de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a concentração máxima das Ag-NPC-PVP e das Ag-NPC-CMC é de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pois estas são diluídas (1:1 v/v) com as soluções de polímeros durante a etapa de revestimento.

Tabela 4 - Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) de nanopartículas de prata revestidas com polivinilpirrolidona (Ag-NPC-PVP) e com carboximetilcelulose (Ag-NPC-CMC)

Bactérias	CMI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		CMB ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	Ag-NPC-PVP	Ag-NPC-CMC	Ag-NPC-PVP	Ag-NPC-CMC
<i>S. aureus</i>	>25	>25	-	-
<i>B. cereus</i>	>25	>25	-	-
<i>E. faecalis</i>	>25	>25	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	6,25	6,25	>25	>25
<i>E. coli</i>	6,25	6,25	>25	>25
<i>S. Typhimurium</i>	6,25	6,25	>25	>25

De acordo com Morones et al. (2005), forças eletrostáticas devem estar envolvidas na interação das Ag-NPs com as bactérias. Em valores biológicos de pH, as bactérias apresentam maior densidade de carga negativa associado a presença de grupos carboxil e fosforil (LANGLEY; BEVERIDGE, 1999). Em geral, o potencial ζ de bactérias varia de -10 mV a -90 mV (FLINT; BROOKS, 2007). Como a superfície celular fica em contato direto com o ambiente, os grupos carregados podem interagir com os íons ou moléculas carregadas presentes no meio externo. Sendo assim, os cátions de metais podem tornar-se eletrostaticamente atraídos e se ligarem na superfície das células (MULLEN et al., 1989). Em estudo realizado por El Badawy et al. (2011), foi demonstrada uma correlação direta entre carga superficial de quatro diferentes Ag-NPs e a atividade antimicrobiana. Esses autores avaliaram Ag-NPs sem revestimento (ζ = -22 mV), revestidas com citrato (ζ = -38 mV), revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) (ζ = -10 mV) e revestidas com polietilenoimina (ζ = +40 mV). As Ag-NPs revestidas com citrato (mais negativas) apresentaram menor atividade antimicrobiana, enquanto as Ag-NPs revestidas com polietilenoimina (positiva) apresentaram maior atividade antimicrobiana. O

potencial ζ das Ag-NPs revestidas com citrato foi similar ao potencial ζ da bactéria ($\zeta = -37$ mV), sendo assim, há uma repulsão entre essas Ag-NPs e a bactéria, o que cria uma barreira eletrostática e limita a interação partícula-bactéria e diminui a atividade antimicrobiana. À medida que o potencial ζ tornou-se menos negativo, -22 mV para as Ag-NPs sem estabilizante e -10 mV para as Ag-NPs revestidas com PVP, a barreira eletrostática diminuiu e a atividade antimicrobiana aumentou gradualmente. A interação tornou-se atrativa quando se utilizou Ag-NPs com potencial ζ positivo, pois permitiu maior grau de interação e maior atividade antimicrobiana (El BADAWY et al., 2011).

De acordo com Sondi e Salopek-Sondi (2004), o mecanismo de interação das Ag-NPs carregadas negativamente com os constituintes da membrana ainda não está compreendido. Normalmente, o potencial ζ das Ag-NPs é determinado em água e não no meio em que as análises microbiológicas são realmente feitas. De acordo com Reidy et al. (2013), é importante caracterizar as Ag-NPs no meio em que os experimentos são realizados e não apenas em água. É provável que o meio de cultura altere as propriedades físico-químicas das Ag-NPs.

4.1.3. Efeito de concentrações subinibitórias de nanopartículas de prata e de nitrato de prata na adesão microbiana

A adesão das bactérias na superfície de poliestireno foi estimada pelo cálculo da taxa entre a absorbância do cristal violeta (ACV) e da densidade óptica das células (DOC). A adesão das bactérias gram-negativas cultivadas em concentrações subinibitórias de Ag-NPC ou AgNO₃ está representada na Figura 3. Concentrações subinibitórias de AgNO₃ não alterou ($p > 0,05$) a adesão das bactérias gram-negativas *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. As Ag-NPC também não afetaram a adesão de *E. coli* e *S. Typhimurium*, entretanto, diminuiu ($p < 0,05$) a adesão de *P. aeruginosa* em relação ao controle.

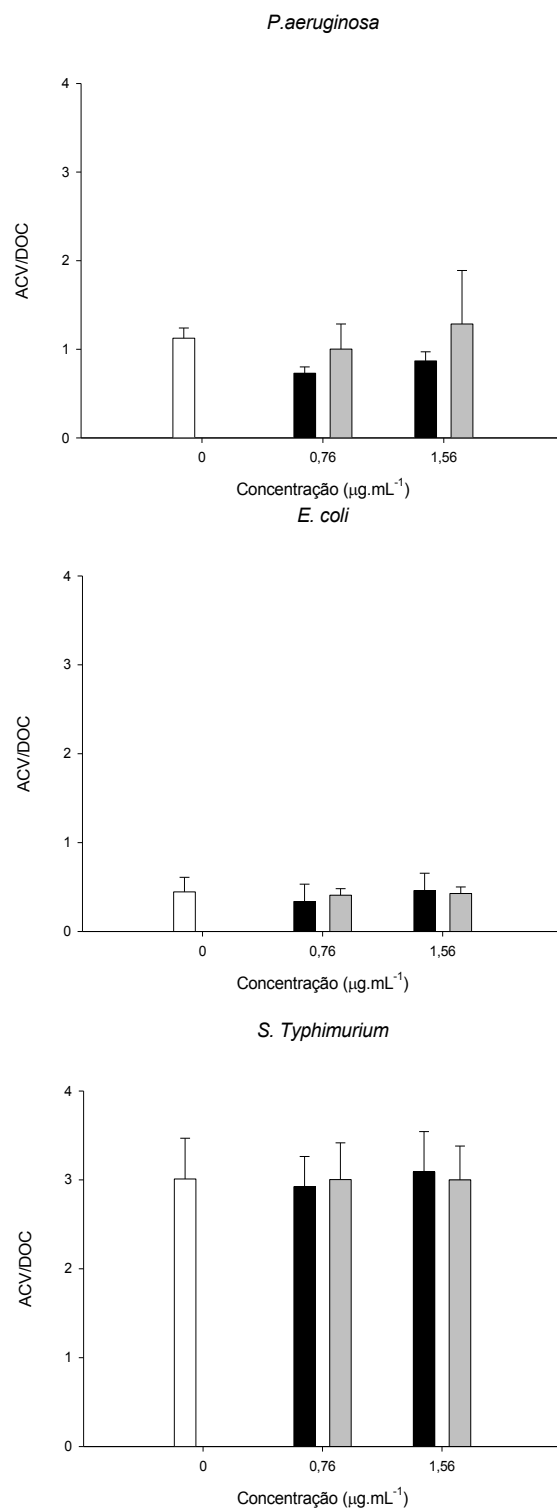


Figura 3 - Taxa entre a absorbância do cristal violeta (ACV) e da densidade óptica das células (DOC) de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* tratadas com concentrações subinibitórias de nanopartículas de prata (barra preta) ou nitrato de prata (barra cinza). A barra branca representa o controle (células não tratadas). As bactérias foram cultivadas em caldo *Müller-Hinton*, por 48 h.

Algumas substâncias antimicrobianas, como o ácido hipocloroso, afeta a formação de biofilme por interferir na comunicação célula a célula (*quorum sensing*) (BORCHARDT et al., 2001). A interferência nessas moléculas sinalizadoras pode proporcionar um novo mecanismo para controle de biofilme.

As bactérias gram-positivas *S. aureus*, *B. cereus* e *E. faecalis*, tratadas com doses subinibitórias de Ag-NPC ou de AgNO₃, apresentaram maior adesão do que as células não tratadas (controle) (Figura 4).

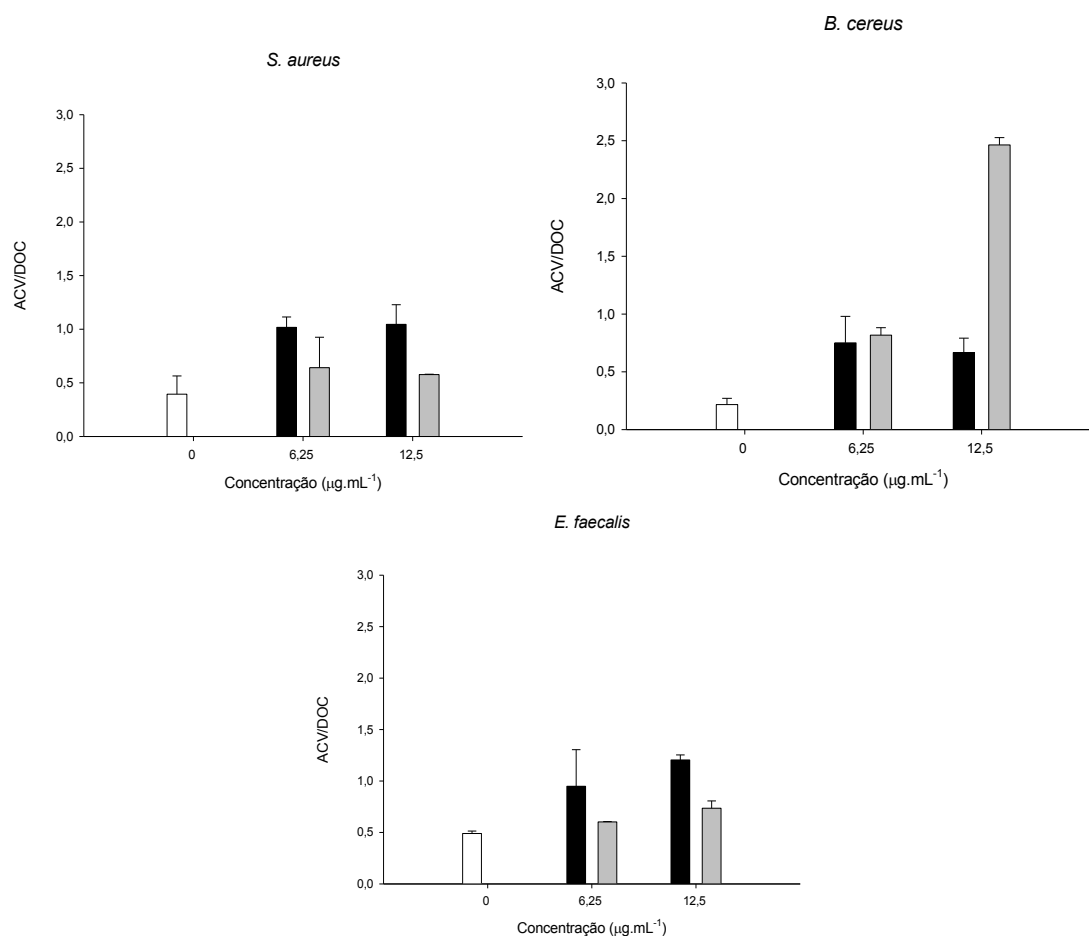


Figura 4 - Taxa entre a absorbância do cristal violeta (ACV) e da densidade óptica das células (DOC) de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* tratadas com concentrações subinibitórias de nanopartículas de prata (barra preta) ou nitrato de prata (barra cinza). A barra branca representa o controle (células não tratadas). As bactérias foram cultivadas em caldo *Müller-Hinton*, por 48 h.

Estudos têm mostrado que concentrações subinibitórias de agentes antimicrobianos podem diminuir (WOJNICZ; TICHACZEK-GOSKA, 2013; PIMENTEL-FILHO et al., 2014) ou aumentar (HOFFMAN et al., 2005; AHMED et al., 2009; NUCLEO et al., 2009; KAPLAN et al., 2011) a formação de biofilme, dependendo da estirpe e do agente antimicrobiano utilizados.

De acordo Xiu et al. (2012), *E. coli* apresentou maior viabilidade celular quando tratada com doses subletais de Ag-NPs ou AgNO₃ em comparação com o controle. Eles sugeriram que o efeito hormético pode ter sido desencadeado pela presença desses antimicrobianos em baixas doses. De acordo com esses autores doses subletais podem aumentar a aptidão das bactérias e dificultar aplicações antimicrobianas. A presença de produtos tóxicos em baixas doses pode ativar mecanismos de reparo nas células contra os seus efeitos (XIU et al., 2012). A maior formação de biofilme pelas bactérias gram-positivas na presença das Ag-NPC e do AgNO₃ pode indicar um mecanismo de defesa ou de resistência. Sabe-se que na forma de biofilme, as bactérias se tornam mais resistentes à ação de sanitizantes físicos e químicos. De acordo com Lemon et al. (2008), os biofilmes podem proteger as bactérias de algumas condições ambientais adversas, como antibióticos e o sistema imune humano.

Maior formação de biofilmes ocorreu, em relação ao controle, em bactérias tratadas com doses subletais de antibióticos. Tem sido relatado que as bactérias respondem de forma específica e defensiva para doses subletais de antimicrobianos (HOFFMAN et al., 2005). Esses autores mostraram que concentrações subinibitórias de aminoglicosídeos induziram a formação de biofilme em *P. aeruginosa* e *E. coli*, por interferir em genes relacionados com apêndices celulares como pili e flagelo, que facilitam a formação de biofilme. De acordo com Rachid et al. (2000), doses subletais dos antibióticos tetraciclina e quinupristin-dalfopristin aumentaram a formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis*, pois induziram a expressão do gene *ica*, levando à maior produção de um polissacarídeo crucial para a formação de biofilme por esta bactéria.

4.1.3.1. Análise da energia livre global de interação hidrofóbica (ΔG_{sas}^{TOT})

Sabe-se que um dos fatores que interfere na adesão microbiana é a hidrofobicidade da superfície de contato. De modo geral, superfícies mais hidrofóbicas são mais susceptíveis à formação de biofilme (DONLAN, 2001). Para verificar a influência das Ag-NPC e do $AgNO_3$ na hidrofobicidade da superfície, cupons de poliestireno foram condicionados com Ag-NPC ou com $AgNO_3$, e a hidrofobicidade determinada pela medida do ângulo de contato.

Os valores dos ângulos de contato entre a água, a formamida e α -bromonaftaleno e as superfícies de poliestireno condicionadas com água, com caldo *Müller-Hinton* e com caldo *Müller-Hinton* adicionado de $25 \mu g \cdot mL^{-1}$ de Ag-NPC ou $AgNO_3$, estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão dos ângulos de contato determinados com água (θ_A), formamida (θ_F) e α -bromonaftaleno (θ_B) sobre superfícies de poliestireno condicionadas com água e com caldo *Müller-Hinton* (MH) adicionado ou não de $25 \mu g \cdot mL^{-1}$ de Ag-NPC ou $AgNO_3$

Superfícies	θ_A^*	θ_F^*	θ_B^*
Poliestireno + água	$90,0 \pm 12,6$	$68,6 \pm 2,1$	$21,1 \pm 0,7$
Poliestireno + caldo MH	$16,4 \pm 4,4$	$26,3 \pm 2,0$	$51,5 \pm 2,3$
Poliestireno+caldo MH+Ag-NPC	$16,3 \pm 5,7$	$22,8 \pm 1,3$	$51,1 \pm 2,0$
Poliestireno+caldo MH + $AgNO_3$	$12,7 \pm 0,9$	$23,0 \pm 3,6$	$52,6 \pm 3,1$

*Médias de três repetições.

Na Tabela 6 encontram-se os valores da energia livre global de interação hidrofóbica (ΔG_{sas}^{TOT}), que permitem quantificar a hidrofobicidade da superfície.

Tabela 6 - Valores médios dos componentes apolar (ΔG_{sas}^{LW}), polar (ΔG_{sas}^{AB}) e da energia livre de interação hidrofóbica (ΔG_{sas}^{TOT}) das superfícies de poliestireno condicionadas com água e com caldo *Müller-Hinton* (MH) adicionado ou não de 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Ag-NPC ou AgNO_3 .

Superfícies	ΔG_{sas}^{LW}	ΔG_{sas}^{AB}	ΔG_{sas}^{TOT}
Poliestireno + água	-44,13	-6,27	-50,41 b
Poliestireno + caldo MH	-1,10	35,20	34,10 a
Poliestireno+ caldo MH + Ag-NPC	-1,14	31,84	30,70 a
Poliestireno+caldo MH + AgNO_3	-1,15	34,70	33,55 a

Média seguida da mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A superfície de poliestireno condicionada com água foi hidrofóbica $\Delta G_{sas}^{TOT} < 0$, entretanto, as demais superfícies de poliestireno condicionadas em caldo *Müller-Hinton* foram hidrofílicas $\Delta G_{sas}^{TOT} > 0$ (Tabela 6). Não houve diferença ($p > 0,05$) na hidrofobicidade das superfícies condicionadas com caldo *Müller-Hinton* adicionadas ou não de Ag-NPC ou AgNO_3 , ou seja, as Ag-NPC e o AgNO_3 não contribuíram para diminuir a hidrofobicidade da superfície de poliestireno, além do caldo *Müller-Hinton* apenas.

O condicionamento dos cupons de poliestireno com caldo *Müller-Hinton* fez com que a superfície passasse de hidrofóbica para hidrofílica, provavelmente, devido à adsorção de proteínas presentes no caldo. Em estudo realizado por Bernardes et al. (2012), cupons de aço inoxidável também passaram de hidrofóbico para hidrofílico após condicionamento com leite UHT, achocolatado e formulação infantil. De acordo com esses autores, essa mudança foi provocada pelos constituintes do produto, principalmente componentes anfífilos, como proteínas e ácidos graxos.

A maior adesão das bactérias gram-positivas na presença de concentrações subinibitórias de Ag-NPC ou de AgNO_3 em comparação com o controle (caldo *Müller-Hinton*), não está relacionada com a hidrofobicidade da superfície. A presença desses antimicrobianos em concentrações subinibitórias pode ter ativado algum mecanismo celular relacionado com a adesão e formação de biofilme, em resposta ao estresse.

4.2. Modo de ação das nanopartículas de prata e do nitrato de prata sobre células microbianas

4.2.1. Microscopia eletrônica de transmissão/espectroscopia de energia dispersiva de raio-x (MET/EDS)

Como pode ser visto na Figura 5a, nas células de *P. aeruginosa* sem tratamento (controle), o material citoplasmático é distribuído de forma homogênea, não apresentando condensação de material no centro da célula como observado nas células tratadas com Ag-NPC e com AgNO₃.

Pode-se observar na Figura 5b, que as células de *P. aeruginosa* foram severamente afetadas pelas Ag-NPC. Houve uma intensa condensação de material citoplasmático no centro das células e formação de uma região clara. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Feng et al. (2000), que avaliaram o efeito antimicrobiano de AgNO₃ sobre *E. coli* e *S. aureus*. Entretanto, estas modificações celulares não foram observadas por Morones et al. (2005), utilizando Ag-NPs.

Os danos causados pelo AgNO₃ (Figura 5c) foram semelhantes aos causados pelas Ag-NPC, com condensação de material citoplasmático no centro da bactéria e formação da região clara. Entretanto, houve a formação de vários pontos negros, o que foi menos evidente nas células tratadas com Ag-NPC. Feng et al. (2000) também observaram a formação desses pontos negros, denominados de “grânulos eletrodensos” nas células tratadas com AgNO₃.

A Figura 6 representa o espectro de EDS da célula de *P. aeruginosa* sem tratamento (controle) (Figura 5a). Detectou-se, principalmente, carbono e oxigênio. Os outros elementos detectados como chumbo, ósmio e urânio são provenientes das etapas de preparo da amostra e o cobre da *grid* utilizada.

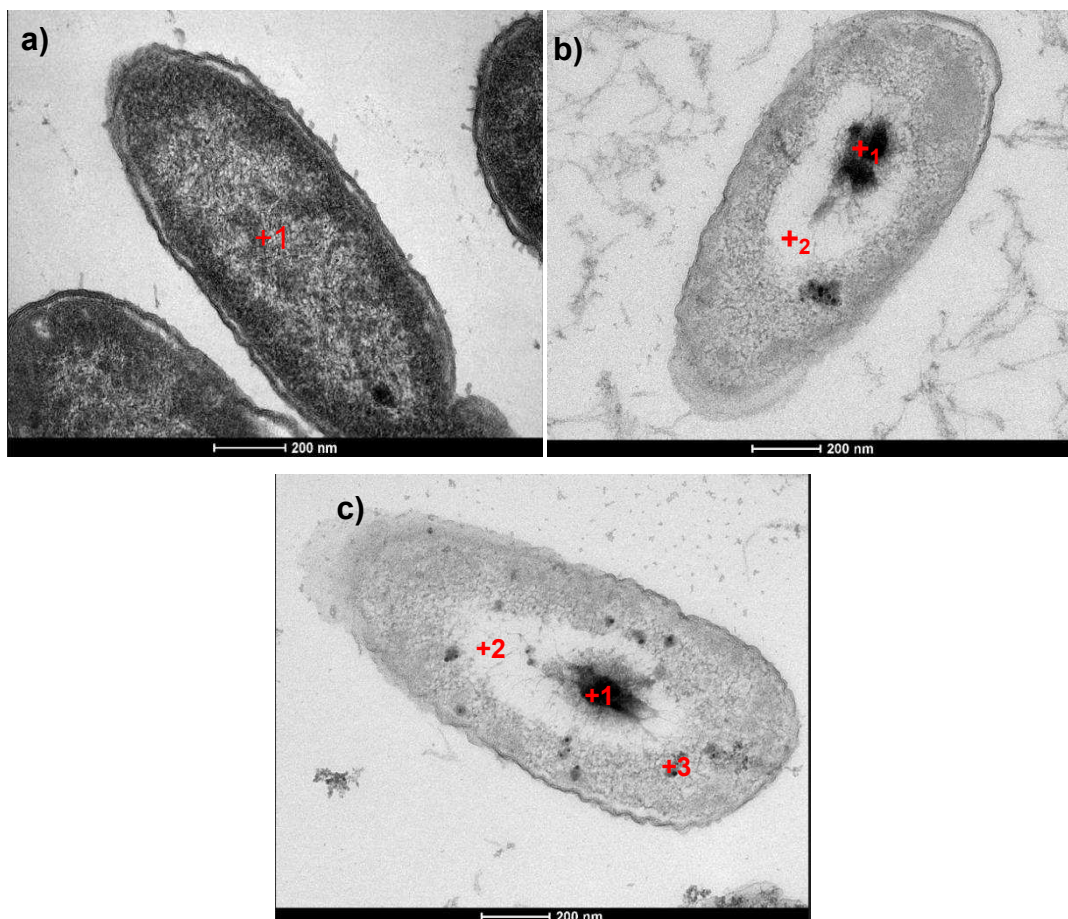


Figura 5 - Células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* observadas por microscopia eletrônica de transmissão: (a) controle, (b) células tratadas com $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata e c) células tratadas com $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nitrato de prata.

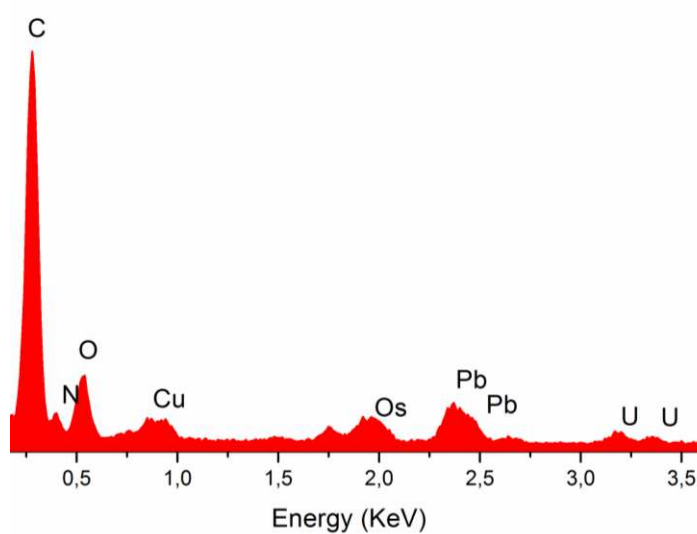


Figura 6 - Espectro de EDS da Figura 5a, células de *Pseudomonas aeruginosa* em caldo *Müller-Hinton* (controle).

A Figura 7 representa o espectro de EDS da região de condensação, ponto 1 da Figura 5b. Esta análise revelou a presença de prata, enxofre, fósforo e potássio no aglomerado no centro da bactéria, além de alguns elementos detectados no controle. Esse resultado mostra uma forte interação da prata com elementos que contêm enxofre e fósforo, como proteínas e DNA, por exemplo.

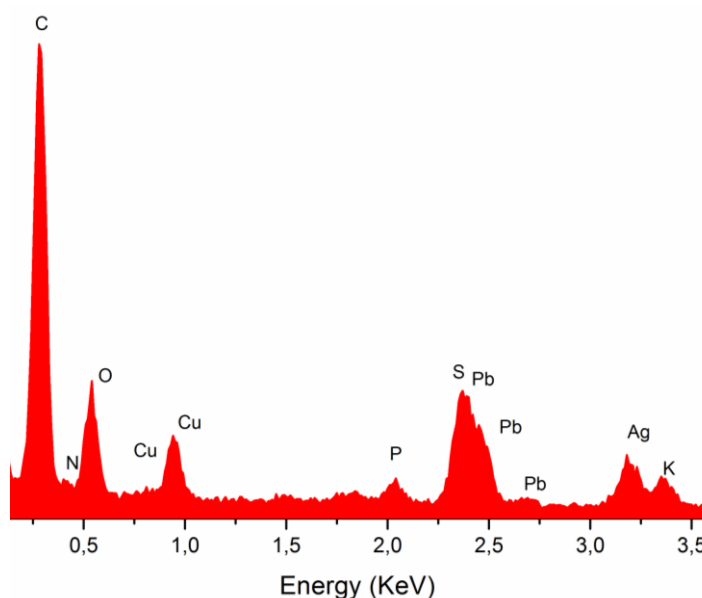


Figura 7 - Espectro EDS da região de condensação, ponto 1 da Figura 5b, *Pseudomonas aeruginosa* tratada com nanopartículas de prata.

No espectro de EDS da região clara (Figura 8), realizado no ponto 2 da Figura 5b, detectou-se apenas carbono e oxigênio.

De acordo com Yamanaka et al. (2005) íons Ag^+ foram detectados no interior de *E. coli* após 30 min de contato. Eles verificaram que a prata era, em alguns casos, detectada associada com enxofre no interior da bactéria.

Os danos causados em *P. aeruginosa* pelo AgNO_3 foram semelhantes aos danos causados pelas Ag-NPC. Na célula tratada com AgNO_3 (Figura 5c) também formou a região de condensação, ponto 1. Esta região apresentou constituição semelhante à região de condensação formada nas células tratadas com Ag-NPC, apresentando prata, enxofre, fósforo, potássio, carbono e oxigênio (Figura 9).

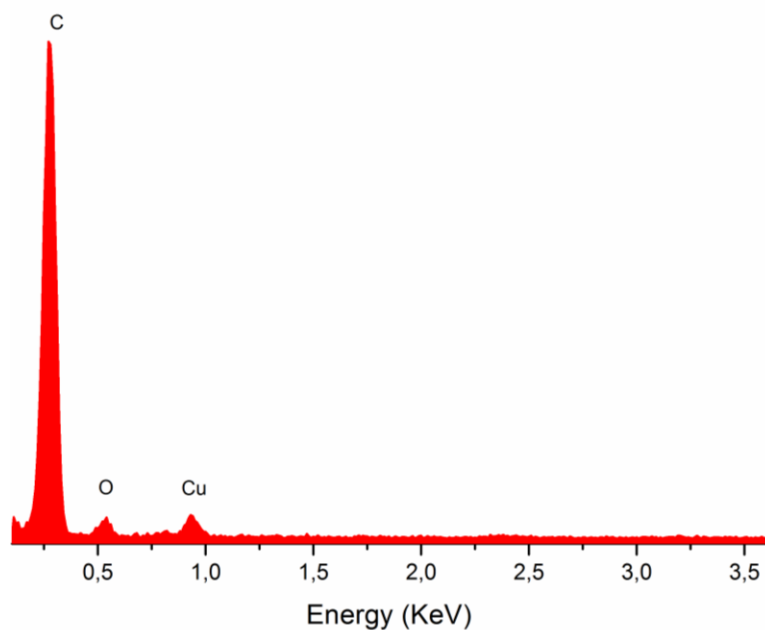


Figura 8 - Espectro EDS da região clara, ponto 2 da Figura 5b, *Pseudomonas aeruginosa* tratada com nanopartículas de prata.

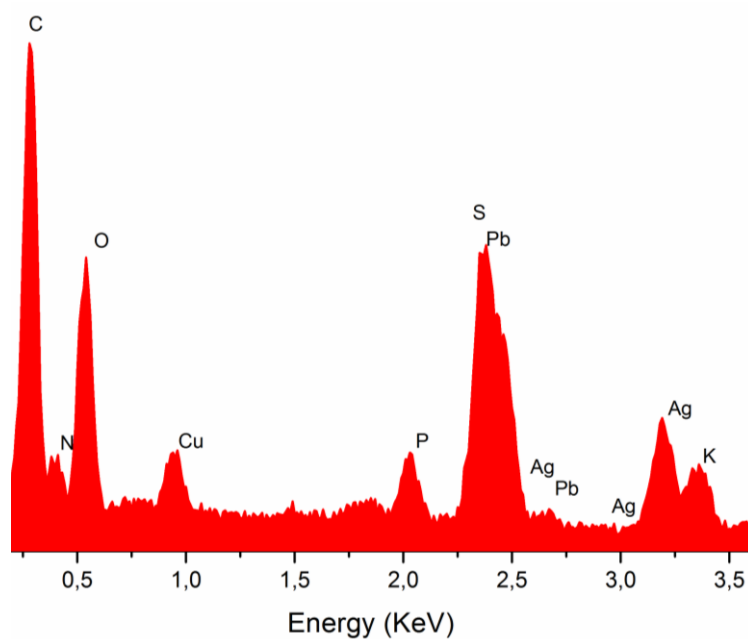


Figura 9 - Espectro EDS do ponto 1 da Figura 5c, *Pseudomonas aeruginosa* tratada com nitrato de prata.

No espectro de EDS da região clara (Figura 10), realizado no ponto 2 da Figura 5c, também detectou-se apenas carbono e oxigênio.

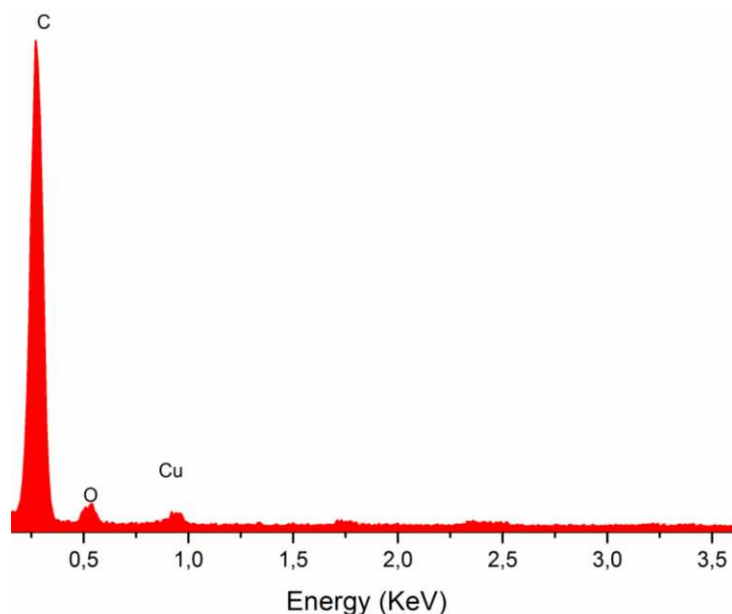


Figura 10 - Espectro EDS do ponto 2 da Figura 5c, *Pseudomonas aeruginosa* tratada com nitrato de prata.

O espectro de EDS realizado sobre o “grânulo eletrodenso”, ponto 3 da Figura 5c, está representado na Figura 11. Pode-se observar que esse ponto negro também é constituído principalmente por prata, enxofre e fósforo.

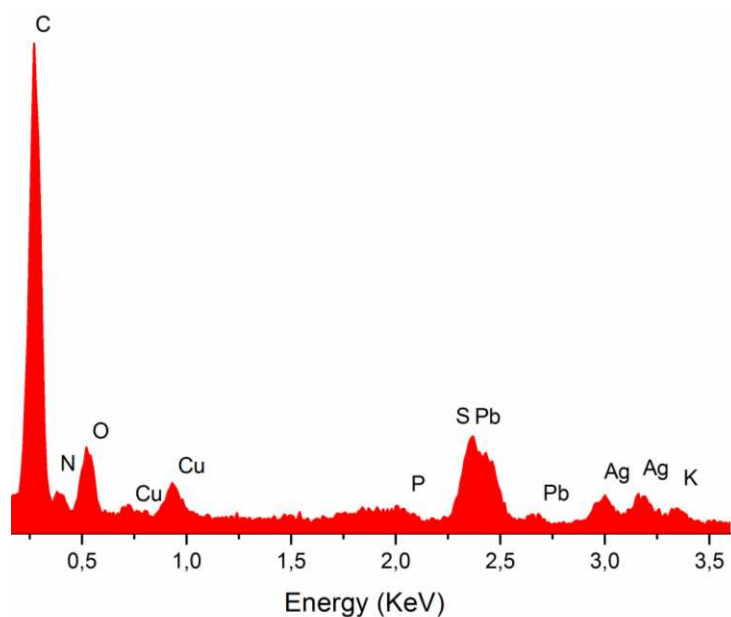


Figura 11 - Espectro EDS do ponto 3 da Figura 5c. *Pseudomonas aeruginosa* tratada com nitrato de prata.

O enxofre e o fósforo não foram detectados na célula controle, provavelmente, devido à distribuição homogênea desses elementos na célula não tratada. Sendo assim, a concentração desses elementos pode ter ficado abaixo do limite de detecção.

A Figura 12a representa o controle de *S. aureus*. As Figuras 12b e 12c, representam as células de *S. aureus* tratadas com Ag-NPC e AgNO₃, respectivamente.

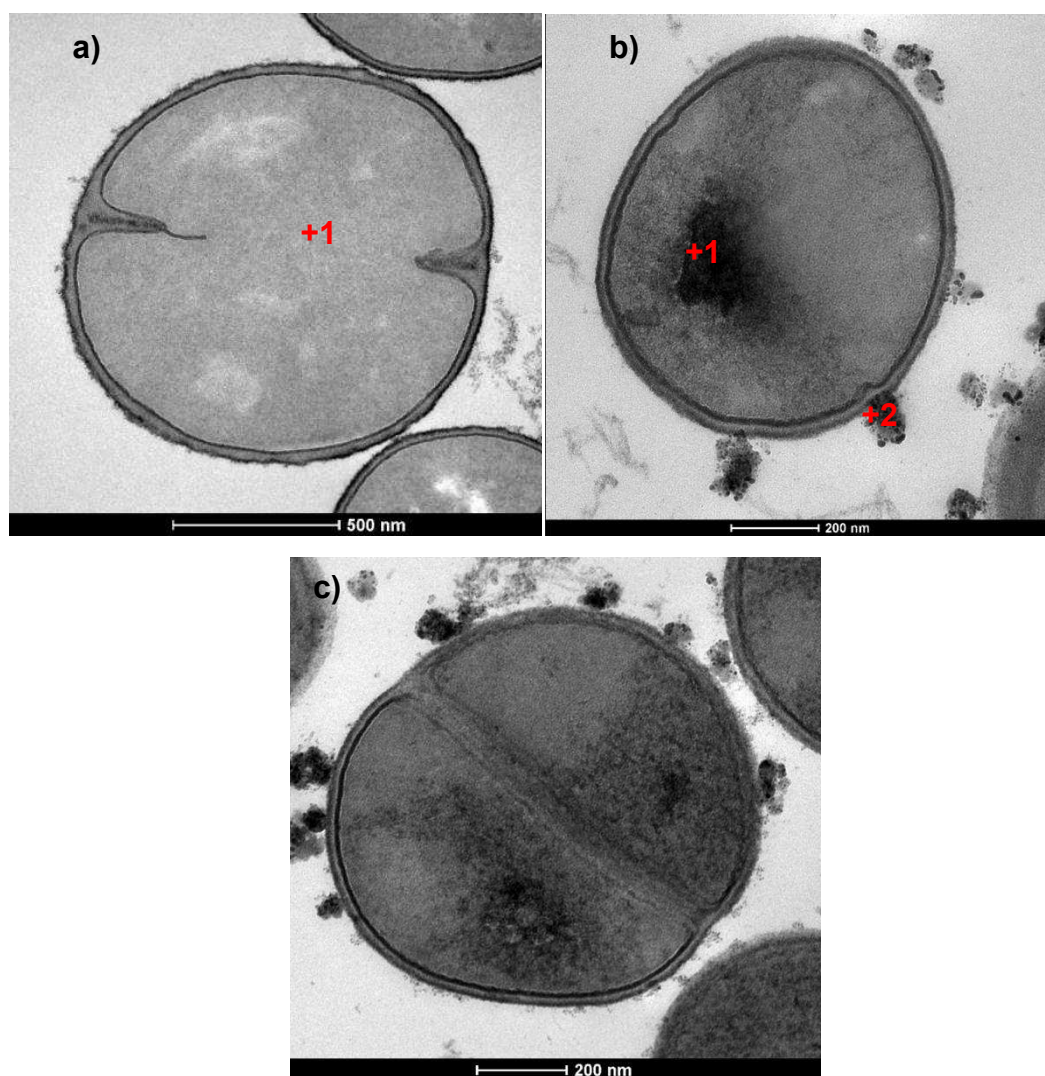


Figura 12 - Células planctônicas de *Staphylococcus aureus* observadas por microscopia eletrônica de transmissão: (a) controle; (b) células tratadas com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata; c) células tratadas com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nitrato de prata.

Os danos causados em *S. aureus* pelas Ag-NPC e pelo AgNO₃ foram semelhantes aos danos observados em *P. aeruginosa*, entretanto, de forma mais branda. A condensação do material citoplasmático foi menos intensa em relação à *P. aeruginosa*. Esses resultados foram semelhantes aos observados por Feng et al. (2000) utilizando AgNO₃. De acordo com esses autores, os danos provocados pelo AgNO₃ em *S. aureus*, uma bactéria gram-positiva, foi mais branda em relação aos danos observados em *E. coli*, uma bactéria gram-negativa.

A Figura 13 representa o espectro de EDS da célula de *S. aureus* sem tratamento (controle). No controle, o material citoplasmático está distribuído de forma homogênea, ou seja, não há formação da região de condensação. Assim como em *P. aeruginosa*, a ausência de enxofre e fósforo no espectro de EDS foi causada, provavelmente, pela distribuição homogênea desses elementos, ficando abaixo do limite de detecção.

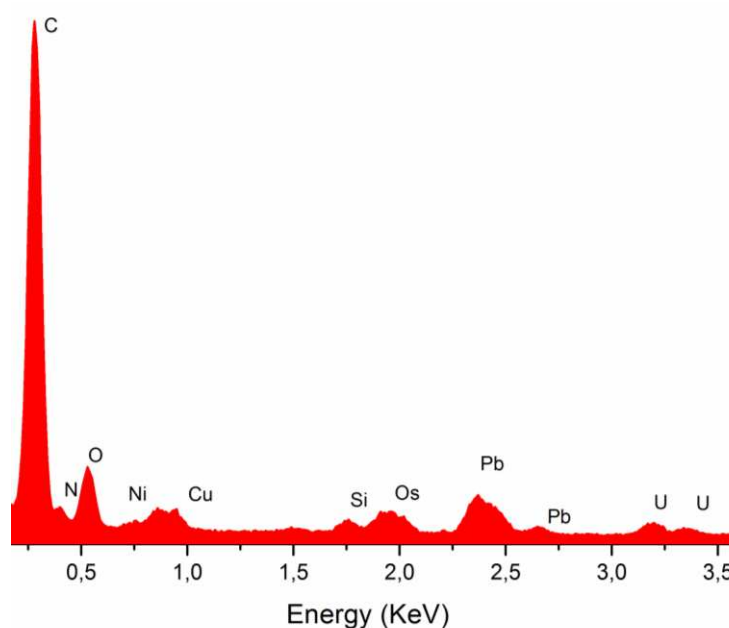


Figura 13 - Espectro EDS do ponto 1 da Figura 12a, *Staphylococcus aureus* em caldo *Müller-Hinton* (controle).

A prata também foi detectada na região de condensação, ponto 1 da Figura 12b, além de enxofre, fósforo, oxigênio, carbono e nitrogênio (Figura 14).

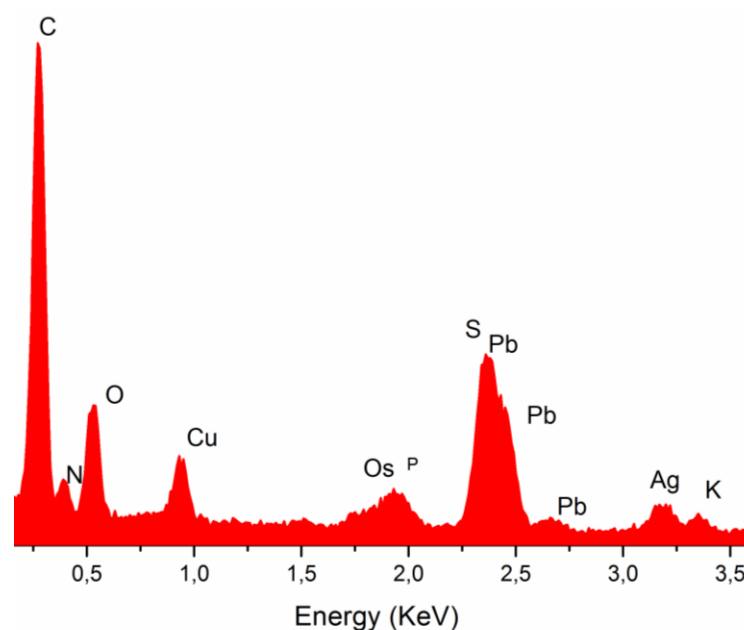


Figura 14 - Espectro EDS do ponto 1 da Figura 12b, célula de *Staphylococcus aureus* tratada com nanopartículas de prata.

O espectro de EDS realizado no ponto 2 da Figura 12b está representado na Figura 15.

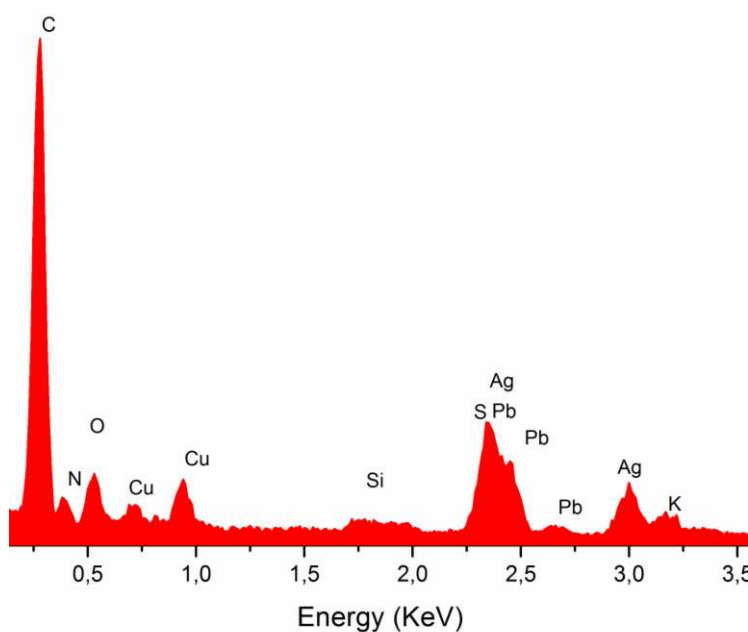


Figura 15 - Espectro EDS do ponto 2 da Figura 12b, célula de *Staphylococcus aureus* tratada com nanopartículas de prata.

Os resultados obtidos por MET/EDS confirmam os relatos da literatura de que um dos principais mecanismos de ação da prata é por interação com componentes contendo enxofre e fósforo, como proteínas e DNA, por exemplo.

4.2.2. Efeito de agentes antioxidantes sobre a atividade bactericida das nanopartículas de prata e do nitrato de prata

Os resultados sugerem que ERO podem estar envolvidas na atividade antimicrobiana das Ag-NPs e do AgNO₃. Pode-se observar na Figura 16, que 10 mM de ácido ascórbico, tiosulfato de sódio ou L-cisteína inibiram o efeito bactericida das Ag-NPs e do AgNO₃, protegendo *P. aeruginosa*. Nos poços suplementados com 25 µg·mL⁻¹ de Ag-NPC ou AgNO₃ houve uma completa inibição do crescimento microbiano, entretanto, nos poços suplementados com 25 µg·mL⁻¹ de Ag-NPC ou AgNO₃ adicionados de 10 mM de ácido ascórbico, tiosulfato de sódio ou L-cisteína, houve restauração do crescimento microbiano. Como pode ser visto, o crescimento microbiano não foi afetado pelos antioxidantes utilizados sozinhos.

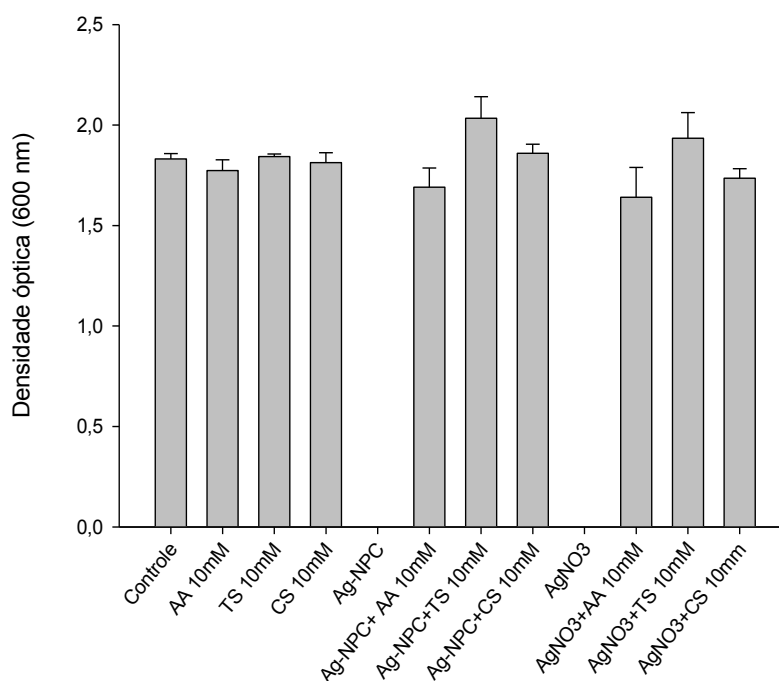


Figura 16 - Efeito inibidor do ácido ascórbico (AA), tiosulfato de sódio (TS) e L-cisteína (CS) na atividade bactericida de 25 µg·mL⁻¹ de nanopartículas de prata (Ag-NPC) ou nitrato de prata (AgNO₃) sobre *P. aeruginosa*.

O efeito antimicrobiano da prata pode estar relacionado com a formação de radicais livres (KIM et al., 2007). Esses radicais, gerados de forma descontrolada, podem oxidar componentes celulares como tióis, proteínas e principalmente, ácidos graxos poliinsaturados (LIMA; ABDALLA, 2001).

Kora et al. (2011) utilizaram antioxidantes como n-acetil-cisteína e ácido ascórbico para investigar o envolvimento de ERO na atividade antimicrobiana de Ag-NPs. Os autores observaram que os antioxidantes protegeram as bactérias contra a atividade antimicrobiana das Ag-NPs. Nas placas controle, houve crescimento microbiano, enquanto nas placas suplementadas com $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Ag-NPs, o crescimento microbiano foi inibido. Já nas placas adicionadas de $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Ag-NPs juntamente com n-acetil-cisteína ou ácido ascórbico na concentração de 10 mM, houve restauração do crescimento microbiano. De acordo com os autores, o ácido ascórbico foi capaz de proteger as células completamente do efeito tóxico gerado pelas Ag-NPs, pois houve 100% de sobrevivência nas placas adicionadas de ácido ascórbico e $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Ag-NPs. No entanto, nas placas adicionadas de n-acetil-cisteína houve crescimento de apenas 73% das bactérias. Esses autores especularam que ERO podem ser geradas a partir da superfície das Ag-NPs; podendo interagir com a parede e a membrana celular, danificar a membrana celular, aumentar a sua permeabilidade e liberar constituintes intracelulares devido ao rompimento celular.

A possibilidade do envolvimento de radicais livres na atividade antimicrobiana das Ag-NPs foi verificada utilizando espectroscopia de ressonância de spin eletrônico (ESR) por Kim et al. (2007). A formação de picos característicos indicou a geração de radicais livres pelas Ag-NPs. Para determinar a relação entre os radicais livres formados e a atividade antimicrobiana das Ag-NPs, os autores usaram o antioxidante n-acetil-cisteína para testar sua influência na atividade antimicrobiana das Ag-NPs. Os autores observaram que o n-acetil-cisteína inibiu o efeito antimicrobiano das Ag-NPs. Com base nos resultados obtidos por ESR e pelo uso do antioxidante, os autores também sugeriram a formação de radicais livres pelas Ag-NPs e seu envolvimento na atividade antimicrobiana das Ag-NPs.

Em estudo realizado por Kim et al. (2011), foi identificada a formação de ERO a partir das Ag-NPs utilizando di-acetato 2',7'-diclorofluoresceína

(DCFH-DA). Os autores detectaram um aumento significativo de ERO nas culturas de *S. aureus* e *E. coli* tratadas com Ag-NPs, sendo que o mesmo não foi verificado no controle. Além disso, o efeito bactericida das Ag-NPs foi inibido por 10 mM de ácido ascórbico ou n-acetil-cisteína, sugerindo que as ERO geradas a partir da superfície das Ag-NPs são responsáveis pela inibição do crescimento microbiano.

De acordo com Damm et al. (2007), a prata atua de forma complexa sobre os micro-organismos possuindo diversos mecanismos de ação. Neste caso, a atividade antimicrobiana da prata não poderia ser totalmente inibida pelos agentes antioxidantes, como aconteceu, pois a prata poderia ter exercido seu efeito antimicrobiano por outros mecanismos. As hipóteses propostas são: 1) os diversos mecanismos de ação propostos são desencadeados pelas ERO geradas pela prata, e uma vez que essas ERO são estabilizadas por agentes antioxidantes a prata perde seu efeito antimicrobiano; 2) esses antioxidantes inibiram a atividade antimicrobiana da prata por complexação, e não por inibir ERO.

4.2.3. Peroxidação de lipídeos

Lipídeos presentes na membrana celular podem ser atacados por ERO, levando a peroxidação de lipídeos e esse processo é normalmente associado ao estresse oxidativo (LYON; ALVAREZ, 2008).

Pode-se observar na Figura 17, que a concentração de malonaldeído, um produto da peroxidação de lipídeos, nas células de *P. aeruginosa* e *S. aureus* tratadas com Ag-NPC e com AgNO₃ não diferiu ($p > 0,05$) das células tratadas com água, entretanto, diferiu das células tratadas com AAPH, um gerador de ERO. Isso indica que a peroxidação de lipídeos não está envolvida na atividade antimicrobiana das Ag-NPC e do AgNO₃.

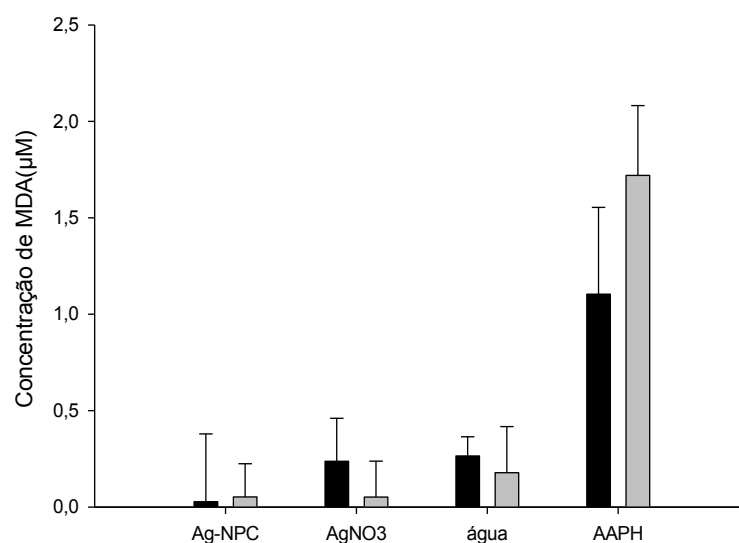


Figura17 - Concentração de malonaldeído (MDA) (μM), após exposição de 10^8 UFC de *Pseudomonas aeruginosa* (barra preta) e *Staphylococcus aureus* (barra cinza) a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata (Ag-NPC), $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nitrato de prata (AgNO_3), água ou 50 mM de AAPH, por 1 h.

Pesquisadores têm reportado que a peroxidação de lipídeos está envolvida na atividade antimicrobiana de algumas substâncias. Montanari et al. (2012) determinaram um aumento na concentração de malonaldeído em células de *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*, tratadas com óleo essencial, sinalizando um processo de peroxidação de lipídeos. De acordo com Maness et al. (1999) dióxido de titânio (TiO_2) irradiado com luz UV, provocou peroxidação de lipídeos em células de *E. coli*.

Não se encontrou na literatura relatos sobre o efeito das Ag-NPs e do AgNO_3 na peroxidação lipídica em membranas bacterianas. No entanto, há vários relatos de que a peroxidação de lipídeos está envolvida na toxicidade das Ag-NPs sobre outros tipos de células como células humanas (SONG et al., 2012) e de peixes (WU; ZHOU, 2013).

4.2.4. Liberação de íons Ag^+ pelas nanopartículas de prata

O número de células sobreviventes ($\log_{10}$ UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$) no interior dos tubos de diálise após 6 h e 24 h de imersão em $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Ag-NPC ou 50

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AgNO_3 foi igual ($p > 0,05$) (Figura 18), mas diferiu do controle (água). Houve uma redução de, aproximadamente, 2,5 ciclos log no número de células dentro dos tubos de diálise após 6 h de imersão. As Ag-NPC não foram detectadas dentro do tubo de diálise por UV-Vis nem por DLS, garantindo que as nanopartículas não atravessaram a membrana de diálise. Esse resultado indica que as Ag-NPC liberaram íons Ag^+ que atravessaram a membrana e exerceram sua atividade antimicrobiana. Entretanto, o número de células dentro do tubo de diálise aumentou após 24 h de imersão, atingindo uma contagem de, aproximadamente, $6,1 \log_{10} \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Provavelmente, os íons Ag^+ inativaram as células que estavam mais próximas da membrana, ocorrendo uma redução de 2,5 ciclos log nas primeiras 6 h. As células que estavam no centro do tubo de diálise se multiplicaram aumentando a contagem após 24 h.

Nos tubos de diálise imersos em água (controle), o número de células aumentou em torno 0,8 ciclos log após 6 h e 2,5 ciclos log após 24 h de imersão atingindo uma contagem de aproximadamente, $8,5 \log_{10} \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$.

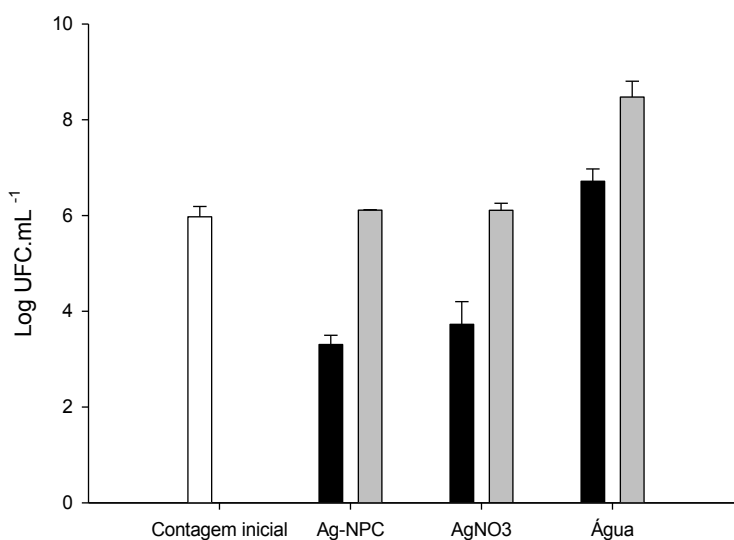


Figura 18 - Número de sobreviventes ($\log_{10} \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) de *P. aeruginosa* dentro do tubo de diálise após 6 h (barra preta) e após 24 h (barra cinza) de tratamento com $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata (Ag-NPC) ou nitrato de prata (AgNO_3) ou água (controle). A barra branca representa a contagem inicial de células.

4.3. Cinética de inativação de células planctônicas de *P. aeruginosa* tratadas com nanopartículas de prata ou com nitrato de prata sob diferentes condições

4.3.1. Em água deionizada a 25 °C

As curvas de inativação apresentadas na Figura 19 foram construídas pelo ajuste dos dados de sobreviventes ao modelo da Equação (6), bifásico com presença de ombro (GEERAERD et al., 2005).

As curvas de inativação são não lineares, observando-se duas frações de sobreviventes, uma mais sensível e outra mais resistente, com suas próprias taxas de inativação. A população sensível apresentou um declínio rápido enquanto que para a subpopulação mais resistente o declínio foi mais lento, promovendo a formação da cauda.

Como pode ser observado na Figura 19, houve a formação de um ombro (fase lag) antes da inativação. De acordo com Mossel et al. (1995), a presença de ombro em uma curva de inativação pode ser explicada pela presença de grumos ou aglomerados de células, pois cada aglomerado será responsável pela formação de uma única colônia no meio de cultura sólido. Sendo assim, o comprimento do ombro coincide com o tempo antes de todos, menos um organismo de tal grumo esteja morto. Além disso, o ombro representa um período o qual os micro-organismos são capazes de re-sintetizar um componente vital e a morte só ocorre apenas quando a taxa de destruição supera a taxa de síntese (MOSSEL et al., 1995)

A formação do ombro foi mais evidente nas curvas realizadas com Ag-NPC, indicando que elas precisaram de um tempo para começar a agir.

Como pode ser observado na Tabela 7, 99,67%, 99,80%, 99,85% e 99,98% da população inicial de *P. aeruginosa* foram sensíveis para Ag-NPC 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, AgNO₃ 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Ag-NPC 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e AgNO₃ 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Pode-se observar que a fração de bactérias sensíveis ao AgNO₃ é maior que a fração de bactérias sensíveis às Ag-NPC e que a fração de bactérias sensíveis aumenta com o aumento da concentração de Ag-NPC ou AgNO₃.

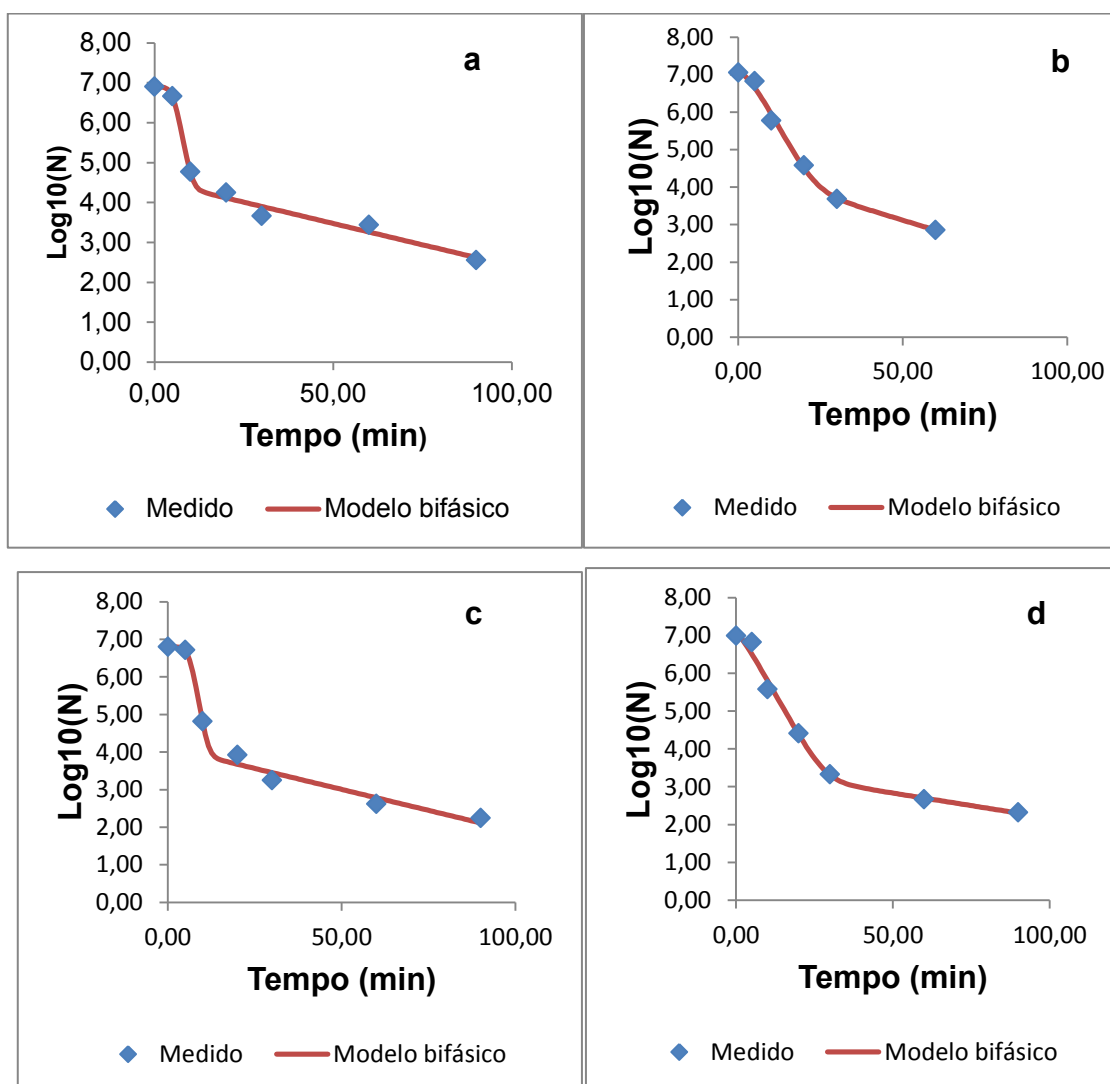


Figura 19 - Curvas de sobrevivência de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com: a) 12,5 µg·mL⁻¹ de nanopartículas de prata; b) 12,5 µg·mL⁻¹ de AgNO₃; c) 50 µg·mL⁻¹ de nanopartículas de prata; d) 50 µg·mL⁻¹ de AgNO₃; em água deionizada a 25 °C.

O tempo necessário para reduzir 4 ciclos log da população inicial de *P. aeruginosa* diminuiu com o aumento da concentração (Tabela 7), mas de forma não proporcional. A diminuição do tempo de inativação com o aumento da concentração pode ser explicado pelo aumento da fração de bactérias sensíveis. O AgNO₃ foi mais eficiente em relação às Ag-NPs, pois necessitou

de menor tempo para inativar 4 ciclos log da população de *P. aeruginosa*, considerando a mesma concentração de prata e mesma temperatura (25 °C).

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos de inativação de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com 12,5 µg·mL⁻¹ ou 50 µg·mL⁻¹ de nanopartículas de prata ou nitrato de prata, em água deionizada a 25 °C

Parâmetros de sobrevivência/tratamentos	<i>f</i> (fração sensível)	k_{max1} (min ⁻¹) Velocidade específica da fração sensível	k_{max2} (min ⁻¹) Velocidade específica da fração resistente	Tempo (min) para redução de 4 ciclos log
Ag-NPC 12,5 µg·mL ⁻¹	0,9967	1,12 ± 0,34	0,05 ± 0,01	77,4
AgNO ₃ 12,5 µg·mL ⁻¹	0,9980	0,35 ± 0,11	0,06 ± 0,04	51,0
Ag-NPC 50 µg·mL ⁻¹	0,9985	1,21 ± 0,78	0,05 ± 0,01	59,4
AgNO ₃ 50 µg·mL ⁻¹	0,9998	0,33 ± 0,07	0,03 ± 0,02	34,2

Os parâmetros cinéticos de inativação foram obtidos a partir dos valores médios de três repetições.

Os principais índices que avaliaram o desempenho e validaram o modelo de inativação de *P. aeruginosa* tratadas com Ag-NPC ou AgNO₃, diluídos em água deionizada a 25 °C estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores dos índices estatísticos, erro médio quadrático (EMQ) e coeficiente de determinação (R^2), para o modelo aplicado às curvas de inativação de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa*, tratadas com nanopartículas de prata (Ag-NPC) e nitrato de prata (AgNO₃), em água deionizada a 25 °C.

Tratamento	EMQ	R^2
Ag-NPC 12,5 µg·mL ⁻¹	0,0563	0,9930
AgNO ₃ 12,5 µg·mL ⁻¹	0,0706	0,9951
Ag-NPC 50 µg·mL ⁻¹	0,0742	0,9928
AgNO ₃ 50 µg·mL ⁻¹	0,0862	0,9923

O modelo conseguiu explicar bem os dados experimentais do processo de inativação com coeficiente de determinação (R^2) > 0,99 (Tabela 8).

4.3.2. Em água deionizada a 37 °C

As curvas de inativação apresentadas na Figura 20 foram construídas pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo bifásico proposto por Cerf (1997). Este modelo também indica heterogeneidade na resistência da população de *P. aeruginosa*. Entretanto, não houve formação do ombro antes da inativação. Isso mostra que o aumento da temperatura acelerou o processo inicial de inativação. A Equação 5 representa o modelo ajustado.

A 37 °C, o tempo necessário para reduzir 4 ciclos log da população inicial de *P. aeruginosa* também diminuiu com o aumento da concentração. As células foram inativadas mais rapidamente a 37 °C do que a 25 °C, mantendo-se os demais fatores constantes.

Um dos fatores que pode ter contribuído para a melhor eficiência das Ag-NPC na temperatura de 37 °C é a maior liberação de íons Ag^+ a partir das Ag-NPC. Experimentos cinéticos para determinar a liberação de íons Ag^+ a partir das Ag-NPs mostraram que a temperatura é um fator importante na dissolução dos íons. A liberação de íons Ag^+ pelas Ag-NPs aumentou com o aumento da temperatura (4 °C, 20 °C e 37 °C) em trabalho realizado por Liu e Hurt (2010). Resultado semelhante foi observado Kittler et al. (2010) nas temperaturas de (5 °C, 25 °C e 37 °C). Entretanto, a maior liberação de íons pelas Ag-NPC não explica totalmente a maior eficiência antimicrobiana das Ag-NPC, pois o AgNO_3 também teve sua atividade antimicrobiana aumentada com a elevação da temperatura.

Pode-se observar na Tabela 9 que a maior parte das células (> 99%) são sensível às Ag-NPC e ao AgNO_3 .

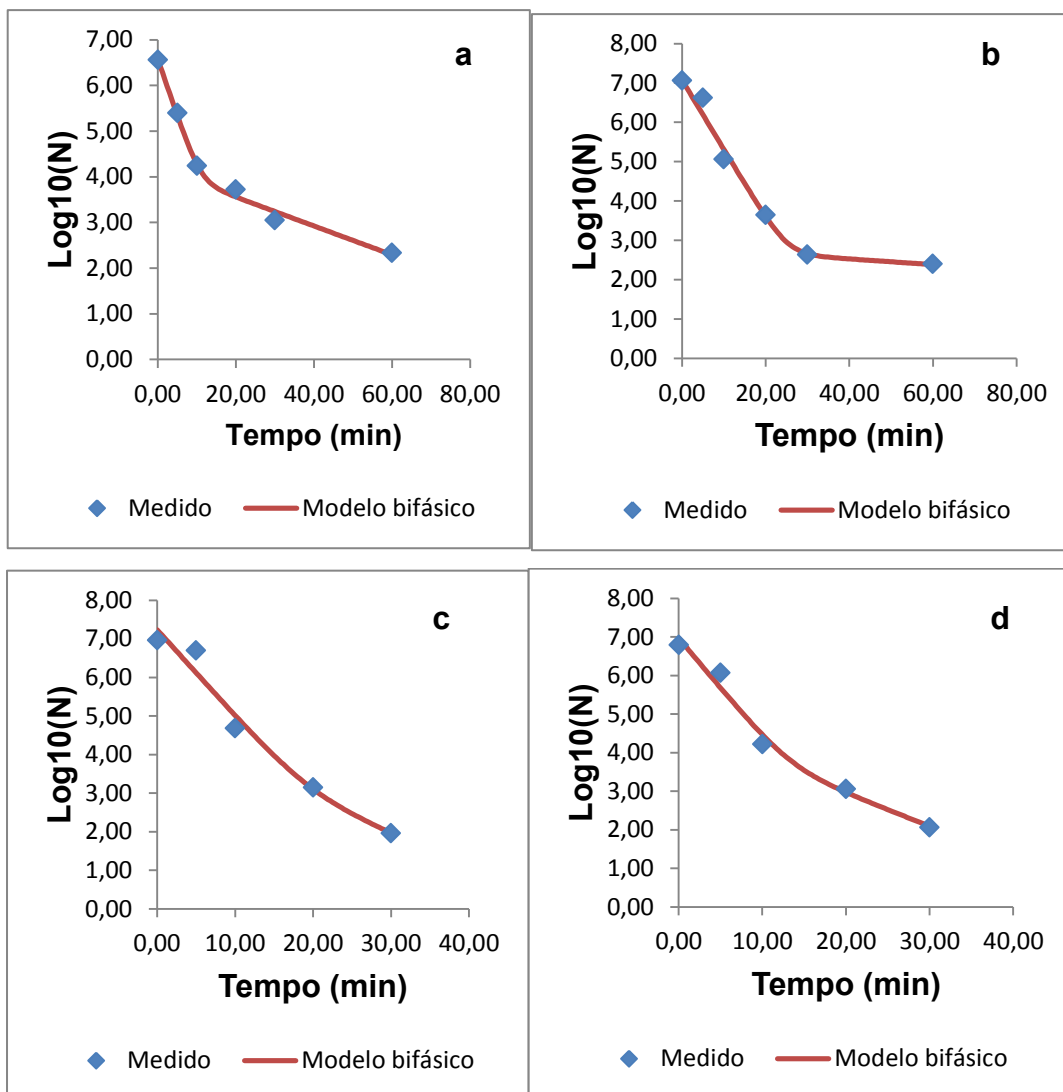


Figura 20 - Curvas de sobrevivência de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa*, tratadas com: a) 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata; b) 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AgNO_3 ; c) 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata; d) 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AgNO_3 ; em água deionizada a 37 °C.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos de inativação de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa*, tratadas com 12,5 µg·mL⁻¹ ou 50 µg·mL⁻¹ de nanopartículas de prata (Ag-NPC) ou nitrato de prata (AgNO₃), em água deionizada a 37 °C

Parâmetros de sobrevivência/tratamentos	<i>f</i> (fração sensível)	<i>k</i> _{max1} (min ⁻¹) Velocidade específica da fração sensível	<i>k</i> _{max2} (min ⁻¹) Velocidade específica da fração resistente	Tempo (min) para redução de 4 ciclos log
Ag-NPC 12,5 µg·mL ⁻¹	0,9958	0,64 ± 0,28	0,07 ± 0,02	51
AgNO ₃ 12,5 µg·mL ⁻¹	0,9999	0,44 ± 0,13	0,02 ± 0,05	24
Ag-NPC 50 µg·mL ⁻¹	0,9974	0,52 ± 0,28	0,21 ± 0,52	19,2
AgNO ₃ 50 µg·mL ⁻¹	0,9953	0,60 ± 0,21	0,20 ± 0,18	20,1

Os principais índices que avaliaram o desempenho e validaram o modelo de inativação de *P. aeruginosa*, tratada com 12,5 µg·mL⁻¹ ou 50 µg·mL⁻¹ de Ag-NPC ou AgNO₃, diluídos em água deionizada a 37 °C, estão descritos na Tabela 10. Como pode ser visto, os dados experimentais se ajustaram bem ao modelo predito com R² > 0,97.

Tabela 10 - Valores dos índices estatísticos, erro médio quadrático (EMQ) e coeficiente de determinação (R²), para o modelo aplicado às curvas de inativação de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa*, tratadas com nanopartículas de prata (Ag-NPC) ou nitrato de prata (AgNO₃), em água deionizada a 37 °C

Tratamentos	EMQ	R ²
Ag-NPC 12,5 µg·mL ⁻¹	0,0340	0,9943
AgNO ₃ 12,5 µg·mL ⁻¹	0,1291	0,9871
Ag-NPC 50 µg·mL ⁻¹	0,5224	0,9726
AgNO ₃ 50 µg·mL ⁻¹	0,2524	0,9841

4.2.3. Em caldo *Müller-Hinton* a 37 °C

Os ensaios também foram realizados com as Ag-NPs e o AgNO₃ diluídos em caldo *Müller-Hinton*. As curvas de inativação de células

planctônicas de *P. aeruginosa* tratadas com 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ de Ag-NPC ou 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ de AgNO_3 em caldo *Müller-Hinton*, estão representadas na Figura 21a e 21b, respectivamente.

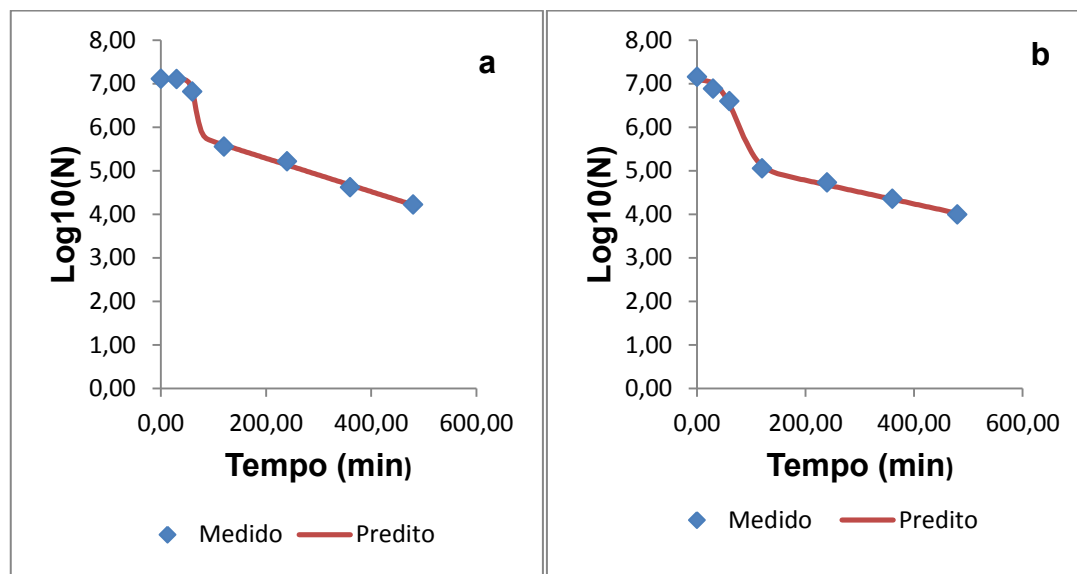


Figura 21 - Curvas de sobrevivência de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com: a) 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata; b) 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AgNO_3 , em caldo *Müller-Hinton* a 37 °C.

Essas curvas foram construídas pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo bifásico com ombro, Equação 6 (GEERAERD et al., 2005). A atividade antimicrobiana de 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Ag-NPC e de AgNO_3 foi reduzida no caldo *Müller-Hinton*, em comparação com suas atividades em água. O tempo de inativação aumentou consideravelmente mantendo-se a temperatura de incubação a 37 °C. O tempo para inativar 4 ciclos log passou de 51 min e 24 min, respectivamente, para maior que 480 min de tratamento.

A fração de bactérias sensíveis e as velocidades específicas de inativação, k_{max1} e K_{max2} , diminuíram em relação ao tratamento equivalente em água (Tabela 11). Esse aumento da fração de bactérias resistentes pode ter sido causado pela complexação de uma porção da prata com os constituintes do caldo, provocando a diminuição da biodisponibilidade da prata no meio. Além disso, o caldo *Müller-Hinton* é rico em proteínas que podem proteger as bactérias, aumentando a sua resistência. De acordo com Mossel et al. (1995),

proteínas podem proteger as bactérias durante tratamento térmico por reduzir a perda de solutos e estabilizar a membrana citoplasmática.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos de inativação de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata (Ag-NPC) e nitrato de prata (AgNO_3), em caldo *Müller-Hinton* a 37°C

Parâmetros de sobrevivência/tratamentos	f (fração sensível)	K_{max1} (h^{-1}) Velocidade específica da fração sensível	K_{max2} (h^{-1}) Velocidade específica da fração resistente	Tempo (min) para redução de 4 ciclos log
Ag-NPC $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0,9481	0,23	0,01	>480*
AgNO_3 $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0,9873	0,08	0,01	>480*

*O tempo para redução de 4 ciclos log foi maior que 480 min (maior tempo testado).

Para as células tratadas com $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Ag-NPC em caldo *Müller-Hinton* (Figura 22a), os dados foram ajustados ao modelo log linear com ombro, representado pela Equação 15 (GEERAERD et al., 2000). Neste caso, todas as células apresentaram a mesma resistência. O tempo para inativar 4 ciclos log foi de 105,6 min, ou seja, aumentou aproximadamente 5,5 vezes em relação ao tratamento equivalente em água, que foi de 19,2 min (Tabela 11).

Para as células tratadas com $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AgNO_3 em caldo *Müller-Hinton* (Figura 22b), os dados experimentais se ajustaram ao modelo log linear com ombro e cauda (GEERAERD et al., 2000), representado pela Equação 16. O tempo para inativar 4 ciclos log foi maior que 120 min (maior tempo testado), sendo que o tratamento equivalente em água foi de 20,1 min.

Como mostrado na Tabela 12, os dados experimentais se ajustaram bem aos modelos utilizados com $R^2 > 0,99$.

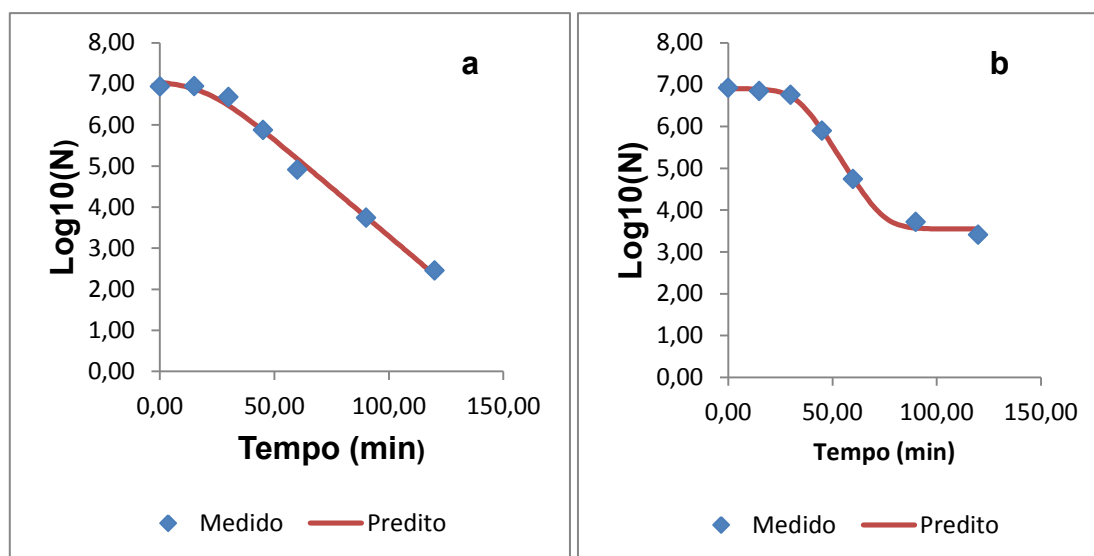


Figura 22 - Curvas de sobrevivência de células planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com: a) $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata; b) $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AgNO_3 ; em caldo *Müller-Hinton* a $37\ ^\circ\text{C}$.

Tabela 12 - Valores dos índices estatísticos, erro médio quadrático (EMQ) e coeficiente de determinação (R^2), para os modelos aplicados às curvas de inativação de *Pseudomonas aeruginosa* tratada com $12,5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de nanopartículas de prata ou nitrato de prata, em caldo *Müller-Hinton* a $37\ ^\circ\text{C}$

Tratamentos	EMQ	R^2
Ag-NPC $12,5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0,0027	0,9995
AgNO_3 $12,5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0,0168	0,9963
Ag-NPC $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0,0339	0,9926
AgNO_3 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0,0146	0,9968

De acordo com Lok et al. (2007), as Ag-NPs são propensas a agregarem em meios com elevada concentração de sal e perdem sua atividade antimicrobiana. De acordo com esses autores as Ag-NPs de 9,2 nm apresentaram atividade antimicrobiana em água e em soluções tamponadas como HEPES de sódio 50 mM. Entretanto, as partículas agregaram em meios de cultura comumente usados e tampões biológicos com elevada quantidade de sais (cloretos e fosfatos). Esses autores relataram que quando as Ag-NPs

foram adicionadas no meio de cultura M9 o pico de ressonância plasmônica de superfície, desapareceu e as Ag-NPs não apresentaram atividade antimicrobiana nesse meio. Entretanto, quando as Ag-NPs foram misturadas com albumina soro bovina (BSA) e adicionadas no meio, a agregação foi prevenida e a absorção plasmônica de superfície foi preservada. Além disso, as Ag-NPs estabilizadas com BSA exibiram atividade antimicrobiana similar à atividade em água ou tampão Hepes, sugerindo que uma boa dispersão é necessária para que as Ag-NPs exerçam sua atividade antimicrobiana.

Observou-se que as Ag-NPs precisaram de um tempo maior para exercer sua atividade antimicrobiana em caldo *Müller-Hinton* do que em água. A superfície plasmônica de superfície também não foi identificada em caldo *Müller-Hinton*, sendo que a adição dos estabilizantes PVP e CMC não preservou a ressonância plasmônica de superfície das Ag-NPs no meio de cultura. De acordo com Kumar et al. (2011), o mecanismo biocida de compostos que contêm prata resulta da liberação a longo prazo de íons Ag^+ pela oxidação da prata metálica (Ag^0) em contato com a água. Lee et al. (2012) realizaram experimentos para verificar a cinética de liberação de íons Ag^+ a partir das Ag-NPs em água deionizada e no meio de cultura Elendt's M4. Eles observaram que a taxa de conversão de Ag-NP em íons Ag^+ foi maior em água deionizada (36%) do que no meio Elendt's M4 (11%).

A dispersão das Ag-NPs em caldo *Müller-Hinton* pode ter provocado sua agregação, como foi demonstrado pelo desaparecimento da ressonância plasmônica de superfície e isso pode ter afetado a liberação de íons Ag^+ pelas Ag-NPs. Entretanto, a agregação não explica totalmente a redução da atividade antimicrobiana das Ag-NPs em caldo *Müller-Hinton* em relação a sua atividade em água deionizada. Pois, o AgNO_3 também foi menos eficiente neste meio. A menor atividade antimicrobiana no caldo *Müller-Hinton* pode ter sido causada pela complexação dos íons Ag^+ , liberados das Ag-NPs ou provenientes do AgNO_3 , com os componentes do meio de cultura como enxofre e fosfato. Neste caso, tem-se a diminuição da disponibilidade de prata para interagir com as bactérias. Além disso, os constituintes do meio de cultura como proteínas, podem proteger os micro-organismos.

5. CONCLUSÃO

As Ag-NPC e o AgNO₃ apresentaram efeito antimicrobiano sobre espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, demonstrando maior efeito antimicrobiano sobre as últimas. Observou-se aumento na adesão das bactérias gram-positivas tratadas com concentrações subinibitórias de Ag-NPC ou de AgNO₃, em comparação com o grupo controle. Esse aumento na adesão pode ter sido desencadeado como resposta geral ao estresse. A adesão das bactérias gram-negativas, *E. coli* e *S. Typhimurium*, não foi alterada. Em contrapartida, houve redução na adesão de *P. aeruginosa* em concentrações subinibitórias de Ag-NPC.

Foi mostrado por microscopia eletrônica de transmissão que um dos principais mecanismo de ação das Ag-NPC e do AgNO₃ é por complexação com enxofre e fósforo presentes em componentes vitais das células. Os resultados também sugerem o envolvimento de ERO na atividade antimicrobiana das Ag-NPC e do AgNO₃, embora não tenham causado peroxidação de lipídeos nas bactérias. Além disso, foi demonstrado que as Ag-NPC exercem seu efeito antimicrobiano por liberação de íons Ag⁺ no meio.

A cinética de inativação de *P. aeruginosa* mostrou que a eficiência das Ag-NPC e do AgNO₃ aumenta com a elevação da temperatura e da concentração de prata e diminui em meio de cultura em relação à água, associado à complexação da prata com os constituintes do meio de cultura.

6. REFERÊNCIAS

AHMED, N. A.; PETERSEN, F. C.; SCHEIE, A. A. Al-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, p. 4258-63, 2009.

ANTUNES, M.A. **Contaminação, crescimento e inativação de micro-organismos na cadeia de produção de alface (*Lactuca sativa* L.) variedade Vitória de Santo Antão**. 2009. 176 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

ARAGAO, G.M.F.; CORRADINI, M.G.; NORMAND, M.D.; PELEG, M. Evaluation of the weibull and log normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 243-257, 2007.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4.ed. Viçosa: UFV, 2008.

BALAZS, D.J.; TRIANDAFILLU, K.; WOOD, P.; CHEVOLOT, Y.; VAN DELBEN, C.; HARMS, H. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. **Biomaterials**, v. 25, p. 2139-2151, 2004.

BARRETO, J.M. **Fatores de virulência de *Bacillus cereus* isolados na cadeia produtiva de leite na microrregião de Viçosa, Minas Gerais**. 2012. 52 f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

BECERRA, M.C.; PÁEZ, P.L.; LARÓVERE, L.E.; ALBESA, I. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 285, p. 29-34, 2006.

BERNARDES, P.C. **Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e da temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

BERNARDES, P.C.; ARAÚJO, E.A.; PIRES, A.C.S.; FIALHO JÚNIOR, J.F.Q.; LELIS, C.A.; ANDRADE, N.J. Work of adhesion of dairy products on stainless steel surface. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1261-1268, 2012.

BORCHARDT, S.A.; ALLAIN, E.J.; MICHELS, J.J.; STEARNS, G.W.; KELLY, R.F.; MCCOY, W.F. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3174, 2001.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, v. 3, p. 3-8, 2000.

CERF, O. A review. Tailing of survival curves of bacterial spores. **Journal of Applied Microbiology**, v. 42, p. 1-19, 1977.

CHAVES, L.C.D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada. 8.ed. 2003. M2-A8, v. 23, n. 1.

DAMM, C.; MUNSTEDT, H.; ROSCH, A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 6067-6073, 2007.

DONG, P.V.; HA, C.H.; BINH, L.T.; KASBOHM, J. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. **International Nano Letters**, p. 2-9, 2012.

DONLAN, R.M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Healthcare Epidemiology**, v. 33, p. 1387-1392, 2001.

EGGER, S.; LEHMANN, R.P.; HEIGHT, M.J.; LOESSNER, M.J.; SCHUPPLER, M. Antimicrobial properties of a novel silica-silica nanocomposite material. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2973-2976, 2009.

EL BADAWY, A.M.; SILVA, R.G.; MORRIS, B.; SCHECKEL, K.G.; SUIDAN, M.T.; TOLAYMAT, T.M. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 283-287, 2011.

FAYAZ, A.M.; BALAJI, K.; GIRILAL, M.; YADAV, R.; KALAICHELVAN, P.T.; VENKETESAN, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 103-109, 2009.

FENG, Q.L.; WU, J.; CHEN, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.M.; KIM, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect on silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, p. 662-668, 2000.

GARCIA, M.V.D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

GEERAERD, A.H.; VALDRAMIDIS, V.P.; IMPE, J.F.V. GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 95-105, 2005.

GEERAERD, A.H.; HERREMANS, C.H.; VAN IMPE, J.F. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 185-209, 2000.

HOFFMAN, L.R.; D'ARGENIO, D.A.; MACCOSS, M.J.; ZHANG, Z.; JONES, R.A.; MILLER, S.I. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. **NATURE**, v. 436, 2005.

HOLDSWORTH, S.D. Optimising the safety and quality of thermally processed packaged foods. In: RICHARDSON, P. (Ed). **Improving the thermal processing of foods**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004. p.3-27.

HOOD, S.K.; ZOTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 145-153, 1997.

HOSKINS, J.S.; KARANFIL, T.; SERKIZ, S.M. Removal and sequestration of iodide using silver-impregnated activated carbon. **Environmental Science and Technology**, v.36, p. 784, 2002.

JAIN, J.; ARORA, S.; RAJWADE, J.M.; OMRAY,P.; KHANDELWAL, S.; PAKNIKAR, K.M. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, p. 1388-1401, 2009.

JING, A.; DE-SONG, W.; XIAO-YAN, Y. Synthesis of stable silver nanoparticles with antimicrobial activities in room-temperature ionic liquids. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 25, p. 421-425, 2009.

KAPLAN, J. B.; JABBOURI.S.; SADOVSKAYA, I. Extracellular DNAdependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. **Research in Microbiology**, v.162, p. 525-41, 2011.

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

KIM, Soo-Hwan; LEE, H.S.; RYU, D.S.; CHOI, S.J.; LEE, D.S. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 77-85, 2011.

KITTLER, S.; GREULICH, C.; DIENDORF,J.; KOLLER, M.; EPPLE, M. Toxicity of silver nanoparticle increases during storage because of slow dissolution under released of silver ions. **Chemistry of Materials**, v. 22, p. 4548-4554, 2010.

KORA, A.J.; ARUNACHALAM. J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1209-1216, 2011.

KUMAR, R.; HOWDLE, S.; MÜNSTEDT, H. Polyamide/silver antimicrobials: effect of filler types on the silver ion release. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterial**, v. 75, n. 2, p. 311-319, 2005.

KYRIACOU, S.V.; BROWNLOW, J.; XU, X.H.N. Using nanoparticle optics assay for direct observation of the function of antimicrobial agents in single live bacterial cells. **Biochemistry**, v. 43, p. 140-147, 2004.

LANGLEY, S.; BEVERIDGE, T.J. Effect of O-side-chain-lipopolysaccharide chemistry on metal binding. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 489-498, 1999.

LEE, Y.J.; KIM, J.; OH, J.; BAE, S.; LEE, S.H.I.S.; KIM, S.H. Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 155-159, 2012.

LEMON, K.P.; EARL, A.M.; VLAMAKIS, H.C.; AGUILAR, C.; KOLTER, R. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. In: ROMEO, T. (Ed). **Bacterial biofilms**. Berlin: Springer, 2008. cap. 1, p. 1-16.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, 2001.

LIU, J.; HURT, R.H. Ion release and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. **Environment Science and Technology**, v. 44, p. 2169-2175, 2010.

LIU, L.; YANG, J.; XIE, J.; LUO, Z.; JIANG, J.; YANG, Y.Y.; LIU, S. The potent antimicrobial properties of cell penetrating peptide-conjugated silver nanoparticles with excelente selectivity for Gram-positive bacteria over erythrocytes. **Nanoscale**, v. 5, p. 3834, 2013.

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

LOK, C-N.; HO, C-M.; CHEN, R.; HE, Q-Y.; YU, W-Y.; SUN, H.; TAM, P K-H.; CHIU, J-F.; C, C-M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, p. 527-534, 2007.

LYON, D.Y.; ALVAREZ, P.J.J. Fullerene water suspension (nC₆₀) Exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 42, p. 8127-8132, 2008.

MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 107-113, 2002.

MANESS, P.C.; SMOLINSKI, S.; BLAKE, D.M.; HUANG, Z.; WOLFRUM, E.J.; JACOBY, W.A. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4094-4098, 1999.

MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G.A.; NIÑO-MARTÍNEZ, N.; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDOZA, J.R.; FACUNDO, R. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticles Research**, v. 10, p. 1343-1348, 2008.

MATOS, K.H.O. **Inativação microbiana em ostras (*Cassostrea gigas*) empregando dióxido de carbono supercrítico**. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.

McDONALD, K.; SUN, D.W. Predictive food microbiology for the meat industry: A review. **International Journal of Food Microbiology** [online], v. 52, p. 1-27, 1999.

MONTANARI, R.M.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; SILVA, C.J.; ANDRADE, N.J.; ISMAIL, F.M.D.; BARBOSA, M.C.A. Exposure to anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. **Molecules**, v. 17, p. 9728-9740, 2012.

MONTEIRO, D.R.; GORUP, L.F.; TAKAMIYA, A.S.; FILHO, A.C.R.; CAMARGO, E.R.; BARBOSA, D.B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **International Journal of Antimicrobia Agents**, v. 34, p.103-110, 2009.

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

MOSSEL, D.A.A.; CORRY, J.E.L.; STRUIJK, C.B.; BAIRD, R.M. **Essentials of the microbiology of foods**. New York: John Wiley & Sons, 1995.

MULLEN, M.D.; WOLF, D.C.; FERRIS, F.G.; BEVERIDGE, T.J.; FLEMMING, C.A.; BAILEY, G.W. Bacterial sorption of heavy metals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 3143-3149, 1989.

MURRANT, C.L.; REID, M.B. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. **Microscopy Research Technique**, v. 55, p. 236-248, 2001.

NAVARRO, E.; PICCAPIETRA, F.; WAGNER, B.; MARCONI, F.; KAEGI, R.; ODZAK, N.; SIGG, L.; BEHRA, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environment Science and Technology**, v. 42, p. 8959-8964, 2008.

NUCLEO, E.; STEFFANONI, L.; FUGAZZA, G.; MIGLIAVACCA, R.; GIACOBONE, E.; NAVARRA, A.; PAGANI L.; LANDINI, P. Growth in glucosebased medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 270, 2009.

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

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p.577-588, 2007.

PELEG, M. **Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 417p.

PERCIVAL, S.L.; BOWLER, P.G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of Hospital Infection**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2005.

PFLUG, I.J. **Microbiology and engineering of sterilization processes**. 7.ed. Minneapolis, MN: Environmental Sterilization Laboratory, 1990.

PIMENTEL-FILHO, N. J. MARTINS, M. C. F.; NOGUEIRA, G. B. MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 1-8, 2014.

RACHID, H.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 3357-3363, 2000.

RADZIG, M.A.; NADTOCHENKO, V.A.; KOKSHAROVA, O.A.; KIWI, J.; LIPASOVA, V.A.; KHMEL, I.A. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 300-306, 2013.

RATTE, H.T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 18, p. 89-108, 1999.

RAZATOS, A.; ONG, Y.L.; SHARMA, M.M.; GEORGIU, G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. **Applied Biological Science**, v. 95, p. 11059-11064, 1998.

REIDY, B.; HAASE, A.; LUCH, A.; DAWSON, K.A.; LYNCH, I. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. **Materials**, v. 6, p. 2295-2350, 2013.

SAMBHY, V.; MACBRIDE, M.M.; PETERSON, B.R.; SEN, A. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 9798-9808, 2006.

SHENG, X.; TING, Y.P.; PEHKONEN, S.O. Force measurements of bacterial adhesion on metal using a cell probe atomic force microscope. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 310, p. 661-669, 2007.

SHRIVASTAVA, S.; BERA, T.; ROY, A.; SINGH, G.; RAMACHANDRARAO, P.; DASH, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, p. 1-9, 2007.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **The Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 177-182, 2004.

SONG, X.L.; LI, B.; XU, K.; LIU, J.; JU, W.; WANG, J.L.; DONG, X.; LI, J.; QI, Y.F. Cytotoxicity of water-soluble mPEG-SH-coated silver nanoparticles in HL-7702 cells. **Cell Biology Toxicology**, v. 28, p. 225-237, 2012.

STOIMENOV, P.K.; KLINGER, R.L.; MARCHIN, G.L.; KLABUNDE, K.J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents, **Langmuir**, v. 18, p. 6679-6686, 2002.

SUN, D.W. **Thermal food processing**: new technologies and quality issues. 2.ed. New York: CRC Press, 2012.

UBBINK, J.; ZAMMARETTI, P.S. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, p. 263-270, 2007.

VAN DER MEI, B.R.; BUSSCHER, H.J.A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. **Colloids and Surfaces**, v. 11, p. 213-221, 1998.

VAN LOOSDRECHT, M.; NORDE, W.; LYKLEMA, L.; ZEHNDER, J. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. **Aquatic Sciences**, v. 51, p. 103-114, 1990.

VAN OSS, C.J.; GIESE, R.F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VIANA, E.S.; CAMPOS, M.E.M.; PONCE, A.R.; MANTOVANI, H.C.; VANETTI, M.C.D. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. **Biological Research**, v. 42, p. 427-436, 2009.

VOGLER, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

VOLKER, A.; THORSTEN, B.; PETER, S.; MICHAEL, W.; PETER, S.; ELVIRA, D.; EUGEN, D.; REINHARD, S. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. **Biomaterials**, v. 25, p. 4383-4391, 2004.

WANG, H.; JOSEPH, J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 612-616, 1999.

WOJNICZ, D.; TICHACZEK-GOSKA, D. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 259-265, 2013.

WU, Y.; ZHOU, Q. Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 165-173, 2013.

XIU, Z.M.; MA, J.; ALVAREZ, P.J.J. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 9003-9008, 2011.

XIU, Z.M.; ZHANG, Q.B.; PUPPALA, H.L.; COLVIN, V.L.; ALVAREZ, P.J.J. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**, v. 12, p. 4271-4275, 2012.

YAMANAKA, M.; HARA, K.; KUDO, J. Bactericidal actions of silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7589-7593, 2005.

YU, L.W.; LATRIANO, L.; DUNCAN, S.; HARTTWICK, R.; WITY, G. High-performance liquid chromatography analysis of thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans-trans-muconaldehyde. **Analytical Biochemistry**, v. 156, p. 326-333, 1986.

ZHAO, G.J.; STEVENS, S.E. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. **Biometals**, v. 11, p. 27-32, 1998.

ZIMMERMANN, M. **Resistência de esporos de *Byssoschlamys fulva* e *Bacillus coagulans* em polpa de tomate sob condições isotérmicas, não isotérmicas e de altas pressões hidrostáticas**. 2012. 154 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2012.

CONCLUSÃO GERAL

A prata, na forma iônica ou na forma de nanopartículas, é um efetivo agente antimicrobiano, principalmente, sobre bactérias gram-negativas. Concentrações subinibitórias de Ag-NPC ou de AgNO₃ afetaram a adesão das bactérias em superfícies de poliestireno de diferentes maneiras. Houve aumento na adesão das bactérias gram-positivas tratadas com concentrações subinibitórias de Ag-NPC ou de AgNO₃, em relação ao controle. A hidrofobicidade da superfície, uma propriedade físico-química importante na adesão das bactérias, não foi alterada pelas Ag-NPC ou pelo AgNO₃. Esse aumento na adesão pode ter sido desencadeado como resposta geral ao estresse. Sugere-se que mais estudos sejam feitos para esclarecer os diferentes comportamentos das bactérias tratadas com concentrações subinibitórias de Ag-NPC ou de AgNO₃. Esses estudos são relevantes, uma vez que, no ambiente, as bactérias podem ser expostas a concentrações subinibitórias desses antimicrobianos.

Os resultados mostraram que um dos principais mecanismo de ação das Ag-NPC e do AgNO₃ é por complexação com elementos celulares que contêm enxofre e fósforo, como proteínas e DNA, por exemplo. Além disso, foi demonstrado que as Ag-NPC exercem seu efeito antimicrobiano por liberação de íons Ag⁺ no meio.

A atividade antimicrobiana das Ag-NPC e do AgNO₃ foi reduzida em meio de cultura, em comparação com suas atividades em água. Isso indica que a eficiência da prata poderá ser comprometida no caso de contato com resíduos de alimentos. Assim, o uso da prata pode ser mais indicado como sanitizante de superfícies, uma vez que a etapa de sanitização é realizada em superfícies previamente limpas.