

EMILIANE ANDRADE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AÇÃO
ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS
POR UMA NOVA SÍNTESE**

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
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A663c
2010

Araújo, Emiliane Andrade, 1981-

Caracterização físico-química e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata obtidas por uma nova síntese / Emiliane Andrade Araújo. – Viçosa, MG, 2010. xii, 96f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Nanotecnologia. 3. Bactérias. 4. Aço inoxidável. 5. Adesão. 6. Termodinâmica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

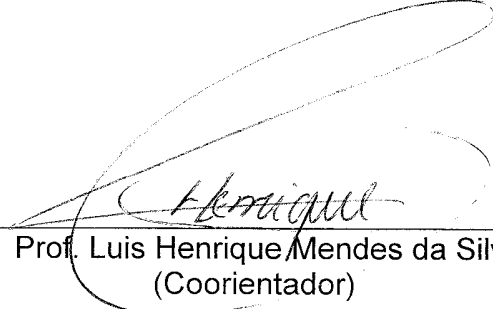
CDD 22.ed. 664

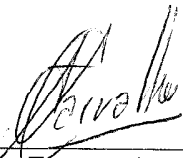
EMILIANE ANDRADE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AÇÃO
ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS
POR UMA NOVA SÍNTESE**

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*.

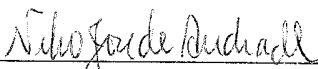
APROVADA: 14 de julho de 2010.


Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)


Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Coorientador)


Prof.^a Ana Cláudia dos Santos Pires


Prof. Maurilio Lopes Martins


Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

À minha mãe, Mires, por todo seu exemplo de amor, carinho e de perseverança, que, desde cedo, foi me ensinado.

Dedico a ela este trabalho, fruto de muito estudo e muita determinação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do Programa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Nélio José de Andrade, pela orientação, pelas grandes oportunidades, pela confiança e amizade.

Ao professor Luis Henrique Mendes da Silva, pela orientação, pela dedicação, pela confiança, amizade e paciência.

Ao professor Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, pelo aconselhamento, atenção e amizade.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho, pela amizade.

Ao professor Sukarno, pela grande ajuda.

Aos professores Maurílio Lopes Martins e Ana Clarissa dos Santos Pires, por participarem da minha banca.

À minha maravilhosa mãe, simplesmente por existir!

Ao meu querido pai, pelo apoio e carinho.

Às minhas irmãs Viviane e Liliane, pela amizade e pelo carinho.

Ao meu namorado Alexandre, pelo amor, estímulo e companheirismo.

Aos meus tios, especialmente à Silvânia, Janaína, Halliday e Dirlene, vó Lili e aos primos, por sempre acreditarem em mim.

Aos amigos, Mirtes e Luis Henrique, pelo amor e pela grande amizade.

A toda equipe do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, pela amizade.

Ao Juninho e João, eficientes estagiários e pessoas adoráveis.

À Ana Clarissa, pela importante amizade.

À Patrícia Bernardes, pela amizade e convivência agradável.

Aos meus amigos especiais, Eva, Marali, Patrícia Érica, Márcia, Geany, Isadora, Andréa, pela torcida e pelo carinho.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, pela boa convivência.

Aos funcionários do DTA, pela contribuição em vários momentos.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

BIOGRAFIA

EMILIANE ANDRADE ARAÚJO, filha de Adimar Fonseca de Araújo e de Mires Geralda Andrade Araújo, nasceu em Ipatinga, Minas Gerais, em 17 de setembro de 1981.

Em março de 2001, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios, na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2005.

Em março do mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2007.

Em março de 2007, iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na mesma instituição, concluindo-o em julho de 2010.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO 1	4
MECANISMO DE FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	4
RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. Preparo das nanopartículas de prata	11
2.1.1. Síntese das nanopartículas de prata	11
2.1.2. Concentração das nanopartículas de prata	12
2.1.3. Síntese das nanopartículas de prata na presença de cloreto de sódio	
2.1.4. Obtenção das nanopartículas de prata pelo método Turkevich ..	12
2.1.5. Nanopartículas de prata sintéticas	13
2.2. Quantificação das nanopartículas de prata por espectrometria de absorção atômica	13

	Página
2.3. Caracterização das nanopartículas de prata por espectroscopia de infravermelho.....	13
2.4. Determinação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de prata por espalhamento dinâmico de luz.....	14
2.5. Confirmação da presença de prata metálica por difração de raios-X.....	15
2.6. Determinação do diâmetro das nanopartículas de prata por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	15
2.7. Espectroscopia de fluorescência de nanopartículas de prata	16
2.8. Determinação da condutividade elétrica	16
2.9. Determinação da tensão interfacial	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. Produção de nanopartículas de prata	17
3.2. Espectroscopia de Infravermelho	19
3.3. Espalhamento de luz.....	24
3.4. Difração de Raios-X	26
3.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	30
3.6. Espectroscopia de fluorescência.....	31
3.7. Condutividade elétrica.....	33
3.8. Tensão interfacial	34
3.9. Mecanismo proposto de formação de nanopartículas.....	35
4. CONCLUSÃO	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO 2	43
EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	43
RESUMO	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1. Preparo das nanopartículas de prata	49
2.1.1. Síntese das nanopartículas de prata.....	49
2.1.2. Concentração das nanopartículas de prata.....	50
2.1.3. Síntese das nanopartículas de prata na presença de cloreto de sódio.....	50
2.1.4. Obtenção das nanopartículas de prata pelo método Turkevich..	50
2.1.5. Nanopartículas de prata sintéticas	50
2.1.6. Características das nanopartículas de prata	51
2.2. Determinação do efeito antimicrobiano pelo teste do halo.....	51
2.3. Imersão de superfícies de aço inoxidável com bactérias aderidas em dispersões contendo nanopartículas de prata.....	52

	Página
2.4. Remoção de células vegetativas de <i>B. cereus</i> aderidas a cilindros de aço inoxidável	53
2.5. Análise estatística dos resultados	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4. CONCLUSÃO	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
 CAPÍTULO 3	 71
 ASPECTOS COLOIDAIIS DA ADESÃO DE MICRO-ORGANISMOS: ESTRATÉGIAS DE INIBIÇÃO DO PROCESSO DE ADESÃO	 71
 RESUMO	 71
1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1. Condicionamento das superfícies	79
2.2. Micro-organismos utilizados e condições de cultivo	80
2.3. Determinação do ângulo de contato	80
2.3.1. Medida do ângulo de contato para superfícies	80
2.3.2. Medida do ângulo de contato para micro-organismos	80
2.3.3. Determinação do ângulo de contato	81
2.4. Análise estatística dos resultados	83
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4. CONCLUSÃO	92
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
 3. CONCLUSÃO GERAL	 96

RESUMO

ARAÚJO, Emiliane Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2010. **Caracterização físico-química e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata obtidas por uma nova síntese**. Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva, Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Antônio Fernandes de Carvalho.

A síntese de nanopartículas de prata tem atraído interesse em virtude de novas e diferentes características físicas e químicas que possuem quando comparadas com as que compõem a fase macroscópica. Estas características permitem aplicações atrativas em vários campos, inclusive na área de alimentos. O trabalho teve como objetivos: 1) caracterizar as nanopartículas de prata obtidas segundo metodologia proposta por Fernandes (2010) utilizando as técnicas de espectroscopia de infravermelho, espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X, bem como quantificar as nanopartículas formadas por meio de emissão atômica; 2) avaliar o efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata obtidas por diferentes metodologias sobre as espécies *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella Choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, bem como avaliar a capacidade destas nanopartículas em removerem células vegetativas aderidas em superfícies de aço inoxidável; e 3) avaliar a capacidade das nanopartículas de prata em alterar as características termodinâmicas de superfície de aço inoxidável a fim de reduzir o processo de

adesão e formação de biofilmes. Medidas de microscopia eletrônica de transmissão, infravermelho, difração de raios-X e espalhamento dinâmico de luz confirmaram a presença de nanopartículas de prata na dispersão sintetizada, sendo que o diâmetro médio variou de 2,8 a 4,4 nm. Observou-se que este processo de formação das nanopartículas caracteriza-se por uma reação de auto-oxirredução da sulfadiazina de prata catalisada por micelas de brometo de dodeciltrimetilamônio (Dotab), uma vez que por meio da análise de emissão atômica verificou-se que com aumento no número de micelas houve incremento na concentração de nanopartículas na dispersão. As nanopartículas de prata testadas apresentaram eficiente ação antimicrobiana para as bactérias avaliadas. As nanopartículas concentradas (60 mg/L) foram eficientes na remoção de células aderidas de *Pseudomonas aeruginosa* em cupons de aço inoxidável (10 mm x 10 mm) alcançando cinco reduções decimais após contato com o antimicrobiano por imersão durante 30 minutos. As nanopartículas concentradas também foram eficientes na remoção de células aderidas de *Bacillus cereus* em cilindros de aço inoxidável (área interna de 336,5 cm²). Por fim, a termodinâmica de adesão tornou-se desfavorável após a superfície de aço inoxidável ter sido condicionada com nanopartículas de prata para as bactérias testadas neste trabalho. Portanto, as nanopartículas de prata obtidas por esta metodologia nova e simples apresentam ser uma estratégia interessante na indústria de alimentos para controle de adesão e consequente formação de biofilmes.

ABSTRACT

ARAÚJO, Emiliane Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Characterization and application of silver nanoparticles obtained by a new method.** Adviser: Nélio José de Andrade. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva, Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira and Antônio Fernandes de Carvalho.

The synthesis of silver nanoparticles has attracted interest due to new and different physical and chemical characteristics they possess and these attractive features enable applications in various fields. The present study aimed to: I) characterize the silver nanoparticles obtained by Fernandes (2010) method, using techniques of infrared spectroscopy, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, X-ray diffraction and atomic emission to quantify the nanoparticles synthesized II) evaluate the antimicrobial effect of silver nanoparticles obtained by different methodologies on *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella Choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* bacteria as well as evaluating the ability of these nanoparticles to remove vegetative cells adhered on stainless steel surfaces; III) evaluate the capacity of silver nanoparticles to modify the thermodynamic characteristics of stainless steel surface to reduce the process of adhesion and biofilm formation. Measures of transmission electron microscopy, infrared, x-ray diffraction and dynamic light scattering confirmed the presence of silver nanoparticles synthesized in the dispersion and they had an

average diameter ranging from 2.8 to 4.4 nm. It was observed that this process of formation of nanoparticles is characterized in an auto redox reaction of silver sulfadiazine catalysed by micelles of the dodecyltrimethylammonium bromide. The analysis of atomic emission confirmed the micellar catalyse, once with increasing number of micelles of there was an increase in the concentration of nanoparticles in dispersion. The silver nanoparticles evaluated showed good antimicrobial activity for Gram-positive and Gram-negative bacteria tested. Concentrated nanoparticles were efficient in removing adhered cells of *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel coupons (10 mm x 10 mm) reaching five decimal reductions after contact with the antimicrobial agent by immersion for 30 minutes. Concentrated nanoparticles (60 mg/L) were also efficient in removing adhered cells of *Bacillus cereus* on stainless steel cylinders (336,5 cm²). Finally, the thermodynamics of adhesion became unfavorable after the stainless steel surface was conditioned with silver nanoparticles to the bacteria tested here. Therefore, the silver nanoparticles obtained by this new and simple methodology have to be an interesting strategy in the food industry to control the adhesion and subsequent biofilm formation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A síntese de nanopartículas tem atraído a atenção dos pesquisadores em virtude de diferentes características físicas e químicas que possuem como a alta relação superfície/volume, que não são encontradas em materiais convencionais e que permitem aplicações atrativas em vários campos como medicina, biotecnologia, catálise, óptica e indústria de alimentos (GÚZMAN *et al.*, 2009).

Existem vários métodos de síntese conhecidos para a obtenção de materiais em escala nanométrica, sendo os mais empregados os métodos químicos que são baseados em reações realizadas em solução que levam a formação de colóides onde as nanopartículas ficam dispersas em um solvente (OLIVEIRA, 2005). As nanopartículas de metais sintetizadas por via aquosa são as mais estudadas, destacando-se dentre elas as nanopartículas de prata.

As nanopartículas de prata destacam-se como bons agentes antimicrobianos por apresentar amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e vírus. Em relação à toxicidade para as células animais, a prata é o metal que apresenta a menor toxicidade (NETO *et al.*, 2008). Atualmente, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em função da necessidade de desenvolvimento de sínteses de novos antimicrobianos em virtude do aumento no número de bactérias resistentes a antibióticos.

O mecanismo de ação antimicrobiana proposto para as nanopartículas de prata refere-se à interação com grupos que contêm os elementos enxofre e fósforo que são encontrados tanto nas membranas celulares como no citoplasma das bactérias. Sua interação ocorre com a membrana celular causando danos no processo de respiração celular e, no interior das mesmas, interagem com o DNA impedindo a divisão celular (MORONES *et al.*, 2005). Deste modo, em virtude da ação antimicrobiana das nanopartículas de prata, estas se tornam uma estratégia em potencial para inibir a adesão microbiana em superfícies de aço inoxidável que são comumente utilizadas nas indústrias de alimentos prevenindo assim a formação de biofilmes.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: 1) caracterizar as nanopartículas de prata obtidas segundo metodologia proposta por Fernandes (2010), por meio das técnicas de espectroscopia de infravermelho, espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X, bem como quantificar as nanopartículas formadas por meio de emissão atômica; 2) avaliar o efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata obtidas por diferentes metodologias sobre as espécies *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella Choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, bem como avaliar a capacidade destas nanopartículas em removerem células vegetativas aderidas em superfícies de aço inoxidável; e 3) avaliar a capacidade das nanopartículas de prata em alterar as características termodinâmicas de superfície de aço inoxidável a fim de reduzir o processo de adesão e formação de biofilmes.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GUZMÁN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 3, 2009.

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

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. **Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens**. São Carlos, SP, 2008. (Comunicado técnico 99).

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

CAPÍTULO 1

MECANISMO DE FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

RESUMO

Novos métodos de produção de nanopartículas têm surgido, sendo os principais baseados na redução química de sais de prata usando agentes redutores em solução aquosa. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar as nanopartículas de prata obtidas segundo nova metodologia proposta por Fernandes (2010) utilizando as técnicas de espectroscopia de infravermelho, espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X bem como quantificar as nanopartículas formadas por meio de absorção atômica. Misturas de soluções contendo dodeciltrimetilamônio (Dotab) na concentração de duas vezes a concentração micelar crítica e sulfadiazina de prata na concentração de 0,028 M produziram nanopartículas de prata e o processo de formação representa uma auto-oxirredução catalisada por micelas, uma vez que houve aumento na concentração de nanopartículas de prata na dispersão quando ocorreu aumento no número de micelas de Dotab na reação. As técnicas de espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X e espalhamento dinâmico de luz confirmaram a presença de nanopartículas de prata na dispersão sintetizada pela nova metodologia. O diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas variou de 2,8 a 4,4 nm, o que proporciona grande área interfacial, propriedade importante para nanopartículas.

1. INTRODUÇÃO

Nanociência e nanotecnologia são as ciências que manipulam a matéria na escala entre 0,1 e 100 nm, utilizando-se de princípios da física, química e da biotecnologia, com o intuito de sintetizar novos materiais que possuam novas propriedades; modificar e manipular superfícies, e elaborar microestruturas em duas ou mesmo três dimensões, visando uma determinada aplicação (DAY, 1996; OLIVEIRA, 2005). O tamanho de nanopartículas entre 0,1 e 100 nm não é o único critério para caracterizá-las, devem-se considerar suas propriedades físico-químicas que são diferentes da matéria em escala macromolecular.

Nanopartículas de prata apresentam como propriedade característica grande área superficial. Com a alta relação superfície/volume dos materiais em escala nanométrica de tamanho, tem-se que o número de átomos presentes na superfície do cristal é comparável ao número dos que estão localizados no seu interior, o que faz com que propriedades físicas e químicas, que são convencionalmente controladas pelo *bulk*, tornem-se dominadas pela interface, mudando as propriedades do nanomaterial (OLIVEIRA, 2005).

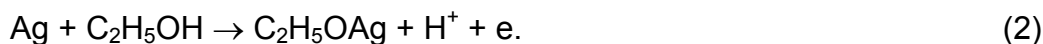
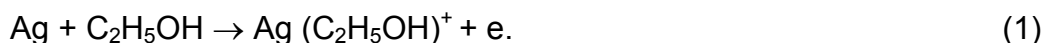
Existem vários métodos de síntese conhecidos para a obtenção de materiais em escala nanométrica, sendo os métodos químicos os mais utilizados, e são baseados em reações realizadas em solução, levando à formação de colóides, em que as nanopartículas (NPs) ficam dispersas em um solvente adequado (MURRAY, 2000).

Nos últimos anos, novos métodos de produção de nanopartículas de prata têm surgido. Os principais baseiam-se na redução química de sais de prata usando agentes redutores em solução aquosa. As nanopartículas de prata têm sido produzidas também utilizando métodos eletroquímicos, decomposição térmica, ablação a laser e irradiação por microondas, processos de micelas reversas, dentre outros (JIAN *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 2004; JIAN *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005; STAROWICZ *et al.*, 2006; DALLAS *et al.*, 2007; MURUGADOSS *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2009).

Petica *et al.* (2008) produziram uma solução de prata coloidal testando diferentes misturas contendo o polímero PVP (poli (N-vinilpirrolidona)) e um dos seguintes surfactantes iônicos: sulfonato de naftaleno de sódio (Na-NS), lauril sulfato de sódio (Na-LS) e dodecilbenzeno sulfonato de sódio (SDBS). Os autores objetivaram avaliar o efeito destas misturas sobre a concentração de prata produzida. A solução de prata coloidal foi produzida pelo método eletroquímico. Segundo os autores, a presença do PVP exibiu excelentes propriedades de molhagem e facilitou a formação de nanopartículas, especialmente quando a massa molar foi de 10.000 Da. Além disso, o coestabilizador (surfactante) adicionado mostrou efeito inibidor na possível aglomeração, assegurando estabilidade estérica e como resultado aumento no teor de prata na solução. A solução possuía coloração variando de amarelo a laranja escuro. O tamanho das nanopartículas formadas foi entre 10 e 30 nm. A estabilidade da solução coloidal foi determinada pela medida do potencial Zeta que indica se a partícula de um líquido tende a associar e/ou sedimentar. O valor do potencial Zeta variou de -18 a -35 mV.

Starowicz *et al.* (2006) descreveram um simples e novo método para produção de nanopartículas de prata e investigaram a polarização de prata em etanol contendo ânions nitrato. A presença dos íons NO_3^- melhorou a condutividade elétrica da solução. As nanopartículas foram formadas por polarização de prata em solução de etanol. Segundo os autores, ocorreu a oxidação de prata e dissolução na presença de etanol. Em seguida, Ag_2O é reduzido com aldeído obtido da oxidação de etanol e as nanopartículas são formadas. O método desenvolvido é simples, não requer instrumentos caros e não necessita

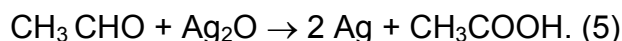
de surfactantes e nem de agentes redutores adicionais. Os autores propuseram as reações que ocorrem em todo o processo de acordo com a reação.



Os íons de prata Ag^+ podem ser solvatados por partículas de solvente orgânico, por isso pode ocorrer a formação do cátion pseudomolecular $\text{Ag} (\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})^+$. Reações do álcool com metais também é possível conduzindo a formação de alcoóxidos ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OAg}$). Os cátions $\text{Ag} (\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})^+$ e as partículas $\text{C}_2\text{H}_5\text{OAg}$ são dissolvidas.



No próximo passo, Ag_2O pode ser reduzido em uma reação com aldeído, participando da formação das nanopartículas.



Ao mesmo tempo, os íons pseudomoleculares ($\text{Ag} (\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})^+$) são reduzidos de acordo com a reação:



Compósitos representam uma classe de materiais em que duas ou mais substâncias combinadas passam a exibir propriedades únicas, que não são possíveis de serem obtidas a partir de seus componentes individuais. Quando pelo menos uma das fases constituintes do compósito possui dimensões em escala nanométrica, este passa a ser denominado nanocompósito. Dallas *et al.* (2007) estudaram a polimerização interfacial de pirrole e a síntese de nanocompósitos com nanopartículas de prata finamente dispersas. Um importante aspecto do procedimento de polimerização interfacial é a capacidade da adição de diferentes moléculas de surfactantes carregadas positivamente ou negativamente na fase orgânica. Como resultado a morfologia e características

estruturais do polímero podem ser facilmente controlado de acordo com as condições de reação. Os nanocompósitos de prata/pirrole foram obtidos utilizando solução de AgNO_3 (0,75 mmol) como oxidante adicionada em pirrole (7 mmol) em clorofórmio. A polimerização procedeu-se na interface água/clorofórmio utilizando Fe^{3+} ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) como oxidante em que a fase orgânica também continha o surfactante brometo de dodeciltrimetilamônio – DTAB, ou dodecilsulfato de sódio – SDS. Portanto, a formação de nanopartículas de prata resultou da ação oxidativa de cátions Ag^+ na polimerização ocorrida. Os íons NO_3^- do AgNO_3 são incorporados no esqueleto do poli(pirrole) que agem como contra-íons. O aprisionamento de nanopartículas de prata na matriz pirrole é uma forte indicação de que a reação ocorre quase exclusivamente na interface.

Um dos grandes desafios na síntese de nanopartículas consiste em mantê-las estáveis quanto ao tamanho, evitando a aglomeração. Como resultado de sua grande área superficial, nanopartículas coloidais são termodinamicamente instáveis, o que pode ser observado pela equação abaixo:

$$dG = \gamma d\sigma \quad (7)$$

em que γ é a tensão superficial e $d\sigma$ é a variação na área superficial (ATKINS, 1994; OLIVEIRA, 2005).

Segundo Oliveira (2005), um mecanismo básico de estabilização de dispersões coloidais, de modo a evitar a aglomeração das partículas, é a presença de uma camada passivadora. As partículas são neutras e sua aproximação é limitada por esta camada protetora de outro material, cuja ação baseia-se no aproveitamento do impedimento estérico, o que evita o contato das mesmas. No caso de NPs metálicas, vários são os compostos possíveis de serem utilizados como passivantes, como por exemplo, polímeros, surfactantes, moléculas contendo grupos terminais -SH, -CN, $-\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$, $-\text{NH}_2$, dentre outros.

A estabilização é explicada por adsorção de polímeros e, ou, surfactantes dentro de superfícies das partículas coloidais. Quando ocorre presença de polímeros na síntese de nanopartículas, as partículas Ag^0 são

cobertas pela cadeia polimérica e o aumento da partícula é estericamente impedido pela camada adsorvida na superfície. É claramente visto que a formação e o aumento da partícula são desacelerados pela adição de polímeros, devido o efeito inibitório estérico das cadeias poliméricas que dificulta a nucleação e a taxa de aumento.

Estudos prévios indicam que a estabilidade coloidal, tamanho da partícula, morfologia e propriedades da superfície dependem fortemente do método específico de síntese e das condições experimentais aplicadas (WANG; GU, 2004). Uma grande vantagem das nanopartículas de prata é a estabilidade em altas temperaturas e baixa volatilidade (PETICA *et al.*, 2008).

No trabalho de Wang e Gu (2004), as nanopartículas foram estabilizadas devido à adsorção de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) na superfície das nanopartículas de prata. A medida de potencial Zeta mostrou valor de +39 mV para as nanopartículas estabilizadas com o surfactante e -46 mV para as nanopartículas sem CTAB. Esses resultados revelam que o surfactante catiônico inverte a carga da superfície para positiva. É importante mencionar também que os autores notaram durante a síntese que a prata coloidal não é estável, ocorrendo um precipitado cinza quando baixas concentrações de CTAB são usadas. Esses resultados sugerem que as partículas de prata necessitam de moléculas de CTAB suficientes na superfície para manter a estabilidade estática. Portanto, as nanopartículas preparadas neste trabalho foram estáveis e mantiveram em dispersão aquosa sem sofrer agregação por mais de três meses. A explicação fundamenta-se na presença do surfactante que forma uma cobertura sobre as partículas de prata carregadas negativamente e assim, evita o crescimento e agregação das nanopartículas.

A formação de nanopartículas, segundo Patakfalvi *et al.* (2007), inicia-se com a fase indução onde a nucleação parte de uma solução supersaturada. O núcleo pode aumentar por mecanismos de difusão formando as partículas primárias e esses agregados formam as partículas secundárias. Agregação é promovida por mudanças no estado químico do sistema, como exemplo, a força iônica pode aumentar ou o pH pode alterar. Esses efeitos reduzem a repulsão eletrostática, promovendo a agregação de partículas.

Os processos de nucleação e crescimento governam o tamanho e a morfologia do precipitado. Quando a precipitação começa, inúmeros núcleos

são inicialmente formados, mas estes tendem a se agregar para formar cristais termodinamicamente mais estáveis. Nesta etapa de crescimento das partículas coloidais, o principal fator limitante deste processo é a difusão. Sendo assim, gradientes de concentração e temperatura são os fatores predominantes que determinam a velocidade da reação que um novo material é adicionado à superfície da partícula em crescimento via transferência de massas de longa distância. Para produzir nanopartículas, a etapa de nucleação deve ser relativamente rápida e a de crescimento relativamente lenta (OLIVEIRA, 2005).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo caracterizar as nanopartículas de prata obtidas segundo metodologia proposta por Fernandes, (2010) por meio das técnicas de espectroscopia de infravermelho, espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X, bem como quantificar as nanopartículas formadas por meio de absorção atômica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo das nanopartículas de prata

2.1.1. Síntese das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Fernandes (2010). Preparou-se uma solução aquosa na concentração de duas vezes (0,0312 M) a concentração micelar crítica (CMC) e também na concentração de 1 CMC (0,0156 M) do surfactante dodeciltrimetilamônio (Dotab) (Sigma, São Paulo, Brasil), cuja CMC é 0,0156 M e nesta solução adicionou-se sulfadiazina de prata (S_{Ag}) na concentração de (0,028 M) (Sigma, São Paulo, Brasil). A dispersão foi submetida a uma agitação suficiente para garantir mistura completa e em seguida realizou-se centrifugação da dispersão a 15.000 g durante 5 minutos em centrífuga (SIGMA Laboratory Centrifuges 3k30). Após centrifugação, o sobrenadante de coloração amarela obtida que continha as nanopartículas foi separado do pellet e foram realizadas as análises de espectroscopia de infravermelho, espalhamento de luz, difração de raios-X, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia de fluorescência, condutividade elétrica e tensão interfacial para caracterização das nanopartículas.

O mesmo procedimento de preparo das nanopartículas foi repetido alterando apenas o pH da solução de Dotab, que foram ajustados para os

seguintes valores: 3, 5, 7, 9, 11 e 13. As nanopartículas com os diferentes meios foram conduzidas para a determinação do diâmetro hidrodinâmico para observar influência do pH no tamanho das nanopartículas formadas.

2.1.2. Concentração das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata concentradas foram obtidas conforme metodologia apresentada no item 2.1.1, sem variação no valor de pH, e em seguida submetidas a aquecimento para evaporação parcial (70%) do solvente a fim de concentrar as nanopartículas presentes na dispersão e caracterizá-las pelas análises de espalhamento de luz e espectroscopia de fluorescência.

2.1.3. Síntese das nanopartículas de prata na presença de cloreto de sódio

Na metodologia apresentada no item 2.1.1, sem variação de pH, foi adicionado 0,1 M de cloreto de sódio (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), a fim de promover desestabilização na dupla camada elétrica e observar a influência no efeito das nanopartículas formadas. Após o preparo destas nanopartículas, as mesmas foram submetidas à microscopia de transmissão eletrônica e ao espalhamento dinâmico de luz com o objetivo de observar a morfologia e o tamanho das nanopartículas produzidas.

2.1.4. Obtenção das nanopartículas de prata pelo método Turkevich

As nanopartículas produzidas pelo método Turkevich (Monteiro, 2009) foram obtidas por meio da reação de redução do AgNO_3 com citrato. Para preparar as nanopartículas, a solução de AgNO_3 foi aquecida e após 2 minutos de ebulição, o citrato de sódio foi adicionado e a solução tornou-se amarela após poucos minutos indicando a formação das nanopartículas. A mesma foi mantida em ebulição por 6 minutos e então resfriada. Estas nanopartículas foram analisadas pela técnica de espalhamento de luz e espectroscopia de fluorescência.

2.1.5. Nanopartículas de prata sintéticas

As nanopartículas denominadas neste trabalho de sintéticas foram adquiridas da empresa Sigma (São Paulo, Brasil) e foram analisadas pelas técnicas de espalhamento de luz, difração de raios-X, espectroscopia de fluorescência.

2.2. Quantificação das nanopartículas de prata por espectrometria de absorção atômica

A quantificação das nanopartículas presentes nas dispersões foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. As amostras foram preparadas com variação na concentração de Dotab (2 CMC, 4 CMC, 6 CMC, 8 CMC e 10 CMC) e mantendo constante a concentração de SAg e também para dispersões preparadas mantendo constante a concentração de Dotab e variando apenas a concentração de SAg (0,084 M; 0,14 M e 0,19 M). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro de absorção atômica Specttr AA-200 (VARIAN) por meio de absorção atômica com emprego de chama.

2.3. Caracterização das nanopartículas de prata por espectroscopia de infravermelho

O espectro de infravermelho foi obtido para os reagentes utilizados na produção das nanopartículas; Dotab e SAg, e para as nanopartículas de prata. As amostras antes da espectroscopia de infravermelho foram submetidas ao processo de liofilização.

O espectro foi realizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa utilizando o equipamento espectrofotômetro (SHIMADZU) na faixa de $400 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$. As medidas foram realizadas no modo de transmissão por meio de pellets de KBr para todas as amostras.

2.4. Determinação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de prata por espalhamento dinâmico de luz

O espalhamento dinâmico de luz foi medido no Laboratório de Fluidos Complexos do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa. As amostras foram filtradas em filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF), com diâmetro de poro de 0,45 μm , e armazenadas em frascos de vidro cilíndricos de 10 mL, hermeticamente fechados.

As medidas de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas, em temperatura ambiente (25 °C), com ângulo de 30°, utilizando um laser de estado sólido de 150 mW (661 nm e um fotodiodo de avalanche como detector). As funções correlações foram calculadas pelo correlacionador Turbocorr (Brookhamen Co.)

Para espalhamento de partículas em solução que exibem movimento Browniano, a função correlação intensidade do espalhado decai exponencialmente e está relacionado ao fator de estrutura dinâmica via relação de Siegler (PECORA, 1985):

$$C(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} = 1 + \beta |F_s(q, \tau)|^2 = 1 + \beta .e^{-2\Gamma\tau} \quad (8)$$

em que F_s representa a função de auto-correlação temporal; $I(t)$ e $I(t+\tau)$ são as intensidades de luz espalhada nos instantes t e $(t+\tau)$ respectivamente, q é o módulo do vetor de espalhamento e β é uma constante que depende da geometria.

A taxa de decaimento (Γ) relaciona-se com a difusividade das partículas em solução pela equação:

$$\Gamma = D_s q^2 \quad (9)$$

e o vetor de espalhamento pode ser determinado pela equação 10:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2} \quad (10)$$

em que λ é o comprimento de onda da radiação, θ o ângulo da luz coletada em relação ao feixe incidente e n o índice de refração do meio.

A partir da função correlação obtém-se o coeficiente de autodifusão (D_s) das partículas. A determinação do diâmetro médio pode ser obtida pela equação de Stokes-Einstein:

$$D_s = \frac{\kappa_B T}{f} = \frac{\kappa_B T}{3\pi\eta D_H} \quad (11)$$

em que κ_B é a constante de Boltzmann e equivale a $1,381 \times 10^{-23}$ J/K; T é a temperatura; f é o fator de fricção de Stokes ($3\pi\eta D_H$); η é a viscosidade do solvente e D_H representa o diâmetro hidrodinâmico da partícula. As curvas foram analisadas pelo método CONTIN e por exponencial.

2.5. Confirmação da presença de prata metálica por difração de raios-X

As nanopartículas produzidas pela nova síntese foram congeladas e liofilizadas (LABCONCO Freeze Dry System/Freezone 4.5) previamente no Laboratório de Mineralogia do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa e, em seguida, submetidas à análise de difração de raios-X para confirmação da presença de prata metálica. A difração de raios-X (XRD) foi realizada com auxílio do equipamento Difrátômetro de raios-X (Modelo X' Pert Pro, Panalytical) com medidas em uma faixa de variação de $2\theta = 10^\circ$ a 90° .

2.6. Determinação do diâmetro das nanopartículas de prata por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do ICB/UFMG (CEMEL) no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai – G2-20-FEI 2006. O microscópio é otimizado para estudos estruturais em resolução atômica consistindo de uma canhão com filamento termo-iônico de LaB_6 , com potencial de aceleração de 200 KV. O preparo da amostra consistiu na adição sobre uma grade de cobre recoberta com um fino filme de carbono amorfo de uma gota da dispersão das nanopartículas. Após a secagem cuidadosa com papel filtro, a grade foi observada pelo MET.

2.7. Espectroscopia de fluorescência de nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata obtidas foram submetidas à análise de fluorescência utilizando Espectrofotômetro modelo USB 2000 da *Ocean Optics*, utilizando-se como fonte de radiação um LED (*Light Emitting Diode*) com a intensidade máxima em 369,7 nm. As medidas foram realizadas em um ambiente fechado para evitar interferência da luz externa. O espectro de fluorescência foi também medido para as nanopartículas produzidas com adição de NaCl ao meio, nanopartículas de prata concentradas, para as nanopartículas sintéticas/Sigma, bem como para as nanopartículas produzidas pelo método Turkevich.

2.8. Determinação da condutividade elétrica

A análise de condutividade foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. A leitura da condutividade elétrica foi feita em um condutivímetro de bancada para soluções aquosas SCHOTT-Konduktometer, com faixa de leitura de 0 a 20.000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, células de condutividade tipo caneta e constante de eletrodo 1,0.

As amostras analisadas foram soluções de Dotab em diferentes concentrações (0,00156 a 0,156 M) e dispersões de Dotab nas mesmas concentrações mencionadas acima e com adição de SAg (0,028 M).

2.9. Determinação da tensão interfacial

As medidas de tensão interfacial foram realizadas no Laboratório de Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. A determinação foi conduzida pelo método da gota pendente usando o equipamento goniômetro (Kruss, Alemanha).

As amostras examinadas foram diferentes soluções de Dotab com concentrações variando na faixa de (0,00156 a 0,156 M) bem como as mesmas soluções de Dotab com adição de SAg (0,028 M). A medida foi realizada à temperatura ambiente (25°C).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção de nanopartículas de prata

A Figura 1 apresenta as dispersões de nanopartículas formadas pela mistura de Dotab na concentração de 0,0156 M (1 CMC) e 0,028 M de SAg e pela mistura de 0,0312 M de Dotab (2 CMC) e 0,028 M de SAg.

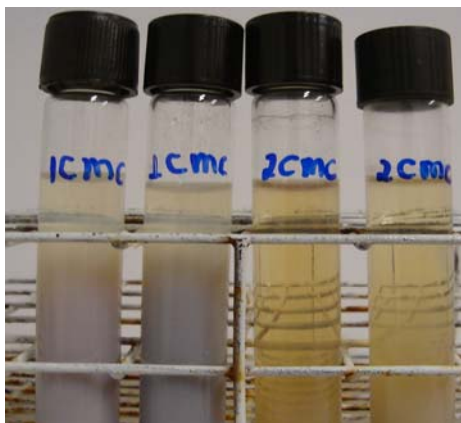


Figura 1 – Fotografia das dispersões de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de Dotab (1 CMC ou 2 CMC) e sulfadiazina de prata (0,028 M).

A técnica apresentada para a nova síntese de nanopartículas é simples e rápida. Uma dispersão formada por nanopartículas de prata caracteriza-se por uma coloração amarela e esta cor foi verificada quando o surfactante da mistura inicial possuía concentração acima da CMC (0,312 M), não sendo

observada para a mistura de SAg e Dotab nas concentrações menores ou iguais a 0,0156 M (1 CMC). É importante também mencionar que em estudos prévios a síntese de nanopartículas foi testada utilizando o surfactante brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) e não houve formação da dispersão amarela que é característica da presença de nanopartículas de prata.

Segundo Link e El-Sayed (2003), a dispersão das nanopartículas manifesta esta cor devido à absorção de fótons associados à ressonância de plasma. A origem física da forte absorção de luz por nanopartículas de metais nobres é a oscilação de elétrons induzida por interação com o campo eletromagnético. O campo elétrico de uma onda induz a polarização dos elétrons em relação ao núcleo iônico da nanopartícula esférica, criando uma diferença de carga na superfície da nanopartícula. Desta forma, uma oscilação dipolar de todos os elétrons com a mesma fase é produzida. Quando a frequência do campo eletromagnético torna-se ressonante com o movimento dos elétrons, uma forte absorção dos elétrons é vista que origina a cor observada.

No trabalho de Guzmán *et al.* (2009) as nanopartículas foram sintetizadas a partir de nitrato de prata como precursor do metal, hidratos de hidrazina e citrato de sódio como agentes redutores e dodecil sulfato de sódio (SDS) como agente estabilizante. Diferentes colorações foram obtidas quando a metodologia de síntese variou. Uma dispersão coloidal amarela foi visualizada quando hidratos de hidrazina e citrato de sódio foram utilizados como agentes redutores. Dispersão marrom pálido foi obtido quando as nanopartículas foram preparadas a partir de hidratos de hidrazina como agente redutor e SDS como estabilizante e, uma dispersão vermelha foi produzida quando hidratos de hidrazina e citrato de sódio foram os agentes redutores e SDS o agente estabilizante.

Monteiro *et al.* (2009) produziram nanopartículas de prata pelo método Turkevich e observaram que a solução tornou-se amarela após alguns minutos de reação entre AgNO_3 e citrato, indicando a formação de nanopartículas de prata.

A formação de nanopartículas na dispersão com concentração de Dotab acima da CMC foi confirmada com a análise de absorção atômica (Tabela 1). Observou-se que houve dependência da quantidade produzida de nanopartículas

Tabela 1 – Concentrações de nanopartículas de prata produzidas a partir de diferentes combinações de concentrações de Dotab e SAg, em pH de 7 e a 25 °C

Tratamentos	Concentração de nanopartículas de prata (mg/L)
Dotab (2 CMC) e SAg (0,028 M)	5,3037
Dotab (4 CMC) e SAg (0,028 M)	41,7940
Dotab (6 CMC) e SAg (0,028 M)	47,8970
Dotab (8 CMC) e SAg (0,028 M)	76, 8380
Dotab (10CMC) e SAg (0,028 M)	242,1400
Dotab (2 CMC) e SAg (0,0084 M)	6,1280
Dotab (2 CMC) e SAg (0,014 M)	4,9692
Dotab (2 CMC) e SAg (0,019 M)	5,4623

com a concentração empregada de surfactante. A presença de micelas de Dotab é fundamental na síntese de nanopartículas confirmando uma reação de catálise micelar. Quanto maior a quantidade de micelas presentes, maior a produção de nanopartículas de prata. Pôde-se também verificar que a concentração mínima de SAg de 0,084 M foi suficiente para possibilitar a formação de nanopartículas, não tendo nenhuma relação entre o aumento de sua concentração com o aumento do rendimento da síntese quando mantida constante a concentração de surfactante.

Petica *et al.* (2008), produziram uma solução de prata coloidal testando diferentes misturas contendo o polímero PVP (poli (N-vinilpirrolidona)) e um dos seguintes surfactantes iônicos: sulfonato de naftaleno de sódio (Na-NS), lauril sulfato de sódio (Na-LS) e dodecilbenzeno sulfonato de sódio (SDBS). A maior concentração de prata obtida foi de 35 mg/L obtida da mistura contendo 3 g/L PVP 10, 0.5 g/L Na-NS.

3.2. Espectroscopia de Infravermelho

A dispersão contendo coloração amarela foi recolhida e liofilizada e obteve-se o espectro infravermelho para as nanopartículas produzidas pela metodologia proposta por Fernandes (2010) (Figura 2).

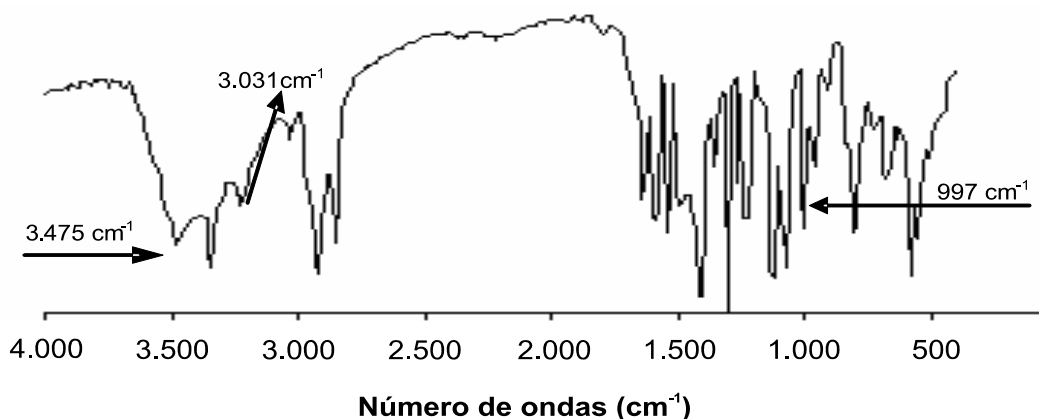


Figura 2 – Espectroscopia infravermelho de nanopartículas de prata obtidas pela nova metodologia.

De acordo com o trabalho de Wang *et al.* (2008), nanopartículas de prata apresentam picos característicos nas frequências de 3.400, 3.140, 1.600, 1.364 e 1.000 cm^{-1} (Figura 3). Bandas próximas aos picos característicos apareceram no espectro das nanopartículas obtidas pela nova síntese (3.475,62, 3.031,24 e 997,70 cm^{-1}), confirmando a presença de nanopartículas de prata na dispersão.

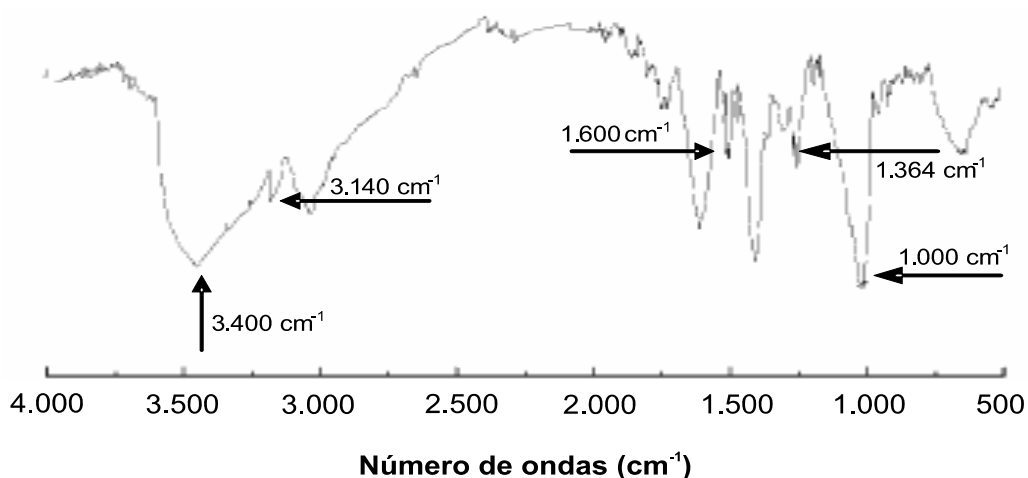


Figura 3 – Espectroscopia infravermelho de nanopartículas de prata, segundo Wang *et al.* (2008).

A atribuição destes picos às nanopartículas de prata sintetizadas pode ser reforçada quando se comparou os espectros das nanopartículas com os espectros dos reagentes empregados. Ao analisar os espectros percebeu-se que estas frequências características não foram detectadas para o Dotab e SAg. Além disso, notou-se que vários picos característicos destes dois reagentes

(Figura 4) apareceram no espectro das nanopartículas mostrando ser uma dispersão não pura. Nas nanopartículas de prata existiam dois picos fortes em torno da frequência de 2.849,98 e 2.920,23 cm^{-1} que foram atribuídos à estrutura do Dotab e são referentes a estiramento de C-H presentes na estrutura do Dotab. Foram perceptíveis também no espectro das nanopartículas dois picos cujas frequências eram 3.222 e 3.339,2 cm^{-1} que foram atribuídos à estrutura da SAg. Na Figura 5 estas informações podem ser mais bem visualizadas, uma vez que a região correspondente à faixa de frequência de 2.600 a 3.600 cm^{-1} foi ampliada.

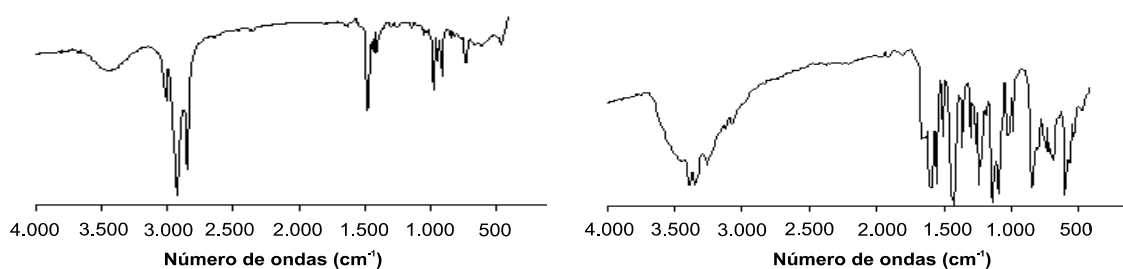


Figura 4 – Espectroscopia infravermelho do surfactante brometo de dodeciltrimetilamônio (A) e da sulfadiazina de prata (B).

Observou-se que na amostra de Dotab, existe uma banda vibracional relativamente larga variando de 3.300-3.568 cm^{-1} atribuída a estiramento de grupos funcionais OH presentes na molécula de água. As duas bandas estreitas 3.389 e 3.342 cm^{-1} que aparecem nesta região na amostra de SAg são relativas a compostos heteroaromáticos, como a pirazina, presente na estrutura da SAg (Figura 6) e representam modos de estiramentos de N – H. Estas bandas não estão presentes nas nanopartículas.

A síntese de nanopartículas de prata produzidas com adição de NaCl (0,1 M) ao meio teve como propósito desestabilizar a dupla camada elétrica da micela e observar a influência desta quebra de blindagem na síntese da nanopartícula, uma vez que a desestabilização da dupla camada elétrica favorece o acesso da sulfadiazina à micela. Observou-se que o sal não apresentou nenhuma contribuição relevante quanto ao tamanho das nanopartículas formadas, mas, sim, sobre a dispersão das mesmas.

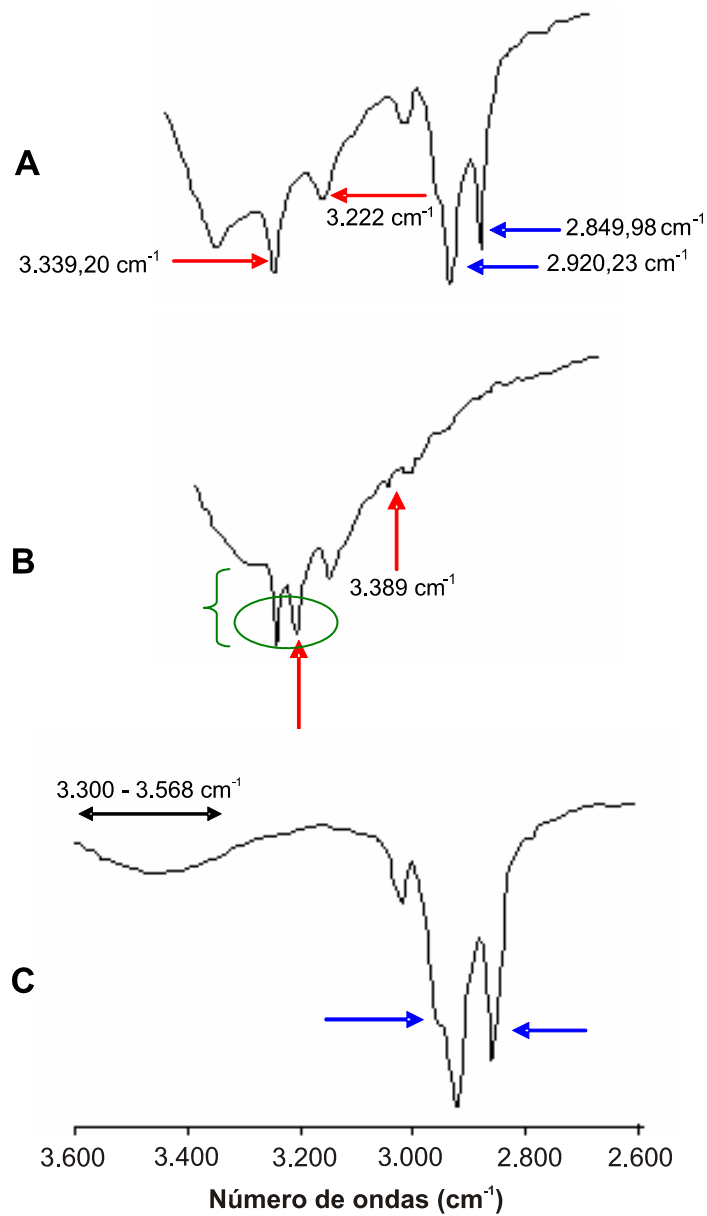


Figura 5 – Espectros de infravermelho na região de 2.600-3.600 cm^{-1} para (A) nanopartículas de prata; (B) sulfadiazina de prata; e (C) Dotab.

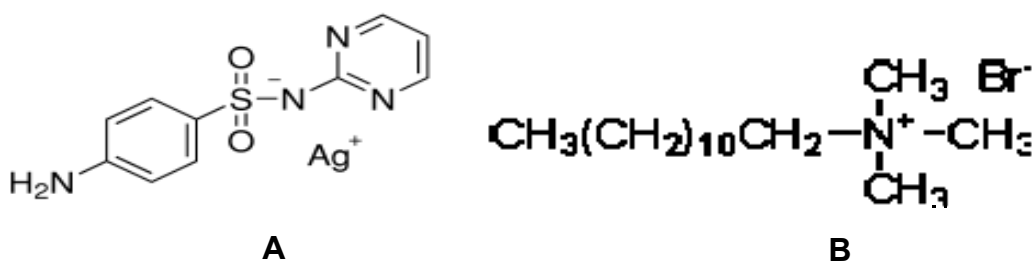


Figura 6 – Estrutura química da sulfadiazina de prata (A) e do brometo de dodeciltrimetilamônio (B).

O processo de adsorção de SAg nas micelas de Dotab é governada por um equilíbrio de troca entre a SAg e um monômero do surfactante livre. A entrada da SAg na micela ocorre por difusão controlada limitada por uma barreira eletrostática. Adição de eletrólitos diminui o potencial da superfície micelar, diminuindo o potencial eletrostático e, portanto, contribuindo para a adsorção de SAg nas micelas.

De acordo com Ranganathan *et al.* (1999), contra-íons, como no caso do sal adicionado, são atraídos pela carga oposta presente na micela e a efetiva captura dos contra-íons ocorre na parte externa da dupla camada difusa da micela a certa distância da superfície micelar (Figura 7). Por outro lado, os co-íons são repelidos pela superfície iônica carregada. Portanto, os contra-íons e co-íons chegam à micela por taxas de difusão limitadas controladas por atração ou repulsão dos íons pelo campo eletrostático da micela iônica.

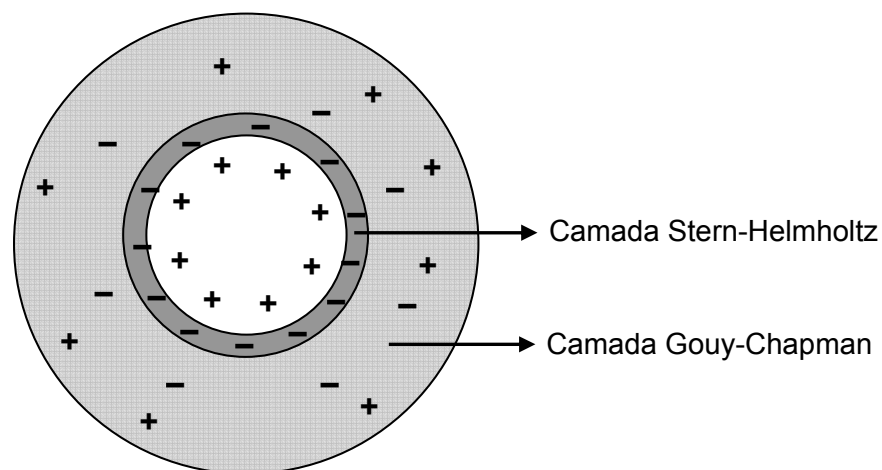


Figura 7 – Esquema de uma dupla camada elétrica.

Além da obtenção do espectro infravermelho mostrando a presença de nanopartículas de prata, foram utilizadas as análises de espalhamento de luz, difração de raios-X, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia de fluorescência, condutividade elétrica e tensão interfacial para a confirmação de nanopartículas de prata na dispersão produzida.

3.3. Espalhamento de luz

A Figura 8 mostra uma curva típica de função correlação da intensidade obtida por espalhamento dinâmico de luz para nanopartículas de prata. O diâmetro médio das nanopartículas de prata foi 2,8 nm (Tabela 2), quando a produção foi obtida da reação entre Dotab 2CMC e SAg (0,028M). Esse mesmo diâmetro foi observado quando a síntese ocorreu em meio com valores de pH ajustados para 3, 5, 7, 9, 11, 13 sugerindo que não há variação no mecanismo de síntese e nas nanopartículas obtidas. A linha contínua mostra o ajuste usando uma função exponencial (Figura 8 e Equação 8). O caráter difusivo dos espalhadores foi evidenciado a partir da análise de $\log \Gamma$ versus $\log q$, (Figura 9) onde se vê que os dados seguem a lei de potência $\Gamma \propto q^{-2}$. O coeficiente de autodifusão e os diâmetros foram obtidos pelo ajuste linear de Γ versus q^2 (Figura 10).

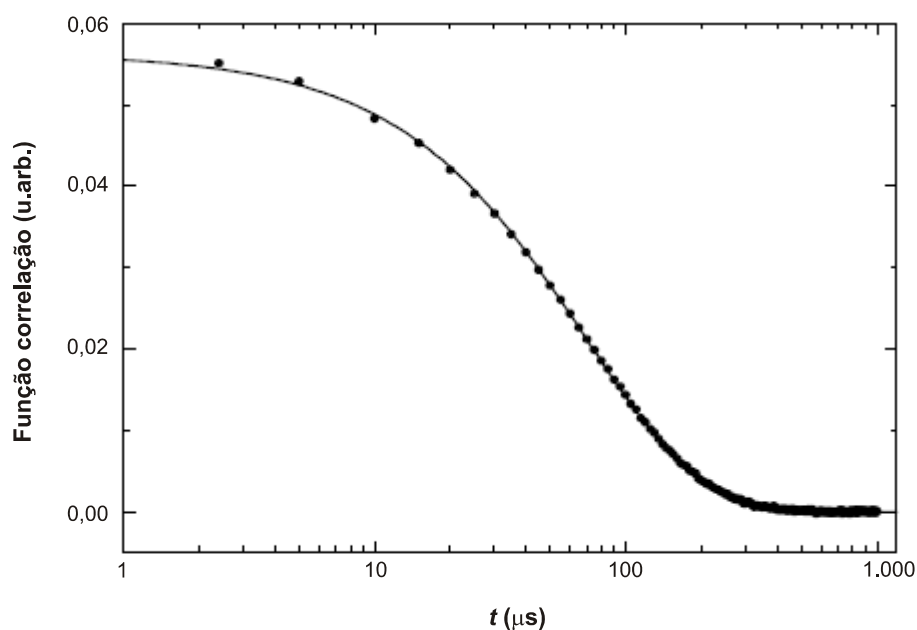


Figura 8 – Correlagrama típico para soluções com nanopartículas de prata. A linha contínua mostra o ajuste para uma distribuição estreita de partículas.

Tabela 2 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) das diferentes nanopartículas de prata

Nanopartículas de Prata	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)
Nanopartículas de prata (NP)	2,8
Nanopartículas de prata concentradas (NPC)	3,7
Nanopartículas de prata com adição de NaCl	4,4
Nanopartículas de prata sintéticas/Sigma	180,0
Nanopartículas de prata – método Turkevich	5,6 – 270,0

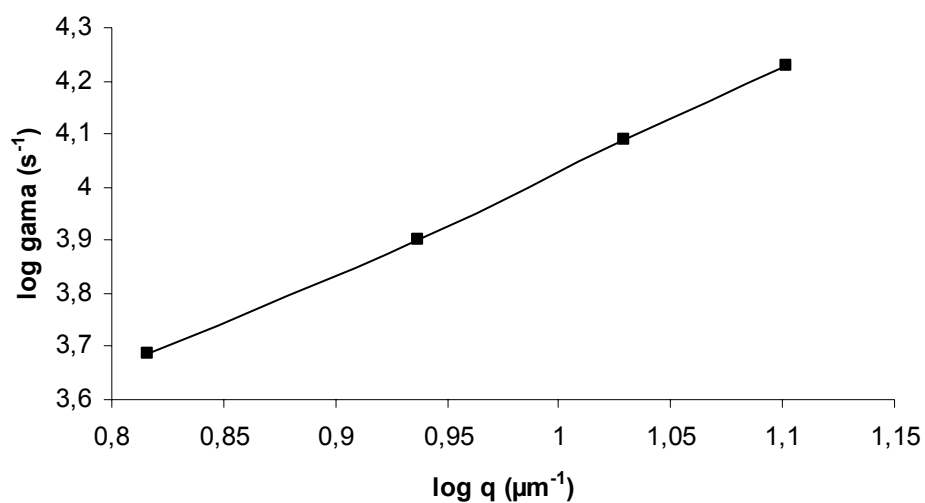


Figura 9 – Comportamento difusivo das nanopartículas.

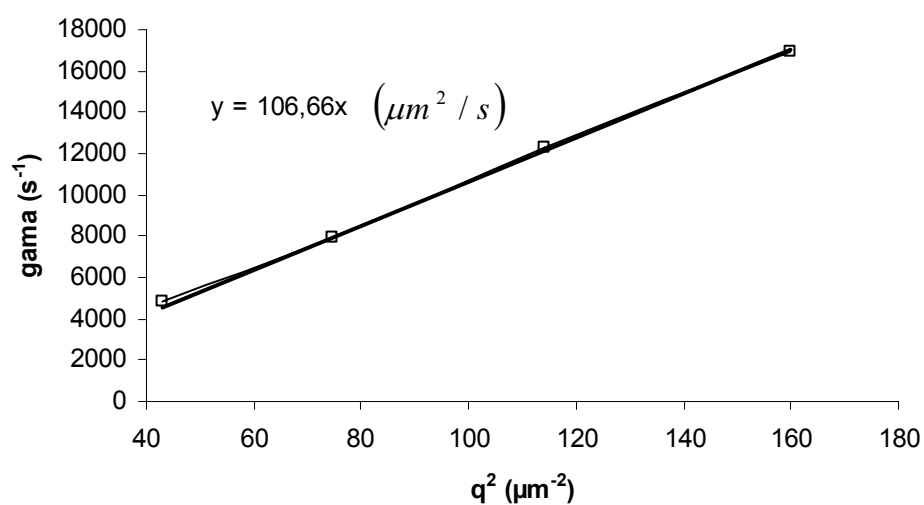


Figura 10 – Determinação do coeficiente de difusão (D) das nanopartículas.

No estudo de Panáček *et al.* (2006), a síntese de nanopartículas de prata coloidal foi realizada por meio de uma reação de oxirredução, em que sacarídeos eram os agentes responsáveis pela redução do complexo $(Ag(NH_3)_2)^+$. Os autores observaram que o pH influenciou o tamanho das nanopartículas formadas. O pH da reação era, aproximadamente, 12,5 e no experimento houve redução para pH 11,5 e aumento para pH 13,0. A variação do pH resultou em duas observações sobre o tamanho das nanopartículas. As partículas obtidas no pH 11,5 foram menores que as obtidas no pH 12,5, variando de 25 a 50 nm. Além disso, houve redução na distribuição do tamanho quando ocorreu abaixamento do pH. Portanto, neste estudo a variação do pH permitiu sintetizar partículas menores. Entretanto houve ampla faixa de variação na distribuição do tamanho.

Em nosso trabalho, as nanopartículas concentradas apresentaram diâmetro médio de 3,7 nm e outras duas populações com diâmetros maiores (115 e 180 nm). Estas populações maiores detectadas são provenientes de contaminação do solvente com poeira do ar que facilmente foi absorvida pela água, interferindo nos resultados. Já as nanopartículas com adição de NaCl na síntese apresentaram diâmetro de 4,4 nm. Novamente foi verificada uma relação direta entre Γ e o vetor de espalhamento ao quadrado demonstrando a confiabilidade dos resultados do espalhamento.

As nanopartículas sintéticas/Sigma apresentaram diâmetro médio de 180 nm e as nanopartículas obtidas pelo método Turkevich, observou-se presença de duas populações, sendo uma com diâmetro de 5,6 nm e a outra possuindo diâmetro em uma ampla faixa com variação de 50 a 270 nm (Tabela 2).

3.4. Difração de Raios-X

As Figuras 11 e 12 mostram os difratogramas de raios-X para as nanopartículas de prata produzidas pela nova síntese e para as nanopartículas sintéticas/Sigma. As setas indicam a posição dos picos de difração mais intensos característicos da prata.

O tubo de raios-X utilizado possui um alvo de cobalto, produzindo um comprimento de onda de 1,788 Å. Desta forma, para cristais de prata com a

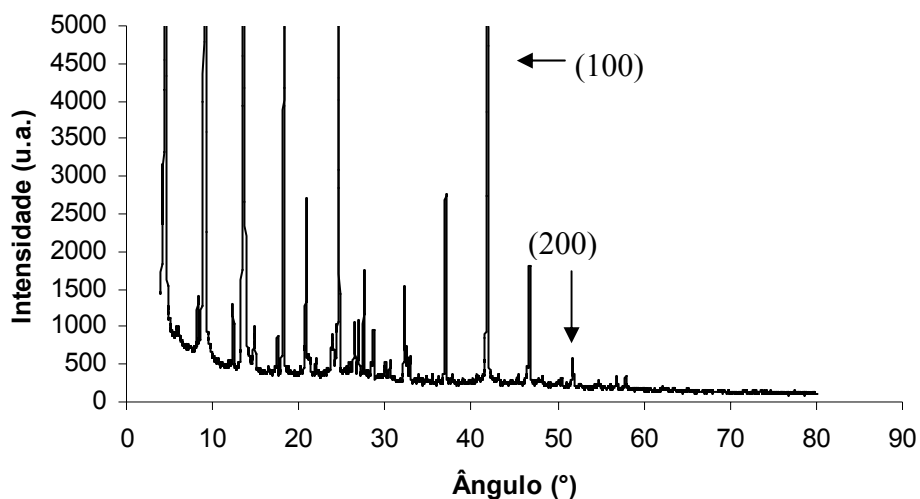


Figura 11 – Difratoograma de raios-X para nanopartículas de prata obtidas por nova síntese.

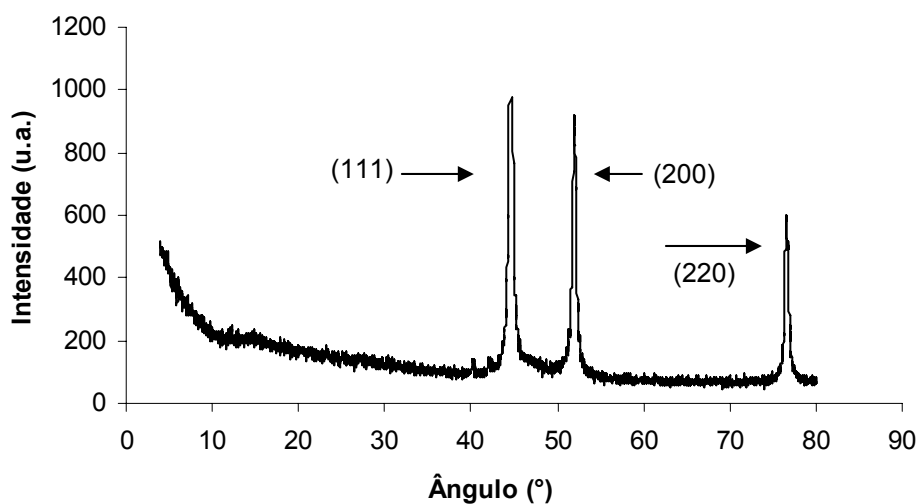


Figura 12 – Difratoograma de raios-X para as nanopartículas de prata sintéticas/ Sigma.

estrutura cristalina cúbica, o pico mais intenso está associado ao plano cristalino (111), ocorrendo para o ângulo de $44,57^\circ$, que pode ser obtido pela equação 13, onde d é a distância interplanar correspondente.

$$2d\sin\theta = \lambda \quad (13)$$

Os dois picos menos intensos correspondem à difração dos planos (200) e à (220), que ocorrem nos ângulos de $51,90^\circ$ e $76,49^\circ$, respectivamente. A

prata pode também assumir uma estrutura hexagonal, para a qual os picos de difração mais intensos ocorrem nos ângulos de $41,93^\circ$ e $53,13^\circ$, para os planos (100) e (103), respectivamente. Pode-se observar que as nanopartículas de prata produzidas com Dotab e SAg apresentaram pico característico em $51,9^\circ$ relacionado ao plano (200) e em $41,93^\circ$ relacionado ao plano (100).

É importante enfatizar que os picos de difração correspondentes aos planos (111), (200) e (220) foram mais marcantes no difratograma das nanopartículas sintéticas/Sigma. Esta intensidade forte foi favorecida pela pureza destas nanopartículas, uma vez que este é um produto comercial com 99,5 % de pureza. No caso das nanopartículas produzidas pela nova síntese, a baixa pureza foi provável causa de intensidades mais fracas como, por exemplo, para o plano dos cristais de prata (111). Como a dispersão não era pura, o difratograma apresentou também, os picos correspondentes ao surfactante Dotab e à SAg que são os componentes necessários para a produção das nanopartículas (Figuras 13 e 14). Portanto, os demais picos do difratograma das nanopartículas correspondem à difração do surfactante e da SAg.

Fragalà *et al.* (1999) estudaram e caracterizaram agregados de prata em filmes de matrizes poliméricas e utilizaram difração de raios-X (XRD) para confirmar a presença de prata metálica. Neste estudo, o tubo apresentava alvo de cobre, produzindo um comprimento de onda de radiação de $1,54 \text{ \AA}$. Observou-se presença de pico mais intenso para o plano (111) em ($2\theta = 38,1^\circ$), enquanto os picos menos intensos foram associados à difração em $44,36^\circ$ para o plano (200) e em $77,54^\circ$ para o plano (311). Também foi observada difração menos intensa (27%) em $64,17^\circ$ correspondente ao plano (220). Oxidação parcial de partículas metálicas foi verificada, provavelmente devido à contaminação com ar ou interação com oxigênio da matriz polimérica. No entanto, nenhuma quantidade apreciável de óxido de prata foi detectada.

Jing *et al.* (2009) sintetizaram nanopartículas por redução química de nitrato de prata em líquido iônico à temperatura ambiente e a análise de difração de raios-X revelou estrutura cristalina para as nanopartículas elaboradas. Ele identificou os mesmos planos (111), (200), (220), (311), além do plano (222), que ocorre para o ângulo $81,54^\circ$. Todos esses picos podem ser indexados à prata cúbica e indica que as nanopartículas preparadas em líquido iônico não mudaram a estrutura cristalina da prata pura.

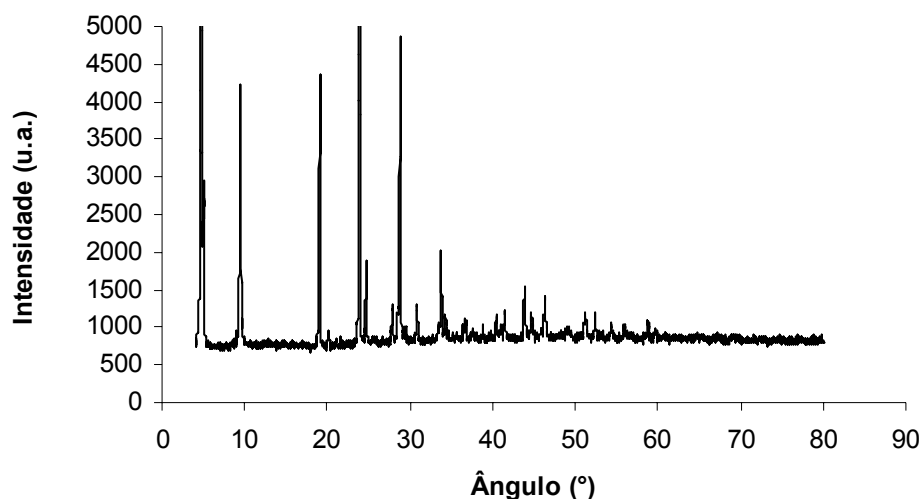


Figura 13 – Difratoograma de raios-X para o surfactante Dotab.

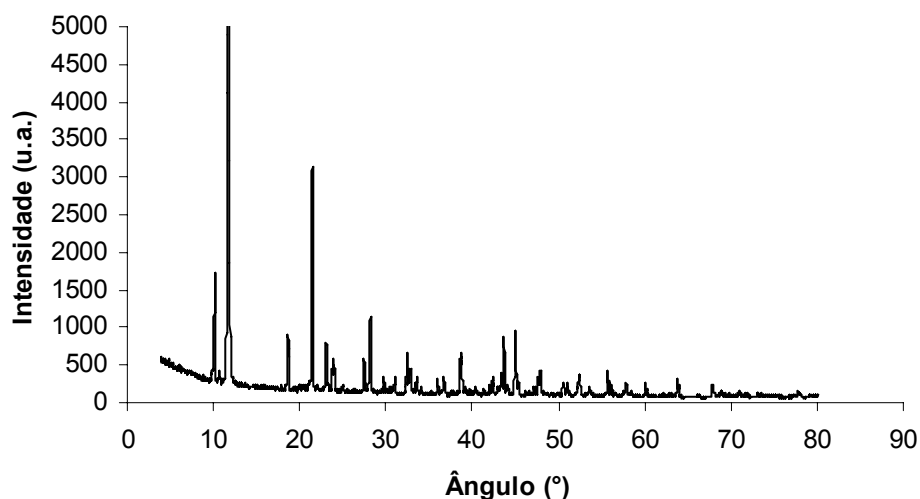


Figura 14 – Difratoograma de raios-X para sulfadiazina de prata.

Os resultados das medidas de difração de raios-X confirmaram a presença das nanopartículas de prata, que pôde ser reforçada com as demais análises realizadas. Além disso, indicam a coexistência de partículas com estrutura cúbica e hexagonal. Uma interpretação mais detalhada destes resultados é dificultada pela pequena concentração de cristais de prata no produto do processo. Uma proposta para aumentar a intensidade do sinal da prata e eliminar os outros picos seria purificar a dispersão obtida a fim de obter um concentrado de nanopartículas.

3.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O tamanho médio das nanopartículas produzidas com adição ou não de NaCl no processo determinado pela microscopia foi de 10 nm. O tamanho das nanopartículas observado com a MET foi diferente da observada pelo espalhamento dinâmico de luz, uma vez que o preparo das amostras para a visualização no microscópio de transmissão promove uma agregação das nanopartículas na etapa de secagem da amostra sobre a grade. Os resultados de MET de Guzmán *et al.* (2009) indicaram que as nanopartículas consistiam de aglomerados de pequenos grãos com diâmetro médio entre 9 e 11 nm. Entretanto, em algumas partículas o diâmetro foi maior que 60 nm, devido também a agregação ocorrida durante o preparo da amostra sobre a grade.

Observou-se que a adição de NaCl no preparo das nanopartículas promoveu melhor dispersão das mesmas, o que não foi verificado nas nanopartículas sem adição de NaCl, em que se percebeu aglomeração dos grãos de nanopartículas de prata. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão apresentadas na Figura 15 mostram a dispersão promovida pelo sal e indicam que são partículas esféricas.

Basavaraja *et al.* (2008) produziram nanopartículas de prata por processo biológico utilizando o fungo *Fusarium semitectum* para a síntese extracelular de nanopartículas de prata a partir de uma solução de nitrato de prata. O mecanismo sugerido para a redução de Ag^+ para Ag^0 é decorrente da participação da enzima redutase dependente de NADH. Por meio da técnica MET, os autores observaram que houve variação no tamanho das partículas de 8 a 60 nm, sendo que 30% das nanopartículas mediram 25 nm. As imagens MET sugeriram que as nanopartículas são polidispersas e a maioria é esférica.

Liu *et al.* (2007) desenvolveram um método para produção de nanopartículas de prata baseado em uma reação de fase aquosa-gasosa composta de solução de nitrato de prata e gás amônia. Segundo os autores, trata-se de um método efetivo, rápido e conveniente. A MET foi aplicada para caracterizar as estruturas das nanopartículas e observaram que o diâmetro das partículas foi, aproximadamente, 10 nm e a morfologia esférica.

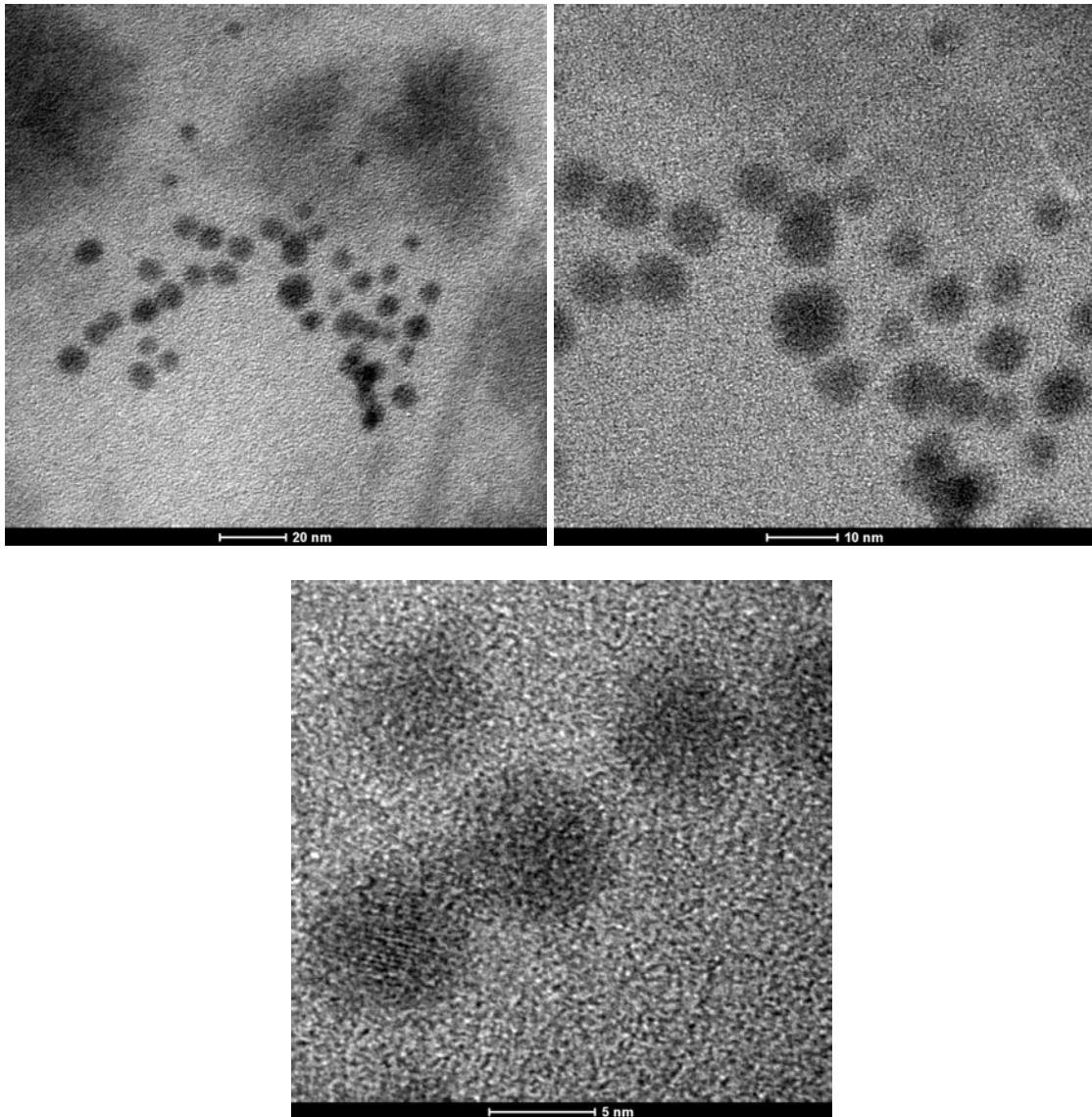


Figura 15 – Nanopartículas sintetizadas com adição de NaCl (0,028 M) ao meio.

3.6. Espectroscopia de fluorescência

As curvas de fluorescência obtidas para nanopartículas com NaCl, concentradas e sintéticas/Sigma apresentaram comportamento similar e por isso possuem o mesmo tipo de partícula presente na dispersão com, aproximadamente, o mesmo tamanho (Figura 16), ou seja, este resultado também confirmou a presença de nanopartículas de prata na dispersão analisada. Já as nanopartículas de prata obtidas pelo método Turkevich não apresentou nenhum sinal de fluorescência. Esse resultado foi contraditório quando comparado ao resultado do espalhamento de luz para essas

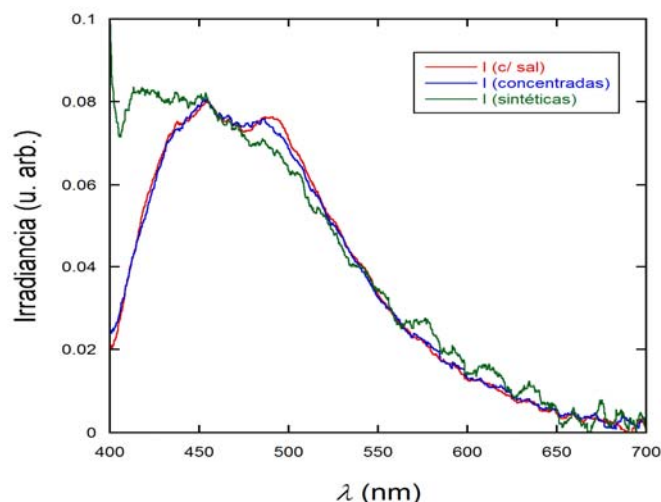


Figura 16 – Curvas sobrepostas de fluorescência das nanopartículas de prata com adição de NaCl no processo, concentradas e sintéticas/Sigma.

nanopartículas, onde se encontrou duas populações, sendo uma de diâmetro médio de 5,6 nm das quais esperava ter apresentado característica de fluorescência. Portanto, sugere-se investigação mais detalhada destas nanopartículas para tentar esclarecer estes resultados.

A análise de espalhamento de luz mostrou que para as nanopartículas sintéticas/Sigma, o tamanho foi maior quando comparado ao tamanho das demais nanopartículas (Figura 17), onde é possível perceber sinal mais fraco para esta nanopartícula, indício de presença de poucas partículas pequenas na dispersão, uma vez que é sabido que a fluorescência ocorre mais intensamente quanto menor for o tamanho nanométrico das partículas. As curvas para as nanopartículas de prata concentradas e com adição de NaCl durante a síntese apresentaram emissões mais intensas na ordem de comprimentos de onda de 450-500 nm quando a excitação ocorreu no comprimento de onda de 374 nm. A fluorescência dos reagentes sulfadiazina de prata e do surfactante Dotab foi também realizada e confirmou-se que a fluorescência emitida era mesmo proveniente das nanopartículas, uma vez que ambos os reagentes não apresentaram nenhuma fluorescência.

É importante mencionar que a capacidade de fluorescência das nanopartículas é decorrente da presença de níveis quânticos bem definidos. A luz UV incide sobre as nanopartículas de prata promovendo uma excitação eletrônica em níveis quânticos de maior energia. Quando espontaneamente

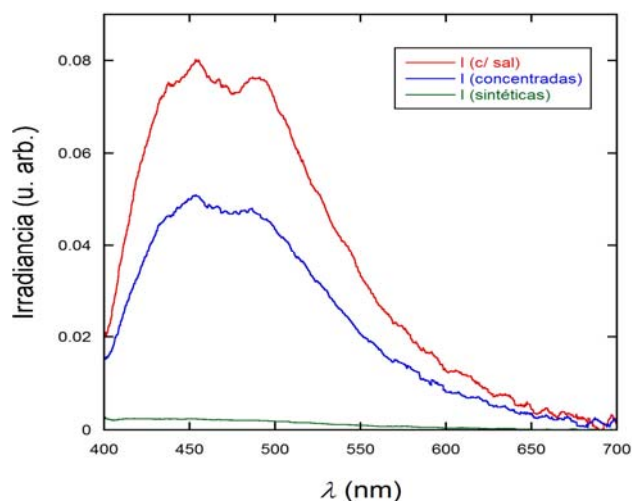


Figura 17 – Fluorescência das nanopartículas com NaCl, concentradas e sintéticas/Sigma cuja altura foi normalizada pela intensidade do LED (Light emitting diode).

ocorre o retorno em níveis quânticos intermediários há a absorção de fluorescência em diferentes comprimentos de onda. Se a nanopartícula é muito grande, esta passa a se comportar como uma banda de condução e deste modo não emite fluorescência, uma vez que não há níveis quânticos bem definidos. Portanto, a fluorescência é maior em nanopartículas menores onde se tem maior variação de energia entre os níveis quânticos ($\Delta E = h \cdot \nu$, em que $h\nu$ é a energia do fóton incidente, sendo $h =$ constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s e ν (Hz) = frequência de radiação eletromagnética).

3.7. Condutividade elétrica

A condutividade do sistema micelar do Dotab até a concentração igual a 0,0624 M foi moderadamente maior quando comparada à condutividade da mistura Dotab e SAg (0,028 M) e após esta concentração de Dotab não houve variação nos valores de condutividade (Figura 18). Esta redução na condutividade deveu-se provavelmente à redução dos íons Ag^+ para Ag^0 , ou seja, com a formação das nanoestruturas, e à diminuição dos graus de ionização das micelas, devido à adsorção de moléculas de SAg na interface micelar.

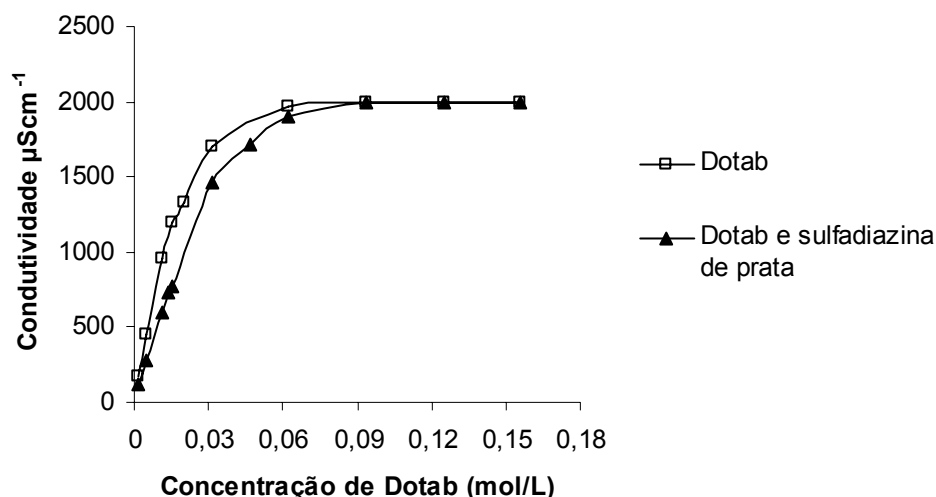


Figura 18 – Condutividade elétrica do surfactante Dotab e da mistura de Dotab e sulfadiazina de prata.

3.8. Tensão interfacial

Observou-se ligeira redução na concentração micelar crítica na presença de SAg na solução de Dotab (Figura 19). Pode-se dizer que a SAg estabilizou a micela, uma vez que esta foi formada em concentração micelar crítica menor. Além disso, a SAg incorporou na micela sem alterar suas características. De acordo com a equação 12 é possível calcular o número de monômeros adsorvidos na interface com a presença e sem a presença de SAg. O número de monômeros por unidade de área adsorvidos foi similar para as duas condições, sendo $1,44 \times 10^8$ monômeros quando havia na mistura SAg (0,028M) e Dotab ($1,56 \times 10^{-2}$ M) e $1,49 \times 10^8$ monômeros quando na presença apenas do surfactante ($1,56 \times 10^{-2}$ M).

$$\Gamma = \frac{RT}{C} \cdot \frac{d\gamma}{dC} \quad (\text{Equação 12})$$

em que Γ representa o número de monômeros adsorvidas na interface, R constante dos gases (8,3144 J/K/mol), T é a temperatura em Kelvin, C refere-se à concentração do surfactante e $\frac{d\gamma}{dC}$ refere-se à derivada da curva obtida de tensão interfacial versus concentração de Dotab.

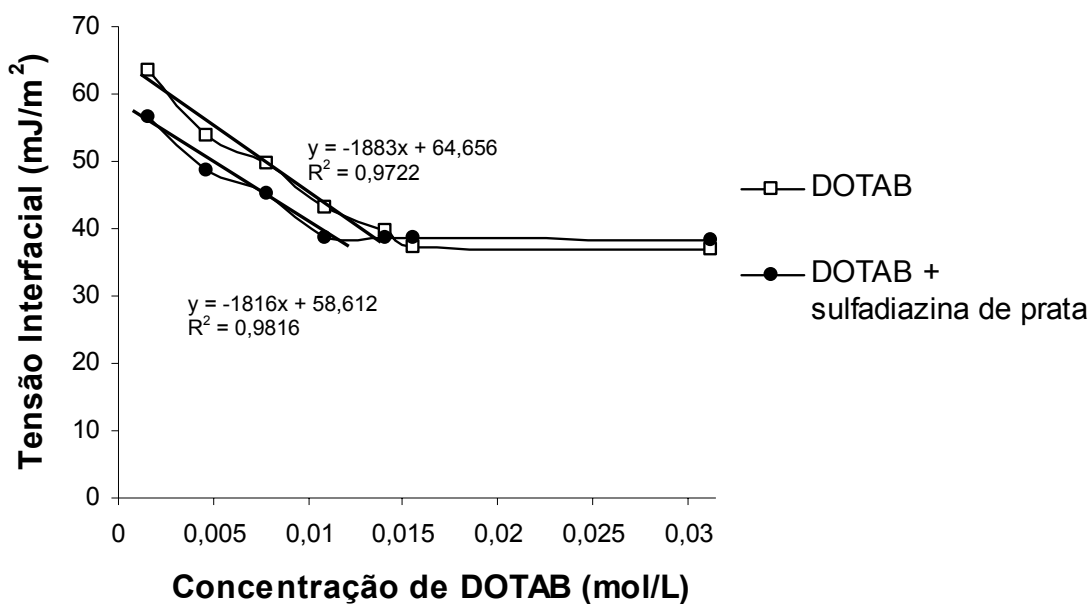


Figura 19 – Medidas de tensão interfacial para solução de Dotab e da dispersão de SAg em Dotab.

3.9. Mecanismo proposto de formação de nanopartículas

A formação de nanopartículas pelo novo método de interação entre o surfactante Dotab e a SAg é um processo de catálise micelar. Observou-se que abaixo da CMC, e concentração de 0,028M de SAg nanopartículas não foram formadas. Diante dos resultados da espectroscopia de absorção atômica foi possível observar que à medida que se aumentou a concentração de Dotab e mantendo constante a concentração de SAg houve aumento na quantidade de nanopartículas formadas, enfatizando portanto, a contribuição das micelas do surfactante no processo de síntese de nanopartículas.

A Figura 20 sugere um mecanismo de formação das nanopartículas de prata. Acredita-se que na síntese ocorra auto-oxirredução da molécula de sulfadiazina sendo a prata reduzida de Ag^+ para Ag^0 e a pirazina (composto heteroaromático) oxidada e toda a reação ocorre no interior da micela de Dotab. Como já foi mencionado é uma reação catalisada pelas micelas com formação de nanopartículas e produto oxidado. Este produto decomposto provavelmente refere-se à pirazina, uma vez que não houve bandas vibracionais no espectro das nanopartículas que a caracterize como as bandas (3.389,91, 3.342,63 e 3.072,79) presentes na amostra de sulfadiazina.

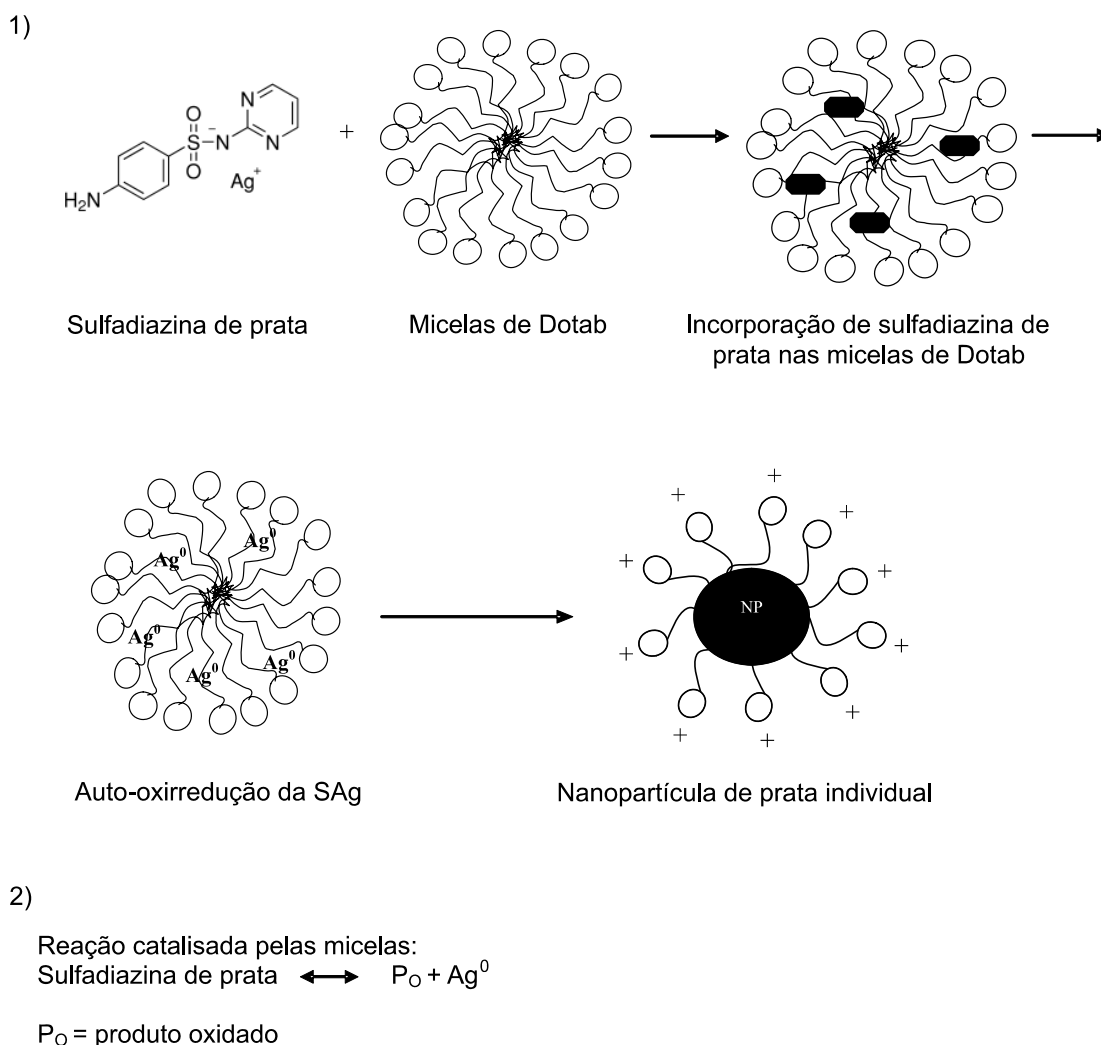


Figura 20 – Mecanismo proposto de formação de nanopartículas de prata

Pelo espectro de infravermelho, percebeu-se também que a parte da molécula correspondente à amina aromática ligada ao enxofre permaneceu intacta após a formação das nanopartículas. Esta afirmativa é correta, uma vez que o pico intenso referente à frequência de 1.419 cm^{-1} na molécula de SAg apareceu no espectro das nanopartículas na frequência de $1.413,35\text{ cm}^{-1}$ e é corresponde a ligação de C-S que ocorre no anel benzênico desta amina aromática. Além disso, esta banda também está contida na faixa de $1.300\text{--}1.600\text{ cm}^{-1}$ representando estiramento e contração de todas as ligações presentes no anel. Na amostra de Dotab não foi observado sinal nesta frequência (Figura 21).

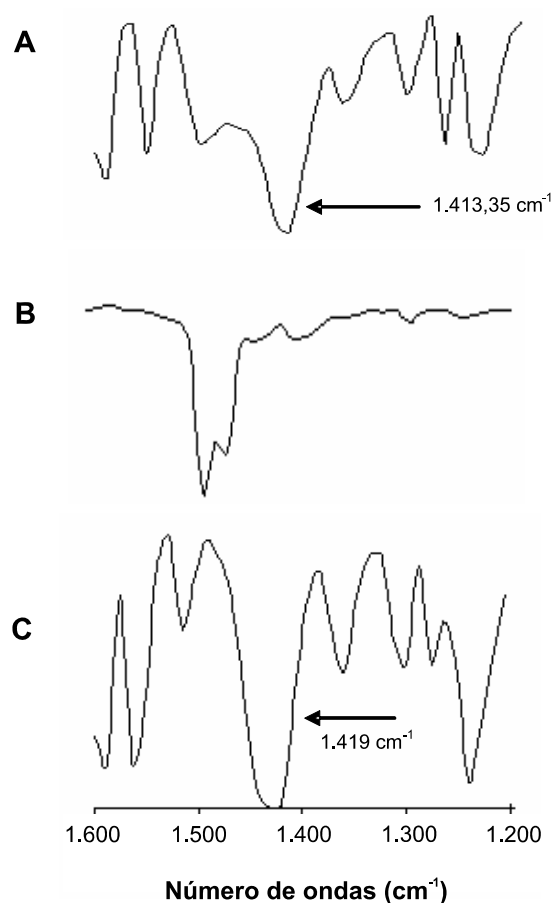


Figura 21 – Espectros de infravermelho na região de 1.200-1.600 cm^{-1} para (A) nanopartículas de prata; (B) Dotab e (C) sulfadiazina de prata.

As ligações S - O presentes na estrutura da SAg permaneceram intactas após a formação das nanopartículas, sendo comprovada pela observação da região de 500-550 cm^{-1} nos espectros da SAg e das nanopartículas (Figura 22), onde estão presentes os picos característicos referentes às vibrações destas ligações. Percebe-se que estas bandas vibracionais não estavam presentes no espectro do Dotab. Poderia se pensar que a molécula de SAg permaneceu intacta, no entanto quando se verificou a região de 3.000-3.600 cm^{-1} observou-se que CINCO bandas que apareceram no espectro da SAg não estavam presente no espectro das nanopartículas.

Outras frequências ocorridas nos espectros apresentados, por exemplo, na faixa de 675-900 cm^{-1} são decorrentes de bandas informativas de compostos aromáticos como os presentes na SAg. No caso da molécula de Dotab, a identificação de picos na faixa de 1020-1250 cm^{-1} representa vibrações de deformação angular de C - H.

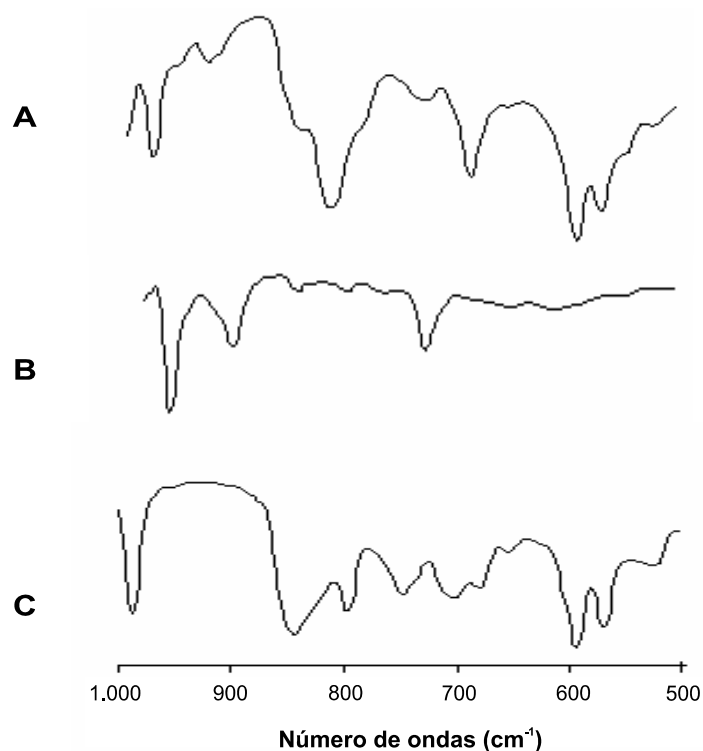


Figura 22 – Espectros de infravermelho na região de 500-1.000 cm^{-1} para (A) nanopartículas de prata; (B) Dotab e (C) sulfadiazina de prata.

Acredita-se que as nanopartículas de prata produzidas estão contidas nas micelas do Dotab e pode conter parte da molécula, produzida pela decomposição de SAg, adsorvida na interface. A presença de Dotab promove estabilidade para essas nanopartículas diminuindo a taxa de crescimento das nanopartículas sintetizadas por meio de repulsão eletrostática.

4. CONCLUSÃO

Todas as análises físico-químicas realizadas confirmaram a presença de nanopartículas de prata na dispersão produzida pela nova síntese, cujo método é simples e rápido. A reação envolvida no processo é de auto-oxirredução da sulfadiazina de prata catalisada pela presença de micelas de Dotab. O surfactante presente pode contribuir também para a estabilidade das nanopartículas de prata.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BASAVARAJA, S.; BALAJI, S. D.; LAGASHETTY, A.; RAJASAB, A. H.; VENKATARAMAN, A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. **Materials Research Bulletin**, v. 43, p. 1164-1170, 2008.

DALLAS, P.; NIARCHOS, V. D.; BOUKOS, N.; PEJOVNIK, S.; TRAPALIS, C.; PETRIDIS, D. Interfacial polymerization of pyrrole and in situ synthesis of polypyrrole/silver nanocomposites. **Polymer**, v. 48, p. 2007-2013, 2007.

DAY, P. Room at the bottom. **Chemistry in Britain**, v. 32, n. 7, p. 29, 1996.

FERNANDES, P. E. **Novo método de síntese de nanopartículas de prata e avaliação de seu efeito antimicrobiano**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2010.

FRAGALÀ, M. E.; COMPAGNINI, G.; MALANDRINO, G.; SPINELLA, C.; PUGLISI, O. Silver nanoparticle dispersed in polyimide thin film matrix. **The European Physical Journal D**, v. 9, p. 631-633, 1999.

GUZMÁN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 3, p. 104 -111, 2009.

JIAN, Z.; XIANG, Z.; YONGCHANG, W. Electrochemical synthesis and fluorescence spectrum properties of silver nanospheres. **Microelectronics Engineering**, v. 77, p. 58-62, 2005.

JIAN, Z.; YONGCHANG, W.; YIMIN, L. Fluorescence spectra character of silver-coated gold colloidal nanoshells. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p. 155-161, 2004.

JING, A. N.; DE-SONG, W.; XIAO-YAN, Y. Synthesis of stable silver nanoparticles with antimicrobial activities in room-temperatures ionic liquids. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 25 (4), p. 421-425, 2009

KIM, Y. H.; LEE, D. K.; KANG, Y. S. Synthesis and characterization of Ag and Ag-SiO₂ nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 257-258, p. 273-276, 2005.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. **Annual Review of Physical Chemistry**, v.54, p. 331-366, 2003.

LIU, C.; YANG, X.; YUAN, H.; ZHOU, Z.; XIAO, D. Preparation of silver nanoparticle and its application on the determination of *ct*-DNA. **Sensors**, v. 7, p. 708 - 718, 2007.

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 Antimicrobial Agents**, v. 34, p.103-110, 2009.

MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. **Annual Review Materials Science**, v.30, p. 545-610, 2000.

MURUGADOSS, A.; CHATTOPADHYAY, A 'green' chitosan–silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst. **Nanotechnology** 19, 2008.

OLIVEIRA, M. M. **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades**. 2005. Doutorado (Pós Graduação em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR, 2005.

PANÁČEK, A.; KVÍTEK, L.; PRUCEK, R.; KOLÁR, M.; VECEROVÁ, R.; PIZÚROVÁ, N.; SHARMA, V. K.; NEVECNÁ, T.; ZBORIL, R. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 16248-16253, 2006.

PATAKFALVI, R.; PAPP, S.; DÉKÁNY, I. The Kinetics of homogeneous nucleation of silver nanoparticles stabilized by polymers. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, p. 353-364, 2007.

PECORA, R. **Dynamic light scattering** – applications of photon correlation spectroscopy. New York: Plenum Press, 1985. Chapter 8, p. 305,

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

RANGANATHAN, R.; OKANO, L. T.; YIHW, C.; ALONSO, E. O.; QUINA, F. Salt effects on the dynamic of incorporation of organic coions into micelles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, p. 1977-1981, 1999.

STAROWICZ, M.; STYPUTA, B.; BANÁS, J. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 227-230, 2006.

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

WANG, W.; GU, B. **Preparation and characterization of silver nanoparticles at high concentrations**. American Chemical Society, Chapter 1, 2004.

YIN, H.; YAMAMOTO, T.; WADA, Y.; YANAGIDA, S. Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. **Materials Chemistry and Physics**, v. 83, p. 66-70, 2004.

CAPÍTULO 2

EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

RESUMO

A prata desperta interesse na comunidade científica em virtude de sua ação reconhecida como agente antimicrobiano e em razão da necessidade de desenvolvimento de sínteses de novos antimicrobianos, visto o aumento no número de bactérias resistentes a antibióticos. Além disso, a prata é o metal que apresenta a menor toxicidade para as células animais. Neste contexto, este trabalho apresenta como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata obtidas por diferentes metodologias sobre as espécies *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella Choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, bem como avaliar a capacidade destas nanopartículas em removerem células vegetativas aderidas em superfícies de aço inoxidável. Observou-se que as nanopartículas de prata (NP) obtidas pela metodologia proposta por Fernandes (2010), nanopartículas de prata concentradas (NPC) e nanopartículas de prata com adição de cloreto de sódio (NPNaCl) possuíram maior atividade antimicrobiana ($p < 0,05$) que os seguintes tratamentos: surfactante brometo de dodeciltrimetilamônio (Dotab), nanopartículas de prata sintéticas/Sigma (NPS) e nanopartículas de prata obtidas pelo método Turkevich (NPT). Verificou-se também que a condição mais eficaz para remoção de células de *Pseudomonas aeruginosa* em cupons de aço inoxidável (10 mm x 10 mm) foi quando as

superfícies foram imersas em NPC e NPS. Os tratamentos NPC e NPS atingiram cinco reduções decimais (RD) na população microbiana tanto para 30 minutos quanto para 60 minutos de imersão dos cupons nestas nanopartículas. O desempenho das NPC e das NPS também foi melhor quando comparado à atuação das NPT, do carbonato de sódio e da água na remoção de células de *Bacillus cereus* em cilindros de aço inoxidável (área interna de 336,5 cm²). Sugere-se, portanto, a aplicação de nanopartículas de prata obtidas pela nova síntese como um antimicrobiano para a indústria de alimentos, com atuação, por exemplo, na sanitização de utensílios que entrarão em contato com os alimentos.

1. INTRODUÇÃO

O efeito antimicrobiano da prata foi quantificado pela primeira vez por *Von Naegelis* contra algas, na forma de íons de prata. Em documentos científicos do fim do século 18, o uso de colóides de prata, ou seja, partículas nanométricas em solução com tamanho variando de 10^{-9} m a 10^{-6} m foi relatado, sendo seu uso intensificado entre 1910 e 1920 (KEY; MASS, 2001). Além da prata, muitos outros metais foram estudados, resultando na seguinte escala de toxicidade contra micro-organismos: Ag > Hg > Cu > Cd > Pb > Co > Au > Zn > Fe > Mn > Mo > Sn. Adicionalmente, a prata é o metal que apresenta a menor toxicidade para as células animais (NETO *et al.*, 2008).

Tanto a Agência de Proteção Ambiental (EPA) quanto a Organização Mundial da Saúde (WHO) consideram a prata segura para o organismo humano em determinadas concentrações. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1987), doses de 5 mg/kg de prata são aceitáveis com baixa probabilidade de riscos para a saúde, sendo a dose limite de 14 mg/kg. Como efeitos colaterais que a ingestão de prata em altas concentrações pode ocasionar, estão problemas neurológicos, renais, indigestão, dores de cabeça e a argiria, patologia que causa o azulamento da pele.

O efeito antimicrobiano da prata tem sido reconhecido há muitos anos. Na antiguidade, a prata era utilizada em recipientes de água e também na prevenção de deterioração de líquidos e alimentos. Em 1884, gotas de nitrato de prata foram introduzidas como tratamento profilático em olhos de recém-

nascidos para prevenir infecções causadas por *Neisseria gonorrhoeae* transmitida durante o parto por mães infectadas (RODRIGUEZ *et al.*, 2007). Os íons de prata eram geralmente utilizados no tratamento de queimaduras e como agentes quimioterápicos contra patologias provocadas por bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Em 1940, após a descoberta da penicilina, e sua introdução na medicina, o uso da prata como agente bactericida diminuiu. Entretanto, com a descoberta de antibióticos houve seleção de cepas resistentes a antibióticos. Portanto, atualmente, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em razão da necessidade de desenvolvimento de sínteses de novos antimicrobianos (CHOPRA, 2007).

Atualmente, materiais em nanoescala têm emergido como novos antimicrobianos. O termo “nano” é usado para indicar a bilionésima parte de um metro ou 10^{-9} . As nanopartículas são agrupamentos de átomos com tamanho variando de 1-100 nm (RAI *et al.*, 2009). O uso de nanopartículas de prata como agente antibacteriano é relativamente novo e sua atividade pode ser aplicada na medicina para reduzir infecções, bem como prevenir colonização bacteriana em superfícies de prótese, cateteres, materiais odontológicos e na indústria de alimentos em superfícies de aço inoxidável. Podem ser empregadas também no controle microbiano em têxteis e no tratamento de água (GUZMÁN *et al.*, 2009). Na síntese das nanopartículas de prata, deve-se dar ênfase no controle do tamanho das partículas, pois o efeito bactericida é influenciado pelas dimensões da partícula, tendo as menores partículas os melhores efeitos (SHAHVERDI *et al.*, 2007).

Os mecanismos de ação de íons e das nanopartículas de prata sobre micro-organismos ainda não são bem estabelecidos e diferenciados. Alguns mecanismos têm sido propostos e aceitos para os íons de prata. Acredita-se que ocorra ligação extracelular ou precipitação de prata na parede e membrana celular (BELLANTONE *et al.*, 2002). A parede celular contém peptidoglicano carregado negativamente que provavelmente irá interagir eletrostaticamente com alguns íons Ag^+ . A prata poderá interagir com proteínas celulares, incluindo enzimas por meio de grupos sulfidrílicos (-SH) levando à inativação das proteínas e, conseqüentemente, das bactérias. Estas enzimas são chaves e participam da geração de energia transmembrana e transporte de íons podendo

levar ao bloqueio da respiração e da transferência de elétrons (FENG *et al.*, 2000; KLUEH *et al.*, 2000). Outra ação proposta refere-se à interação da prata com o ácido desoxirribonucléico (DNA) por meio de deslocamento das ligações de hidrogênio entre as bases purina e pirimidina impedindo a replicação do DNA. Por último é também aceito que a prata se liga a grupos doadores de elétrons, como aminas, hidroxilas e fosfatos que contêm nitrogênio, oxigênio e enxofre (RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

Já as nanopartículas de prata apresentam propriedades antimicrobianas eficientes, em virtude de sua grande área superficial que proporciona melhor contato com as bactérias. As nanopartículas conseguem aderir à membrana celular e penetrar na célula. A membrana bacteriana contém proteínas compostas de enxofre, e as nanopartículas assim como os íons de prata, interagem com estas proteínas nas células bem como com os compostos contendo fósforo como o DNA. As nanopartículas também liberam íons de prata que aumentam sua atividade antimicrobiana (MORONES *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2006).

Feng *et al.* (2000) conduziram um estudo para observar os efeitos de íons de prata em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Eles trataram as células com AgNO_3 e observaram os efeitos morfológicos e estruturais dos íons de prata nas células. Segundo os autores, as células expostas aos íons Ag^+ ativaram resposta ao estresse que conduziram a condensação de DNA no centro da célula. Eles observaram também que as membranas destacaram-se da parede celular e houve ocorrência de danos na parede celular. Os autores propuseram que a condensação do DNA ocorreu como medida para proteger a informação genética da célula. Entretanto, a condensação pode prejudicar a replicação celular uma vez que a enzima DNA polimerase não tem acesso ao DNA. A presença dos grânulos densos formados dentro e fora da célula eram compostos de prata e enxofre, reforçando a idéia de que a prata inativa proteínas por interação com compostos contendo enxofre.

Kong e Jang *et al.* (2008) compararam as propriedades antibacterianas de nanofibras de polimetilmetacrilato (PMMA) contendo nanopartículas com sulfadiazina de prata e AgNO_3 na mesma concentração de prata contra *E. coli* e *S. aureus*. As nanofibras proporcionaram maior taxa de morte. Sulfadiazina de prata e AgNO_3 apresentaram propriedade antimicrobiana por liberação de íons

de prata. Quando os íons de prata entraram em contato com a bactéria, precipitados pretos foram formados via redução do íon ou formação de sal. Os precipitados comprometeram a eficiência antimicrobiana. Por outro lado, as nanofibras liberaram nanopartículas de prata com diâmetro de 7 nm e o contato com a bactéria não resultou em precipitação. Por essas razões, concentração efetiva de nanopartículas de prata pode ser muito menor que de íons de prata.

Guzmán *et al.* (2009) preparam nanopartículas de prata em uma solução aquosa de nitrato de prata empregando como redutor uma mistura de hidrato de hidrazina e citrato de sódio e o dodecil sulfato de sódio como estabilizante. Os autores produziram partículas com tamanho variando de 8 a 50 nm, com diâmetro médio de 24 nm. Os autores avaliaram também a atividade bactericida das nanopartículas sobre *E. coli* e *P. aeruginosa* e observaram inibição da multiplicação microbiana acima de 90 %. A interação das nanopartículas com as bactérias depende da área disponível, assim, massas iguais de partículas menores possuem maior área superficial para interação proporcionando maior efeito bactericida que as maiores partículas.

As nanopartículas de prata também têm sido propostas como alternativa estratégica para redução de adesão bacteriana e prevenção de formação de biofilmes que são definidos como população bacteriana aderida a uma superfície sólida, onde há presença de nutrientes, minerais e matéria orgânica. Os micro-organismos tornam-se sésseis em um biofilme e a matriz forma uma barreira protetora contra os agentes antimicrobianos. No trabalho de Bjarnsholt *et al.* (2007), a concentração bactericida de prata requerida para controlar o biofilme foi de 10 a 100 vezes maior que a necessária para células planctônicas. Dependendo da concentração e do tempo de exposição, as nanopartículas de prata podem inibir o desenvolvimento do biofilme, devido à capacidade de absorção do biofilme com comprometimento da diferenciação celular e estrutura da comunidade (MONTEIRO *et al.*, 2009).

Diante deste contexto, este capítulo apresenta como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata obtidas por diferentes metodologias sobre as espécies *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella Choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, bem como avaliar a capacidade destas nanopartículas em removerem células vegetativas aderidas em superfícies de aço inoxidável.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo das nanopartículas de prata

2.1.1. Síntese das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Fernandes (2010). Preparou-se uma solução aquosa na concentração de duas vezes a concentração micelar crítica (CMC) do surfactante brometo de dodeciltrimetilamônio (Dotab) (Sigma, São Paulo, Brasil), cuja CMC é $1,56 \times 10^{-2}$ M e nesta solução adicionou-se sulfadiazina de prata (SAg) na concentração de (0,028 M) (Sigma, São Paulo, Brasil). A dispersão foi submetida a uma agitação suficiente para garantir mistura completa e em seguida realizou-se centrifugação da dispersão a 15.000 g durante 5 minutos em centrífuga (SIGMA Laboratory Centrifuges 3k30). Após centrifugação, o sobrenadante de coloração amarela obtido que continha as nanopartículas foi separado do pellet e foram realizadas as análises microbiológicas. A concentração final das nanopartículas foi de 6 mg/L, determinada pela espectrometria de absorção atômica.

2.1.2. Concentração das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata concentradas foram obtidas conforme metodologia apresentada no item 2.1.1 e em seguida submetidas a aquecimento para evaporação parcial (70%) do solvente a fim de concentrar as nanopartículas presentes na dispersão. A concentração final obtida das nanopartículas foi de 60 mg/L, determinada pela espectrometria de absorção atômica.

2.1.3. Síntese das nanopartículas de prata na presença de cloreto de sódio

Na metodologia apresentada no item 2.1.1 foi adicionado 0,1 M de cloreto de sódio (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), a fim de promover desestabilização na dupla camada elétrica e observar a influência no efeito das nanopartículas formadas. Após o preparo destas nanopartículas, as mesmas foram analisadas quanto a sua ação antimicrobiana. A concentração das nanopartículas determinada na espectrometria de absorção atômica foi de 6 mg/L.

2.1.4. Obtenção das nanopartículas de prata pelo método Turkevich

As nanopartículas produzidas pelo método Turkevich (MONTEIRO, 2009) foram obtidas por meio da reação de redução do AgNO_3 com citrato. Para preparar as nanopartículas, a solução de AgNO_3 foi aquecida e após 2 minutos de ebulição, o citrato de sódio foi adicionado e a solução tornou-se amarela após poucos minutos indicando a formação das nanopartículas. A mesma foi mantida em ebulição por 6 minutos e então resfriada.

2.1.5. Nanopartículas de prata sintéticas

As nanopartículas denominadas neste trabalho de sintéticas foram adquiridas da empresa Sigma (São Paulo, Brasil).

2.1.6. Características das nanopartículas de prata

Tabela 1 – Características das nanopartículas de prata utilizadas como antimicrobianos

Nanopartículas de Prata	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)
Nanopartículas de prata (NP)	2,80
Nanopartículas de prata concentradas (NPC)	3,65
Nanopartículas de prata com adição de NaCl	4,40
Nanopartículas de prata sintéticas/Sigma (NPS)	180,00
Nanopartículas de prata – método Turkevich	5,6 – 270,00

2.2. Determinação do efeito antimicrobiano pelo teste do halo

A avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata, do Dotab (2 CMC) e da sulfadiazina de prata (0,028 M) *in vitro* foi realizada por meio do método de difusão em ágar. Culturas de *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 6539) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) foram utilizadas. Além destas bactérias, foi também avaliado o efeito antimicrobiano contra *Bacillus cereus*, bactéria isolada da superfície de aço inoxidável de uma máquina de envase de leite pasteurizado (Ribo 1 222-173-S4) (SALUSTIANO, 2007).

Inóculos de cada micro-organismo foram preparados por meio da suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas e selecionadas de uma placa de meio não seletivo inoculado com o micro-organismo e incubada a na temperatura ótima de cada microrganismo por 18-24 h. A suspensão foi ajustada até sua turbidez coincidir com a da solução padrão de McFarland 0,5. Placas de ágar Mueller-Hinton (Sigma, São Paulo, Brasil) foram inoculadas com os micro-organismos friccionando-se um swab de algodão esterilizado umedecido com a solução do inóculo previamente preparado. Sobre a superfície do ágar inoculado foram perfurados orifícios de diâmetro igual a 0,6 cm, onde foram depositados 30 µL de cada antimicrobiano. As placas foram incubadas na

temperatura ótima de cada microrganismo e após 16-18 horas os halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco (NCCLS, 2003b).

2.3. Imersão de superfícies de aço inoxidável com bactérias aderidas em dispersões contendo nanopartículas de prata

Cupons de aço inoxidável (10 mm x 10 mm x 0,05 mm) foram previamente higienizados e imersos em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) (Merck), onde foi adicionado inóculo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e incubado à 32 °C por 18-24 horas. Após o período de incubação, os cupons foram retirados, secos à temperatura de 25 °C e imersos no surfactante Dotab na concentração de 2 CMC, em nanopartículas de prata concentradas, nanopartículas de prata sintéticas/Sigma, nanopartículas de prata produzidas pelo método Turkevich e na água (controle) por 30 minutos e também por 60 minutos. Posteriormente, os cupons de cada tratamento foram transferidos para solução tampão de fosfato de sódio (0,1 M) por 1 minuto para remoção de células planctônicas e em seguida novamente imersos em solução tampão fosfato de sódio com a finalidade de remoção das células sésseis por meio de agitação em vortex durante 1 minuto. Diluições adequadas foram preparadas a partir deste último tampão e alíquotas foram plaqueadas em ágar padrão para contagem (PCA, Merck), sendo o número de células (UFC/cm²) aderidas determinado segundo a fórmula descrita abaixo (PARIZZI *et al.*, 2004). O número inicial de células aderidas no cupom de aço inoxidável foi determinado seguindo a mesma metodologia acima apresentada com exceção da segunda etapa de imersão dos cupons nos antimicrobianos.

$$UFC / cm^2 = \frac{(V_D / V_A) \cdot M \cdot D}{A} \quad (1)$$

em que

V_D = volume usado para rinsagem (mL);

V_A = volume usado para o plaqueamento da amostra (mL);

M = média do número de colônias após incubação da placa (UFC);

D = diluição decimal; e

A = área do cupom (cm²).

2.4. Remoção de células vegetativas de *B. cereus* aderidas a cilindros de aço inoxidável

Em amostras de 100 mL de leite esterilizado (UHT) foi adicionado, individualmente, 1 mL de suspensão de *B. cereus* (cerca de $1,0 \cdot 10^8$ UFC/mL). A suspensão preparada com micro-organismo isolado de leite pasteurizado provinha da cultura ativada por duas vezes, em BHI a 32 °C por 24 h. Estas amostras foram adicionadas em tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento nº 4, com 33 cm de comprimento e diâmetro 3,1 cm (Figura 1) com o intuito de simular o processo de remoção bacteriana utilizando o processo de limpeza CIP (*Cleaning in place*) (SALUSTIANO, 2007).



Figura 1 – Tubos de prova de aço inoxidável AISI 304 polimento nº 4, com 33 cm de comprimento e diâmetro 3,1 cm e extremidades fechadas com tampas rosqueáveis.

Os tubos de prova foram submetidos a movimentos rotatórios, colocando-os em uma superfície plana a partir de um ponto central e movimentando-os três vezes, no sentido longitudinal para cima, três vezes longitudinalmente para baixo, três vezes, no sentido lateral para direita, três vezes lateralmente para esquerda e por fim três movimentos tipo baliza, realizados manualmente. Este procedimento de movimentos rotatórios foi realizado por seis vezes seguidas, sobre um molde quadrado (46 cm de dimensão) delimitado na bancada do laboratório (Figura 2).

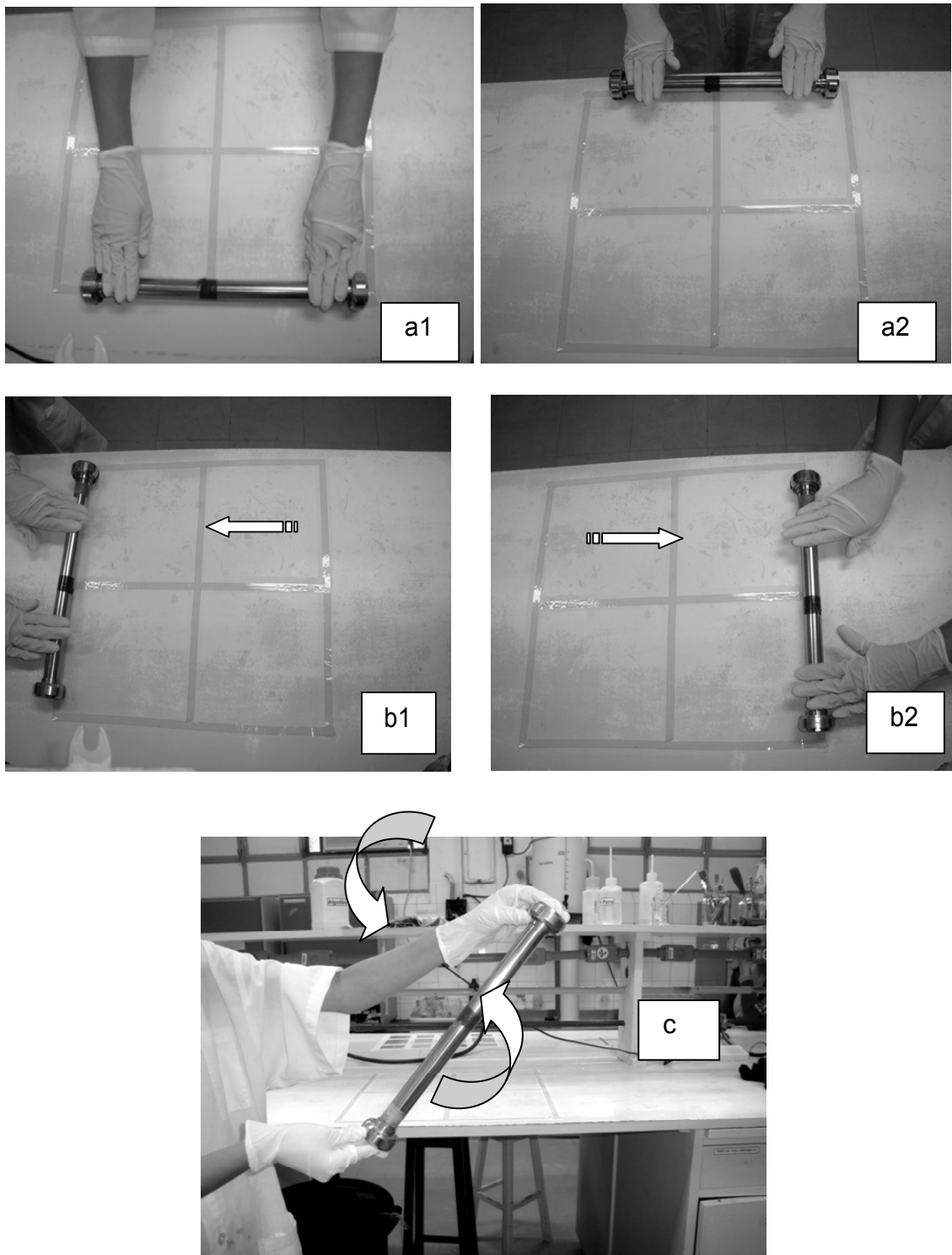


Figura 2 – Movimentos rotatórios, no sentido longitudinal para baixo (a1), longitudinal para cima (a2), lateral para a esquerda (b1), lateral para a direita (b2) e tipo baliza (c).

Em seqüência, os tubos foram incubados a 32 °C por 24 horas, para promover o processo de adesão do micro-organismo no aço inoxidável. A temperatura e o tempo de adesão simularam as condições ideais de

multiplicação para o *B. cereus*. Após a adesão, os inóculos contidos nos tubos de prova foram descartados e os tubos foram preenchidos com os diferentes tratamentos: água destilada a 25 °C, Dotab (0,0312 M), carbonato de sódio (40 mg/L), nanopartículas de prata concentradas (60 mg/L), nanopartículas de prata sintéticas/Sigma (6 mg/L) e nanopartículas de prata obtidas pelo método Turkevich para avaliar a eficiência na remoção de células aderidas. Após o preenchimento, os tubos foram submetidos aos rolamentos, conforme previamente mencionados.

O número de células aderidas às superfícies dos tubos de prova e que resistiram aos procedimentos de remoção de células foi determinado da seguinte forma: inicialmente as células planctônicas foram removidas pelo preenchimento dos tubos de prova com 100 mL de solução Ringer (0,45 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, 0,021 g.L⁻¹ de cloreto de potássio, 0,012 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio anidro, 0,01 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio e 10 g.L⁻¹ de tiosulfato de sódio); os tubos foram submetidos a seis movimentos tipo baliza, sendo a solução Ringer descartada.

Novamente, os tubos foram preenchidos com 100 mL solução Ringer e as células aderidas foram removidas das paredes dos tubos, usando-se uma haste de aço inoxidável (Figura 3) tendo em uma das extremidades um disco de neopreno com 3,25 cm de diâmetro. O disco de neopreno apresentava quatro orifícios de 3 mm de diâmetro cada, distribuídos um em cada quadrante, uniformemente, para a passagem da solução Ringer.

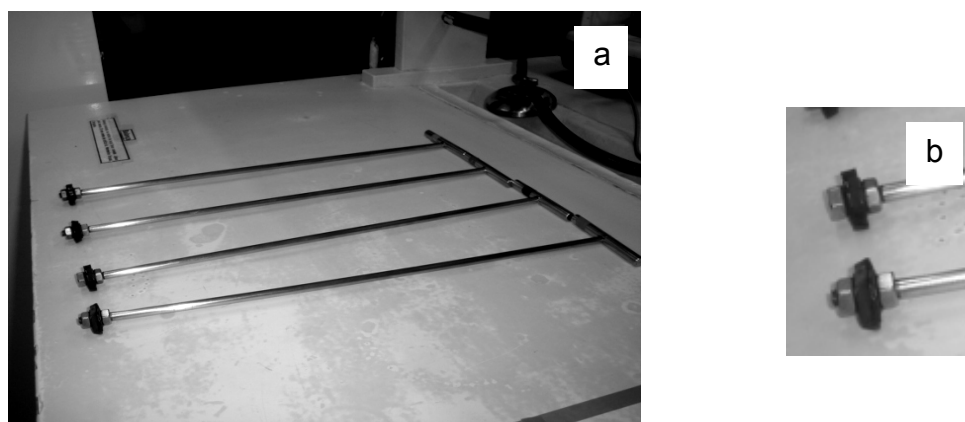


Figura 3 – Haste de aço inoxidável com disco de neopreno (3,25 cm de diâmetro) em uma das extremidades (a); e detalhe do disco de neopreno (b).

Essa haste foi empurrada até o fundo dos tubos de prova, por seis vezes seguidas. Os tubos de prova foram fechados novamente, para que a solução Ringer permanecesse em contato com a superfície por um minuto, e então, mais uma vez, submetidos aos movimentos rotatórios.

A partir da rinsagem final com solução Ringer, foram realizadas diluições apropriadas, que foram inoculadas em profundidade, em placas contendo ágar para contagem padrão, com incubação a 32 °C, por 24 h, segundo metodologia da APHA (2001) para determinação de *B. cereus*. Os resultados foram expressos em UFC/cm².

2.5. Análise estatística dos resultados

Todos os experimentos foram conduzidos em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (teste F) a 5 % de probabilidade e uma vez constatados o efeito significativo do tratamento, aplicou-se então o teste Tukey, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas no software estatístico SAS[®] (*Statistical Analysis System, version 9.1*)

No primeiro experimento, foram comparados os efeitos dos antimicrobianos (Dotab, SAg, NP, NPC, NPNaCl, NPS, NPT) para cada tipo de bactéria (*S. aureus*, *B. cereus*, *L. innocua*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. Choleraesuis*) e em seguida, outra análise foi realizada com intuito de comparar as diferentes bactérias dentro de cada antimicrobiano.

No segundo experimento, comparou-se a eficiência de diferentes tratamentos (água, NPC, NPT NPS e Dotab) na remoção de células vegetativas aderidas em cupons de aço inoxidável dentro de cada intervalo de tempo de imersão dos cupons (30 e 60 minutos).

No terceiro e último experimento, foram comparados diferentes tratamentos (água, carbonato de sódio, NPC, NPS e NPT) na remoção de células aderidas em cilindros de aço inoxidável.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que as nanopartículas de prata (NP, NPC e NPNaCl) produzidas segundo a nova metodologia possuíam maior atividade antimicrobiana ($p < 0,05$) que os demais tratamentos avaliados (Tabela 2). Esta maior eficiência relaciona-se ao tamanho das nanopartículas de prata produzidas que possuíam em média 2,8 – 4,4 nm de diâmetro. Segundo Shahverdi *et al.* (2007) quanto menor o tamanho das nanopartículas, maior a área interfacial e maior é a interação entre bactéria e nanopartícula facilitando assim, o contato e a ação antimicrobiana. A maior razão entre área da superfície e o volume das pequenas nanopartículas de prata significa que por unidade de massa de prata, as nanopartículas menores têm maior quantidade de átomos de prata em contato com a solução, participando do efeito antimicrobiano quando comparado às nanopartículas de tamanhos maiores. Além disso, as nanopartículas de tamanhos menores liberam maior quantidade de íons de prata possuindo, portanto maior eficiência antimicrobiana (GARDUQUE, 2010).

Para as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. Choleraesuis* não houve diferença ($p > 0,05$) na inibição entre as NP e NPNaCl, e as NPC foram as mais eficientes para estas bactérias formando maior halo de inibição. Como neste caso o tamanho das nanopartículas atuantes foi próximo para os três tratamentos (NP, NPC e NPNaCl), a concentração das nanopartículas em suspensão contribuiu para o maior efeito, uma vez que a concentração de NPC

Tabela 2 – Médias de halos de inibição, em cm, de células vegetativas submetidas à ação de diferentes antimicrobianos

Bactéria	Dotab	SAg	NP	NPC	NPNaCl	NPS	NPT
<i>S. aureus</i>	3,60 ± 0,1 ^c	1,17 ± 0,06 ^d	4,33 ± 0,15 ^b	4,63 ± 0,05 ^a	4,27 ± 0,15 ^b	1,23 ± 0,07 ^d	1,20 ± 0,1 ^d
<i>P. aeruginosa</i>	1,60 ± 0,08 ^c	1,27 ± 0,06 ^c	3,86 ± 0,3 ^b	4,57 ± 0,22 ^a	4,13 ± 0,26 ^b	1,30 ± 0,07 ^c	1,53 ± 0,1 ^c
<i>B. cereus</i>	1,60 ± 0,26 ^c	1,76 ± 0,15 ^c	4,00 ± 0,1 ^a	4,73 ± 0,57 ^a	2,87 ± 0,51 ^b	0 ^d	1,70 ± 0,1 ^c
<i>L. innocua</i>	1,92 ± 0,20 ^{c,b}	1,95 ± 0,35 ^{c,b}	4,36 ± 0,23 ^a	4,40 ± 0,19 ^a	4,00 ± 0,10 ^a	2,45 ± 0,25 ^b	1,38 ± 0,18 ^c
<i>E. coli</i>	1,90 ± 0,24 ^c	1,84 ± 0,11 ^c	3,13 ± 0,45 ^b	4,26 ± 0,25 ^a	2,84 ± 0,36 ^b	2,30 ± 0,33 ^c	2,00 ± 0,1 ^c
<i>S. Choleraesuis</i>	2,12 ± 0,17 ^c	2,20 ± 0,3 ^c	3,07 ± 0,05 ^b	4,03 ± 0,15 ^a	3,32 ± 0,12 ^b	1,95 ± 0,25 ^c	1,77 ± 0,11 ^c

Médias seguidas por letras iguais (minúsculas) na mesma linha não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Brometo de dodeciltrimetilamônio (Dotab), sulfadiazina de prata (SAg), nanopartículas de prata (NP), nanopartículas de prata concentradas (NPC), nanopartículas de prata produzidas com adição de NaCl (NPNaCl), nanopartículas sintéticas (NPS) e nanopartículas obtidas pelo método Turkevich (NPT).

foi 60 µg/mL enquanto as de NP e NPNaCl foi 10 vezes menor (6 µg/mL). É importante mencionar que o efeito antimicrobiano das NPNaCl está relacionado apenas às nanopartículas formadas, uma vez que a concentração de NaCl (0,586%) adicionada provavelmente não é suficiente para promover inibição destes micro-organismos. No caso da *L. innocua*, a ação antimicrobiana foi a mesma para NP, NPC e NPNaCl. Para *B. cereus*, as NP e NPC não diferiram, enquanto a inibição das NPNaCl foi menor.

Martínez-Castañón *et al.* (2008) determinaram a concentração mínima inibitória (CMI) de nanopartículas de prata sintetizadas contra *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e observaram que as nanopartículas que possuíam 7 nm de diâmetro apresentaram o melhor efeito antimicrobiano. Segundo os autores, em virtude do menor tamanho, as nanopartículas podem alcançar facilmente o conteúdo nuclear da bactéria e por apresentarem maior área superficial, proporcionou maior contato com a bactéria. A CMI de todas as amostras foi menor para *E. coli*, que segundo os autores pode ser explicado com base na diferença entre a parede celular de Gram-positivo e Gram-negativo, tendo bactérias Gram-positivas parede mais espessa. Para *E. coli* não houve diferença na CMI quando as nanopartículas possuíam 29 ou 89 nm. Quando avaliaram nanopartículas de prata de 10 nm, não houve diferença significativa de CMI para cada bactéria.

No presente trabalho, concentração de apenas 6 µg/mL foi capaz de promover formação de halos de inibição para as espécies estudadas. No estudo de Jing *et al.* (2009), as nanopartículas de prata apresentaram amplo espectro de inibição contra as bactérias *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* quando a concentração de partículas de prata foi de 2.000 µg/mL na suspensão.

Morones *et al.* (2005) testaram nanopartículas em pó dentro de uma matriz de carbono, utilizada para prevenir coalescência durante a síntese. Algumas concentrações de nanopartículas de prata (0, 25, 50, 75 e 100 µg/mL) foram avaliadas para as seguintes bactérias: *E. coli*, *V. cholera* e *P. aeruginosa*. Os resultados demonstraram que a concentração de nanopartículas de prata que preveniu a multiplicação bacteriana foi diferente para cada tipo, sendo que *P. aeruginosa* e *V. cholera* foram mais resistentes que *E. coli*. Em

concentrações acima de 75 µg/mL, não houve multiplicação bacteriana significativa para as bactérias testadas. Os autores observaram também que somente partículas individuais aderiram à superfície da membrana e não houve clara interação da membrana da bactéria com aglomerados de partículas presentes na matriz de carbono. Esta informação forneceu evidência de que somente as nanopartículas foram capazes de deixar a matriz e interagir com a bactéria. Além disso, as nanopartículas encontradas no interior da célula foram similares em tamanho com as que interagiram com a membrana, implicando que somente as partículas que interagem com a membrana foram capazes de entrar na bactéria.

Diante dos resultados apresentados neste capítulo, é possível afirmar que não houve tendência de inibição em função da classificação da bactéria em Gram-positiva ou Gram-negativa. Dentre as bactérias estudadas, a mais sensível foi *L. innocua*, uma vez que os halos não diferiram com relação ao tipo de nanopartícula aplicada. No caso da *Listeria*, concentração de apenas 6 µg/mL das NP e NPNaCl foi suficiente para produzir o halo de inibição de mesmo diâmetro das NPC que possuíam 60 µg/mL.

Observou-se também que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos halos de inibição para as bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. Choleraesuis* para os antimicrobianos Dotab, SAg, NPS e NPT. Os menores halos de inibição foram obtidos para esses tratamentos. O Dotab é um surfactante que apresenta efeito antimicrobiano conhecido. Entretanto, sua eficiência foi menor quando comparado às nanopartículas de prata obtidas pela nova síntese. Deduz-se que a inibição promovida pelas nanopartículas pode ser atribuída uma parte ao efeito deste componente que se mantém na constituição das nanopartículas e a outra parte decorrente do efeito antimicrobiano das nanopartículas.

No nosso trabalho notou-se maior efeito antimicrobiano do Dotab para *S. ureus*, bactéria Gram-positiva que para bactérias Gram-negativas. Entretanto, sabe-se que detergentes iônicos interagem principalmente com fosfolípidos da membrana bacteriana e que as bactérias Gram-negativas possuem maior teor de lipídeos na parede celular que as Gram-positivas. Em termos físico-químicos, o efeito dos detergentes está em quebrar irreversivelmente a

estrutura de lipoproteínas por ação de detergência de componentes importantes da membrana ou por desorganização da estrutura por penetração.

Simões *et al.* (2003) investigaram a atividade de um surfactante catiônico (brometo de cetiltrimetilamônio – CTAB) em biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* em fluxo laminar e turbulento. Os testes com células planctônicas mostraram que o CTAB foi bactericida contra *P. fluorescens* e promoveu liberação do ATP intracelular. Este extravasamento do material intracelular pode ser sinal de rompimento da membrana externa da bactéria enfatizando que os danos na membrana podem explicar a ação antimicrobiana do surfactante. O CTAB agiu diferentemente no biofilme formado sobre condições turbulenta e laminar. O biofilme laminar foi mais susceptível ao CTAB que o formado sobre fluxo turbulento. Entretanto, inativação respiratória total não foi alcançada em todas as situações testadas, enfatizando possível proteção da matriz polimérica do biofilme. Além disso, CTAB causou menor efeito na remoção do biofilme da superfície metálica. Portanto, os autores concluíram que somente com combinação sinérgica de alta concentração de surfactante e alta força de cisalhamento que foi o meio mais eficaz para promover a liberação do biofilme.

Na literatura é relatado o bom desempenho de prata iônica (Ag^+) na inibição de micro-organismos. No nosso trabalho, o efeito da sulfadiazina de prata não foi destacável, uma possível causa pode ser a dificuldade em formar dispersão homogênea deste componente que acarretou em comprometimento da difusão dos íons de prata para o ágar para possibilitar a ação antimicrobiana.

No caso das NPS e NPT, o baixo desempenho antimicrobiano pode ser atribuído ao maior diâmetro apresentado por estas partículas que foram relativamente maiores quando comparadas ao tamanho das nanopartículas obtidas pela nova síntese. Como já foi mencionado, quanto menor o tamanho, maior a área interfacial e melhor o contato com a bactéria para realizar a ação antimicrobiana. É importante ressaltar que a morfologia das nanopartículas pode também influenciar na reatividade. Nanopartículas triangulares apresentam inibição bacteriana com teor de prata de 1 μg , enquanto no caso de nanopartículas esféricas o teor necessário é de 12 μg , já para as nanopartículas de formato bastonete são necessários 50 a 10 μg de prata (PAL *et al.*, 2007). Portanto, a morfologia presente das nanopartículas em cada tratamento pode ter influenciado o efeito na célula bacteriana.

Para *B. cereus*, não houve diferença ($p > 0,05$) no efeito do Dotab, SAg, NPT, enquanto para essa mesma bactéria nenhum halo foi observado quando o antimicrobiano utilizado foram as NPS. A Figura 4 mostra os halos de inibição para *B. cereus* obtidos em todos os tratamentos envolvidos. Já para a *L. innocua*, as NPT formaram halos menores que as NPS.

Quando se comparou o efeito de cada antimicrobiano sobre as diferentes bactérias avaliadas (Tabela 3), observou-se que os tratamentos apresentaram a mesma eficiência ($p > 0,05$) para as espécies *E. coli* e *S. Choleraesuis*. Esses micro-organismos são indicados pela AOAC para avaliar a ação bactericida de sanitizantes químicos pelo teste de suspensão. O surfactante Dotab foi mais efetivo para *S. aureus* e o tamanho dos halos produzidos por esse agente foi semelhante ($p > 0,05$) para as demais espécies. A SAg apresentou menor eficiência para *S. aureus* e *P. aeruginosa* e maior halo de inibição para *L. innocua*, *E. coli* e *S. Choleraesuis*. As NPNaCl apresentaram a mesma eficiência para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *L. innocua* e também a ação antimicrobiana não diferiu para *B. cereus*, *E. coli* e *S. Choleraesuis*. As NPS não inibiram o *B. cereus* como já foi mencionado e apresentou menor efeito para *S. aureus* e *P. aeruginosa* quando se comparou às demais bactérias. Por fim, as NPT proporcionaram maior efeito antimicrobiano para *B. cereus*, *E. coli* e *S. Choleraesuis*.

Observou-se que a condição mais eficaz para remoção de células aderidas de *P. aeruginosa*, patógeno capaz de formar biofilmes em dispositivos usados na área médica, foi quando as superfícies foram imersas em NPC e NPS (Tabela 4). É preconizado que três reduções decimais (RD) são necessárias para considerar uma solução de sanitizante eficiente para remoção de células aderidas. Portanto, os tratamentos NPC e NPS apresentaram alta eficiência, com capacidade de cinco reduções decimais (RD) tanto para 30 minutos quanto para 60 minutos de imersão dos cupons nestas nanopartículas. O resultado apresentado pelas NPS não era esperado, uma vez que no teste de difusão em ágar os halos formados na inibição de diferentes espécies por essas nanopartículas foram pequenos. As NPS possuíam 180 nm de diâmetro. O tamanho destas nanopartículas pode ter prejudicado o processo de difusão em ágar acarretando em menor eficiência das NPS.

Tabela 3 – Comparação da eficiência de diferentes antimicrobianos sobre células vegetativas

Bactéria	Dotab	SAg	NP	NPC	NPNaCl	NPS	NPT
<i>S. aureus</i>	3,60 ± 0,1 ^a	1,17 ± 0,06 ^c	4,33 ± 0,15 ^a	4,63 ± 0,05 ^a	4,27 ± 0,15 ^a	1,23 ± 0,07 ^b	1,20 ± 0,1 ^c
<i>P. aeruginosa</i>	1,60 ± 0,08 ^b	1,27 ± 0,06 ^c	3,86 ± 0,3 ^a	4,57 ± 0,22 ^a	4,13 ± 0,26 ^a	1,30 ± 0,07 ^b	1,53 ± 0,1 ^{c,b}
<i>B. cereus</i>	1,60 ± 0,26 ^b	1,76 ± 0,15 ^b	4,00 ± 0,1 ^a	4,73 ± 0,57 ^a	2,87 ± 0,51 ^c	0 ^c	1,70 ± 0,1 ^{b,a}
<i>L. innocua</i>	1,92 ± 0,20 ^b	1,95 ± 0,35 ^a	4,36 ± 0,23 ^a	4,40 ± 0,19 ^a	4,00 ± 0,1 ^{a,b}	2,45 ± 0,25 ^a	1,38 ± 0,18 ^{c,b}
<i>E. coli</i>	1,90 ± 0,24 ^b	1,84 ± 0,11 ^{b,a}	3,13 ± 0,45 ^b	4,26 ± 0,25 ^a	2,84 ± 0,36 ^c	2,30 ± 0,33 ^a	2,00 ± 0,1 ^a
<i>S. Choleraesuis</i>	2,12 ± 0,17 ^b	2,20 ± 0,3 ^a	3,07 ± 0,05 ^b	4,03 ± 0,15 ^a	3,32 ± 0,12 ^{b,c}	1,95 ± 0,25 ^a	1,77 ± 0,11 ^{b,a}

Médias seguidas por letras iguais (maiúscula) na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (p < 0,05).

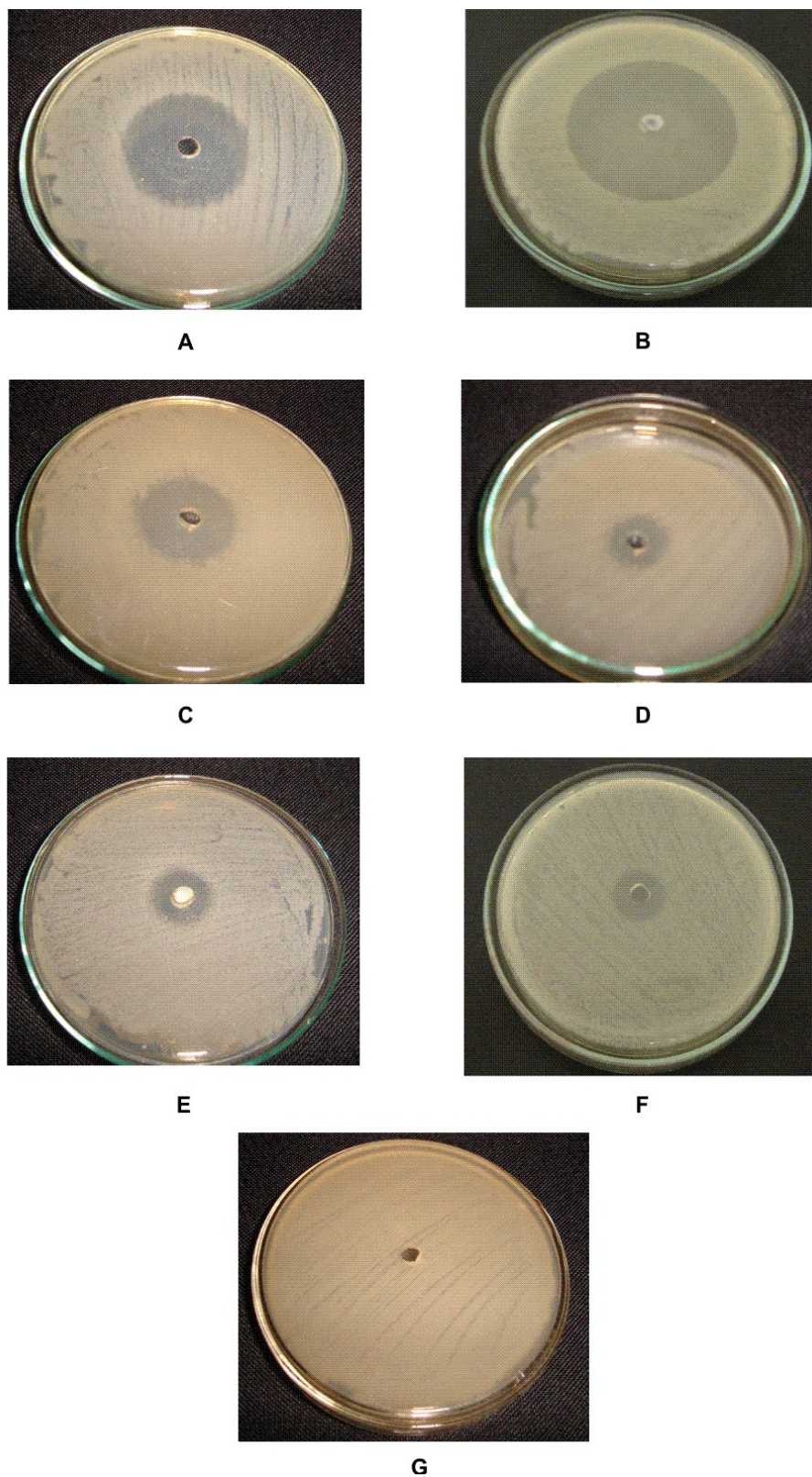


Figura 4 – Halos de inibição formados para *B. cereus* decorrente da ação de diferentes antimicrobianos: A = nanopartículas de prata; B = nanopartículas de prata concentradas; C = nanopartículas de prata com adição de NaCl; D = dotab; E = sulfadiazina de prata; F = nanopartículas de prata obtidas pelo método Turkevich; e G = nanopartículas de prata sintéticas/Sigma.

Tabela 4 – Médias do log UFC/cm² de células vegetativas de *Pseudomonas aeruginosa* aderidas em cupons de aço inoxidável após imersão em diferentes antimicrobianos

Tratamentos	Imersão: 30 min (log UFC/cm ²)	Reduções Decimais	Imersão: 60 min (log UFC/cm ²)	Reduções Decimais
Células aderidas (antes da imersão)	6,06 ^a	-	6,64 ^a	-
Água (controle)	5,81 ^b	0,25	6,24 ^b	0,40
NPC	< 1,00 ^e	> 5,06	<1,00 ^e	> 5,64
NPT	5,25 ^c	0,81	4,04 ^c	2,60
NPS	< 1,00 ^e	> 5,06	<1,00 ^e	> 5,64
Dotab	4,20 ^d	1,86	3,54 ^d	3,10

Médias seguidas por letras iguais (minúsculas), na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Deste modo, o uso das nanopartículas de prata poderia ser inserido na indústria de alimentos, devido o efeito antimicrobiano destacado e à capacidade em alcançar os sítios de colonização microbianos que muitas vezes estão em espaços intercelulares ou fissuras presentes em superfícies.

Testes de uso simulado são frequentemente empregados para análise de uma situação real da indústria de alimentos. O processo de adesão do micro-organismo *B. cereus* e os procedimentos de remoção de células realizados mostraram que a maior eficiência na remoção depende dos agentes antimicrobianos aplicados (Tabela 5). O desempenho das NPC e das NPS foram os melhores, enquanto as NPT e o carbonato de sódio não diferiram da água na capacidade de remoção de células aderidas. O efeito das NPC atende a recomendação da comunidade europeia que preconiza 10 UFC/cm² de mesófilos aeróbios para considerar uma superfície de aço inoxidável que entra em contato com alimento, em boas condições higiênico-sanitárias.

Tabela 5 – Logaritmo de UFC/cm² de *Bacillus cereus* aderidos em tubos de aço inoxidável empregado no teste de uso simulado das condições de uma tubulação de aço inoxidável de processamento de leite

Tratamentos	Log UFC/cm ²
Água	3,14 ^a
Carbonato de sódio (controle)	2,04 ^{a, b}
NPC	0,80 ^c
NPS	1,17 ^{b, c}
NPT	2,69 ^a

Estudos com superfícies de aço inoxidável cobertas com zeólitos contendo 2,5% de íons de prata e 14% de íons de zinco demonstraram redução significativa (3 RD) dentro de 24 horas para células vegetativas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*. Os esporos de *Bacillus* foram completamente resistentes nas mesmas condições (GALEANO *et al.*, 2003).

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podem-se sugerir as nanopartículas de prata obtidas pela nova síntese como um antimicrobiano a ser empregado na indústria de alimentos, com atuação, por exemplo, na sanitização de utensílios que entrarão em contato com os alimentos, com o intuito de reduzir o processo de adesão e aumentar a inocuidade dos alimentos oferecidos aos consumidores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLANTONE, M.; WILLIAMS, H. D.; HENCH, L. L. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag₂O-doped bioactive glass. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 1940-1945, 2002.

BJARNSHOLT, T.; KIRKETERP-MOLLER, K.; KRISTIANSEN, S.; PHIPPS, R.; NIELSEN, A. K.; JENSEN, P. O. Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica**, v. 115, p. 921-928, 2007.

CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 587-590, 2007.

EPA. **Integrated risk information system**, Silver (CASRN7440-22-4). Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris/subst/0099.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2010.

FENG, Q. I.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 52, p. 662-668, 2002.

FERNANDES, P. E. **Novo método de síntese de nanopartículas de prata e avaliação de seu efeito antimicrobiano**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2010.

GALEANO, B.; KORFF, E.; NICHOLSON, W. L. Inactivation of vegetative cells, but not spores, of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. subtilis* on stainless steel surfaces coated with an antimicrobial silver and zinc containing zeolite formulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4329-4331, 2003.

GARDUQUE, G. Silver as an antimicrobial agent. Disponível em: <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Silver_as_an_Antimicrobial_Agent>. Acesso em: 24 jun. 2010.

GUZMÁN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, v. 3, p. 104-111, 2009.

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

KLUEH, U.; WAGNER, V.; KELLY, S.; JOHNSON A.; BRYERS, J. D. Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 53, p. 621-631, 2000.

KONG, H.; JANG, J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, p. 2051–2056, 2008.

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

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 Antimicrobial Agents**, v. 34, p.103–110, 2009.

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Norma aprovada - Oitava Edição. M2-A8, v. 23, n. 1, 2003b.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. **Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens**. São Carlos, SP, 2008. (Comunicado técnico 99).

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 27, p. 1712-1720, 2007.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SOARES, N. F. F.; SILVA, C. A. S.; MONTEIRO, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives Biological and Technology**, v. 47(1), p.77-83, 2004.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A.; Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83, 2009.

RODRIGUEZ, N. S.; SICAIROS-RUELAS, E. E.; GERBA, C. P.; BRIGHT, K. R. Silver as a disinfectant. In: WARE, G. W. (Ed.) **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York: Springer, 2007. p. 23-45.

SALUSTIANO, V. C. **Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após a pasteurização do leite**. 2007, 85 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.

SHAHVERDI A. R.; FAKHIMI, A.; SHAHVERDI, H. R.; MINAIAN, M. S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine**, v. 3, p.168-171, 2007.

SIMOES, M.; PERERIRA, M.; VIEIRA, M. Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes. In: ASM CONFERENCE ON BIOFILMS, Victoria: American Society of Microbiology, 2003. p. 108.

SONG, H. Y.; KO, K. K.; OH, L. H.; LEE, B. T. Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. **European Cells and Materials** v. 11, p. 58, 2006.

CAPÍTULO 3

ASPECTOS COLOIDAIIS DA ADESÃO DE MICRO-ORGANISMOS: ESTRATÉGIAS DE INIBIÇÃO DO PROCESSO DE ADESÃO

RESUMO

O potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata tem surgido como estratégia para inibir a adesão microbiana. A adesão de micro-organismos em superfícies é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos e depende das propriedades interfaciais dos micro-organismos e dos substratos de adesão. A hidrofobicidade das superfícies é considerada de relevância no estudo da adesão microbiana, uma vez que para se estabelecer uma adesão efetiva entre duas superfícies, em meio aquoso, o filme de água que as separa tem que ser removido e a hidrofobicidade das superfícies interatuantes contribui para a facilidade dessa remoção. Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a capacidade das nanopartículas de prata em alterar as características termodinâmicas da superfície de aço inoxidável, a fim de reduzir o processo de adesão e formação de biofilmes. Verificou-se que as nanopartículas de prata foram capazes de promover redução do ângulo de contato do aço inoxidável de $73,20^\circ$ quando condicionado com água, para $12,10^\circ$, tornando esta superfície mais hidrofílica ($41,460 \text{ mJ/m}^2$). Desta forma, a termodinâmica de adesão para todas as bactérias avaliadas foi mais desfavorável quando as superfícies de aço inoxidável foram condicionadas com as nanopartículas. Portanto, as nanopartículas de prata apresentam eficiência

antimicrobiana, uma vez que além de alterarem a hidrofobicidade da superfície que é importante para dificultar o processo de adesão celular, apresentaram amplo espectro antimicrobiano.

1. INTRODUÇÃO

A adesão bacteriana é importante em um grande número de processos tecnológicos, envolvendo desde a microbiologia médica e patológica passando pela indústria de alimentos e engenharia ambiental até a área de ciência de biomateriais.

A adesão de micro-organismos em superfícies é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos e depende das propriedades superficiais, como tensão superficial, entalpia superficial por unidade de área, composição da superfície, dentre outros, das interfaces dos suportes de adesão como aço, polímeros e mármore e das membranas dos micro-organismos. Além disso, as propriedades microbiológicas e as características do meio circundante, como temperatura, pH, força iônica e disponibilidade de nutrientes, determinam, em muitos sistemas, o processo de adsorção (UBBINK *et al.*, 2007).

Adsorção é um processo espontâneo onde um componente do sistema concentra-se em maior quantidade na interface do que nas outras fases em contato. A molécula difunde para a interface devido ao excesso de energia livre de Gibbs que existe na interface e também em virtude de interações energeticamente favoráveis que podem ocorrer entre o sólido adsorvente e o soluto, ou interações desfavoráveis entre soluto e componentes da solução (SOMASUNDARAN *et al.*, 2003). A adesão e formação de biofilmes constituem em parte um processo de adsorção.

A formação de um biofilme inclui muitas etapas, mas um pré-requisito é a adesão das células microbianas à superfície. Estudos das propriedades de adesão de bactérias têm mostrado que, em alguns casos, as características físico-químicas da superfície da célula contribuem determinantemente no processo de adesão (CHAVES, 2004).

As interações dos micro-organismos com a interface do substrato, no processo de adesão, podem ser específicas ou não específicas. Interações específicas envolvem o reconhecimento de um determinado sítio, de uma molécula receptora que se encontra na interface do micro-organismo, enquanto a interação não específica é dirigida pelas propriedades físico-químicas das duas interfaces interagentes: micro-organismo e superfície na adesão (ABBASNEZHAD *et al.*, 2008).

O parâmetro hidrofobicidade celular é considerado de relevância no estudo das propriedades da superfície bacteriana visando o entendimento do processo de adesão não específica da bactéria ao substrato. Este parâmetro reflete as inúmeras interações intermoleculares, incluindo-se entre elas, as ligações covalentes, as pontes de hidrogênio e as forças de dispersão, que ocorrem entre as moléculas da interface bacteriana e da interface do substrato, sendo todas estas formas de interação fundamentais para o processo de adsorção/adesão (SOMASUNDARAN *et al.*, 2003).

Existem na literatura, dados de experimentos que mostram que a adesão microbiana depende fortemente da estrutura hidrofóbica e, ou, hidrofílica das superfícies de interação. Interações não covalentes entre as partículas podem ser de três tipos: interação interfacial, interação eletrostática e movimento Browniano (van OSS, 1994). Somente as interações interfaciais são relevantes para a definição de hidrofobicidade e hidrofílicidade. A diferença básica entre essas interações é a competição entre a energia livre interfacial de coesão do sólido, imerso na água, e a energia livre de coesão do líquido (van OSS; GIESE, 1995).

A importância do caráter hidrofóbico da superfície das células na adesão foi explicada por van Loosdrecht *et al.* (1990) que ressaltou que para se estabelecer uma adesão efetiva entre duas superfícies em meio aquoso o filme de água que as separa tem que ser removido e a hidrofobicidade das superfícies interagentes contribui para a facilidade dessa remoção. Portanto, a

interface bactéria e líquido e a interface superfície de adesão e líquido terão que ser substituídas pela interface bactéria e superfície de adesão. Segundo a teoria termodinâmica, a adesão só se verifica se o processo conduzir a uma redução da energia livre global, obtendo-se valores negativos de $\Delta G_{adesão}$.

Devido ao comprimento da bactéria, de aproximadamente 1 μm , seu formato e cobertura com biomacromoléculas e carga global negativa, as bactérias são consideradas partículas coloidais vivas, e portanto, as propriedades físico-químicas de um sistema formado por muitas bactérias assemelham-se às dos colóides. Importantes aspectos da interação bacteriana e da adesão podem ser entendidos baseados no conhecimento das propriedades físico-químicas e coloidais da bactéria (DUFRENE, 2003). As bactérias podem modificar a composição da superfície celular durante a fase de multiplicação, ou em função de mudanças na composição do meio. Assim, essas alterações causam mudanças nas propriedades coloidais.

É importante ressaltar que um sistema coloidal pode ser definido como um sistema heterogêneo, em que pelo menos uma das fases está na forma contínua e a(s) outra(s) fase(s) encontra(m)-se na forma dispersa. Uma vez que as dimensões da fase dispersa são muito pequenas, o sistema coloidal apresenta uma área interfacial muito grande e muitas de suas propriedades termodinâmicas são influenciadas pela natureza da interface (NORDE, 2003; VICENT, 2005).

Alguns fatores podem afetar o mecanismo do fenômeno de adsorção na interface. A natureza da superfície, por exemplo, determina a área disponível para ocorrer a adsorção, e a natureza química dos compostos da interface direciona a interação que ocorre entre as moléculas e a superfície (DAS *et al.*, 2006).

Quando uma partícula ou micro-organismo está muito próximo de uma superfície (2-5 nm), forças de curto alcance passam a regular o processo de adesão, essas forças são representadas pelas forças de hidratação, as interações hidrofóbicas e pontes poliméricas. As forças ácido-base de Lewis também são importantes para considerar os aspectos relacionados aos micro-organismos no processo de adesão. Assim, a energia livre das interações totais – energia livre de Gibbs – numa superfície é resultante do somatório das

energias livres das interações de Lifshitz-van der Waals, interações ácido-base de Lewis e forças eletrostáticas de dupla camada elétrica (OLIVEIRA, 2006).

Vários mecanismos para adesão bacteriana em diferentes superfícies de contato têm sido propostos. A teoria, descrita por Marshall *et al.* (1971), afirma que a adesão em superfícies sólidas é um processo que acontece em duas etapas. A primeira é reversível, pois o micro-organismo está fracamente aderido à superfície através de forças de van der Waals e interações eletrostáticas, propiciando fácil remoção da célula bacteriana. Já a segunda é irreversível, uma vez que o tempo de aderência envolve adesão física da célula à superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzido pelo micro-organismo, o que se denomina matriz de glicocálix. O glicocálix auxilia na formação do biofilme, sendo produzido somente após a adesão superficial, fornecendo condições para adesão do peptidoglicano das bactérias Gram-positivas e a parte externa da membrana externa das Gram-negativas.

Atualmente, estratégias têm emergido com potencial para inibir a adesão microbiana, como por exemplo, a aplicação de cobertura contendo compostos que possuam propriedade antiadesiva à bactéria e a outros micro-organismos colonizadores, prevenindo assim a adesão. Os mecanismos principais para evitar a interação entre bactéria e substrato consistem no desenvolvimento de polímeros ou superfícies com propriedades antiadesivas ou com propriedades antimicrobianas. Diferentes compostos têm sido aplicados na tentativa de prevenir a adesão bacteriana.

Estudos prévios têm mostrado que formulações antimicrobianas na forma de nanopartículas metálicas podem ser usadas com potencial antimicrobiano, por exibir ação bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SONDI; SALOPEK-SANDI, 2004).

A prata tem sido considerada como um potencial antimicrobiano, devido intensa atividade antimicrobiana e baixa toxicidade para células de mamíferos e tecidos. Portanto, sua deposição em dispositivos protéticos, como catéteres, válvulas cardíacas, dentre outros, pode ser atrativo para evitar adesão e formação de biofilme bacteriano que pode conduzir a sérias infecções, acarretando em graves problemas de saúde. Outra potencial aplicação ocorre em superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato com alimentos

e materiais de embalagem, onde a presença de bactérias indesejáveis pode desencadear deterioração dos alimentos e infecções e, ou, intoxicações alimentares (JIANG *et al.*, 2003).

Recentes estudos mostram que tubos endotraqueais com revestimento antimicrobiano têm sido utilizados na área médica para evitar formação de biofilmes e consequente colonização de bactérias nos pulmões causando pneumonia. Na concepção dos biomateriais impregnados com antimicrobianos, tanto a seleção quanto a taxa de liberação do antimicrobiano do dispositivo devem ser considerados. Berra *et al.* (2008) estudaram diferentes revestimentos para os tubos endotraqueais e observaram que em estudos *in vitro*, os tubos revestidos com sulfadiazina de prata apresentaram propriedades antimicrobianas contra *P. aeruginosa* prevenindo a formação de biofilmes durante 72 horas.

O uso de nanopartículas de prata como agente antibacteriano é relativamente novo. Podem ser também aplicadas na medicina para reduzir infecções, bem como prevenir colonização bacteriana em superfícies de prótese, cateteres, materiais odontológicos, materiais de aço inoxidáveis comumente usados na indústria de alimentos. Podem ser empregadas ainda na eliminação de micro-organismos em têxteis e no tratamento de água (GUZMÁN *et al.*, 2009).

Jiang *et al.* (2003) depositaram nanopartículas de prata em superfícies de borracha de silicone de uso na indústria de alimentos e na área médica. O efeito antimicrobiano da superfície foi avaliado para células vegetativas de *L. monocytogenes*. O número de células bacterianas manteve essencialmente o mesmo durante as 24 horas de exposição da superfície sem tratamento à suspensão bacteriana. Já no caso das superfícies cobertas com prata, iniciou-se declínio do número de bactérias após 6 horas e depois de 12 horas houve redução de mais de dois ciclos logarítmicos na superfície de silicone de uso na área médica enquanto que nenhuma *L. monocytogenes* pôde ser recuperada da superfície de silicone de grau alimentício. Provavelmente, nesta última superfície, concentração maior de prata foi depositada tornando-a mais efetiva. Nenhuma bactéria foi detectada após 12 a 18 horas de exposição da superfície coberta com prata à presença de células de *L. monocytogenes*. Nenhuma bactéria viável foi detectada em ambos os tipos de superfícies após 18 e 24 horas.

Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a capacidade das nanopartículas de prata em alterar as características termodinâmicas de superfície de aço inoxidável, comumente utilizada na indústria de alimentos, a fim de reduzir o processo de adesão e formação de biofilmes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condicionamento das superfícies

Cupons (10 mm x 10 mm) de aço inoxidável AISI 304 #4 previamente higienizados foram imersos em água, no surfactante brometo de dodeciltrimetilamônio (Dotab) (Sigma, São Paulo, Brasil) na concentração igual a duas vezes a concentração micelar crítica (CMC) e em nanopartículas de prata na concentração de 60 mg/L, obtidas de acordo com a metodologia proposta por Fernandes (2010) e adaptada. Segundo esta metodologia, preparou-se uma solução aquosa na concentração de 2 CMC do surfactante (Dotab) (Sigma, São Paulo, Brasil), cuja CMC é $1,56 \times 10^{-2}$ M e nesta solução adicionou-se sulfadiazina de prata (SAg) na concentração de 0,028 M (Sigma, São Paulo, Brasil). A dispersão foi submetida a uma agitação suficiente para garantir mistura completa e em seguida realizou-se centrifugação da dispersão a 15.000 g durante 5 minutos em centrífuga (*SIGMA Laboratory Centrifuges 3k30*). Após centrifugação, o sobrenadante de coloração amarela obtida que continha as nanopartículas foi separado do pellet e submetido a aquecimento para evaporação parcial (70%) do solvente a fim de concentrar as nanopartículas presentes na dispersão.

Os cupons permaneceram imersos nestas dispersões durante 24 horas à temperatura de 25 °C de modo a condicionar e alterar as características da

superfície. Após este período, os cupons foram secos à temperatura de 25 °C e conduzidos para a medida do ângulo de contato.

2.2. Micro-organismos utilizados e condições de cultivo

Os estudos foram conduzidos usando suspensões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Listeria innocua* (ATCC 33090).

Estas culturas estavam estocadas à -80 °C em caldo nutriente (Merck, Sao Paulo, Brasil) contendo glicerol (80:20). Para ativação das espécies, 100 µL da cultura foi transferido para 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (BHI, Merck, São Paulo, Brasil) e em seguida, incubou-se a 32 °C por 24 horas. A cultura foi ativada três vezes antes do uso e o número de micro-organismo de cada suspensão foi obtido por contagem total em placa utilizando o ágar padrão para contagem (PCA) e o número de unidades formadoras por mL (UFC/mL) foi para todas as suspensões aproximadamente 10⁷ UFC/mL.

2.3. Determinação do ângulo de contato

2.3.1. Medida do ângulo de contato para superfícies

Para as diferentes superfícies de aço inoxidável condicionadas, o ângulo de contato entre a superfície e água, formamida e α -bromonaftaleno foi determinado usando o goniômetro (Kruss, Germany). Foi feita a medição do ângulo de contato de uma gota de 2,0 µL a cada segundo durante 30 segundos consecutivos para todos os líquidos e superfícies avaliadas. As medidas foram realizadas à temperatura de 25 °C. Foram feitas três repetições para cada líquido em cada superfície.

2.3.2. Medida do ângulo de contato para micro-organismos

Para a medição do ângulo de contato da superfície das células bacterianas, as medidas foram realizadas sobre uma camada de células vegetativas usando o método descrito por Busscher *et al.* (1984). Primeira-

mente, as espécies foram ativadas, três vezes em caldo BHI com a finalidade de obter-se uma suspensão da cultura ativa com, aproximadamente, 10^7 UFC/mL. Posteriormente, 30 mL da suspensão ativa foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 10 min, sendo em seguida lavada por três vezes em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M. A massa celular foi ressuspendida neste mesmo tampão sendo depositada sobre um filtro de membrana de acetato celulose de $0,45 \mu\text{m}$ de poro e 47 mm de diâmetro por filtração utilizando pressão negativa. Foram adicionados 30 mL de água ultrapura no momento da filtração. Para padronizar o conteúdo de umidade, os filtros foram transferidos para Placas de Petri contendo 1% de ágar (p/v) e 10% de glicerol (v/v). As membranas foram cortadas em três partes sendo cada parte usada para medição do ângulo de contato com cada líquido diferente. As medidas de ângulos de contato foram realizadas para três líquidos com diferentes polaridades (água, formamida e α -bromonaftaleno).

2.3.3. Determinação do ângulo de contato

A energia livre de interação hidrofóbica ΔG_{sas}^{TOT} entre as moléculas da superfície (s) imersa em água (w) foi calculada pelo somatório das componentes apolar e polar da energia livre de interação, ΔG_{sas}^{LW} e ΔG_{sas}^{AB} respectivamente (van Oss, 1994).

$$\Delta G_{sas}^{tot} = \Delta G_{sas}^{LW} + \Delta G_{sas}^{AB} \quad (1)$$

Aplicando as equações 2 e 3, foi possível chegar ao valor de ΔG_{sas}^{tot} ou ΔG_{bab}^{tot} e predizer em relação à hidrofobicidade de um substrato (s) ou de uma superfície celular (b):

$$\Delta G_{sws}^{LW} = -2\sqrt{\gamma_s^{LW} - \gamma_w^{LW}} \quad (2)$$

$$\Delta G_{sws}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_s^-}\right) \quad (3)$$

Os componentes da tensão interfacial das superfícies nas condições avaliadas foram determinados pela Equação 4.

$$(1 + \cos \theta) \gamma_1 = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+}) \quad (4)$$

Para se determinar as três componentes da tensão interfacial das superfícies determinou-se o ângulo de contato formado por três líquidos de polaridades diferentes.

Com os valores contidos na Tabela 1 aplicando-se a Equação 4 para cada um dos líquidos usados chegou-se ao seguinte sistema de equações:

$$a) \gamma_s^{LW} = 11,1(1 + \cos \theta_B)^2 \quad (5)$$

$$b) 5,049\sqrt{\gamma_s^+} + 5,049\sqrt{\gamma_s^-} = 36,4(1 + \cos \theta_w) - 15,55(1 + \cos \theta_B) \quad (6)$$

$$c) 6,293\sqrt{\gamma_s^+} + 1,510\sqrt{\gamma_s^-} = 29(1 + \cos \theta_F) - 20,806(1 + \cos \theta_B) \quad (7)$$

Tabela 1 – Componentes da tensão de interfacial de líquidos de diferentes polaridades a 25 °C

Líquido	Tensão Interfacial (mJ/m ²)			
	γ_1^{Tot}	γ_1^{LW}	γ_1^+	γ_1^-
α -Bromonaftaleno	44,40	44,40	0,00	0,00
Água	72,80	21,80	25,50	25,50
Formamida	58,00	39,00	2,28	39,60

Pela resolução destas três últimas equações, tiveram-se as três componentes da tensão interfacial da superfície, γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^- , que permitiram calcular a tensão interfacial global de uma superfície (s), γ_s^{TOT} .

A partir dos valores das componentes da tensão interfacial foi possível determinar a ($\Delta G_{\text{adesão}}$) entre as duas superfícies: célula microbiana (b) e superfícies de processamento (s):

$$\gamma_{bs} = \gamma_{bs}^{\text{LW}} + \gamma_{bs}^{\text{AB}} \quad (8)$$

$$\gamma_{bs}^{LW} = \gamma_b^{LW} + \gamma_s^{LW} - 2\sqrt{\gamma_b^{LW}\gamma_s^{LW}} \quad (9)$$

$$\gamma_{bs}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_b^+\gamma_b^-} + \sqrt{\gamma_s^+\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^+\gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_b^-\gamma_s^+}\right) \quad (10)$$

em que γ_{bs} é a tensão interfacial entre as superfícies bactéria/superfície de adesão; γ_{bs}^{LW} é a componente apolar, interação de Lifshitz-van der Waals entre bactéria e superfície; γ_s^{AB} é a componente polar (interação de ácido base de Lewis) entre bactéria e superfície e γ^+ refere-se ao parâmetro receptor de elétrons e γ^- refere-se ao parâmetro doador de elétrons da tensão superficial de uma substância.

As mesmas equações (8, 9 e 10) foram empregadas no cálculo da tensão interfacial entre as superfícies bactéria/líquido (γ_{bl}) e tensão interfacial entre as superfícies superfície de adesão/líquido γ_{sl} .

Como a energia livre está diretamente relacionada à tensão interfacial, $\Delta G_{adesão}$ pode ser representado da seguinte forma:

$$\Delta G_{adesão} = \Delta G_{bls}^{LW} + \Delta G_{bls}^{AB} \quad (11)$$

$$\Delta G_{bls}^{LW} = \gamma_{bs}^{LW} - \gamma_{bl}^{LW} - \gamma_{sl}^{LW} \quad (12)$$

$$\Delta G_{bls}^{AB} = \gamma_{bs}^{AB} - \gamma_{bl}^{AB} - \gamma_{sl}^{AB} \quad (13)$$

O valor de $\Delta G_{adesão}$ permite fazer uma avaliação termodinâmica do processo de adesão, sendo esta termodinamicamente favorável quando $\Delta G_{adesão} < 0$ e, ao contrario, desfavorável quando $\Delta G_{adesão} > 0$.

2.4. Análise estatística dos resultados

Os experimentos foram conduzidos em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (teste F) a 5% de probabilidade e uma vez constatados o efeito significativo do tratamento, aplicou-se então o teste Tukey, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas no software estatístico SAS[®] (*Statistical Analytical Software, version 9.1*).

No primeiro experimento, comparou-se a energia livre total de interação (ΔG_{sas}^{TOT}) para as diferentes superfícies condicionadas e no segundo experimento comparou-se o valor obtido de energia livre (ΔG_{sas}^{TOT}) para cada bactéria. Já no terceiro e último experimento, comparou-se a energia livre de adesão das diferentes superfícies condicionadas para cada tipo de bactéria.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que as nanopartículas de prata foram capazes de promover a redução do ângulo de contato do aço inoxidável condicionado com água de 73,20° para 12,10° quando condicionado com as nanopartículas (Tabela 2). É importante enfatizar que há efeito sinérgico das nanopartículas e do surfactante nesta redução, uma vez a superfície condicionada apenas com o Dotab apresentou redução para 16,50°. Esses baixos valores do ângulo de contato indicam que houve aumento na interação entre as moléculas presentes na superfície do aço inoxidável e a camada de água que solvata esta interface, o que implica em aumento da molhabilidade desta superfície.

Analisando a interação global ΔG_{sas}^{TOT} (mJ/m²), após o condicionamento das superfícies, observou-se que quando foram utilizadas as soluções do surfactante Dotab e dispersões de nanopartículas de prata, a superfície de aço inoxidável tornou-se hidrofílica (Tabela 3) ($\Delta G_{sas}^{TOT} > 0$), sendo mais hidrofílica ($p < 0,05$) após a cobertura formada de nanopartículas de prata (41,460 mJ/m²). O maior valor de ΔG_{sas}^{AB} proporcionado pelo filme de nanopartículas é decorrente de um empacotamento dos monômeros de Dotab nesta interface, ou seja, há maior número de monômeros do surfactante por unidade de área que promoveu aumento na hidrofílicidade desta superfície (Figura 1).

Tabela 2 – Valores dos ângulos de contato entre superfícies de aço inoxidável condicionadas e água ou formamida ou α -bromonaftaleno

Superfícies	Água (°)	Formamida (°)	α -bromonaftaleno (°)
Aço inoxidável condicionado com água	73,20 \pm 1,3	36,30 \pm 1,7	31,62 \pm 0,8
Aço inoxidável condicionado com Dotab	16,50 \pm 0,1	26,60 \pm 1,1	48,30 \pm 2,1
Aço inoxidável condicionado com nanopartículas	12,10 \pm 0,5	23,70 \pm 0,5	21,57 \pm 0,4

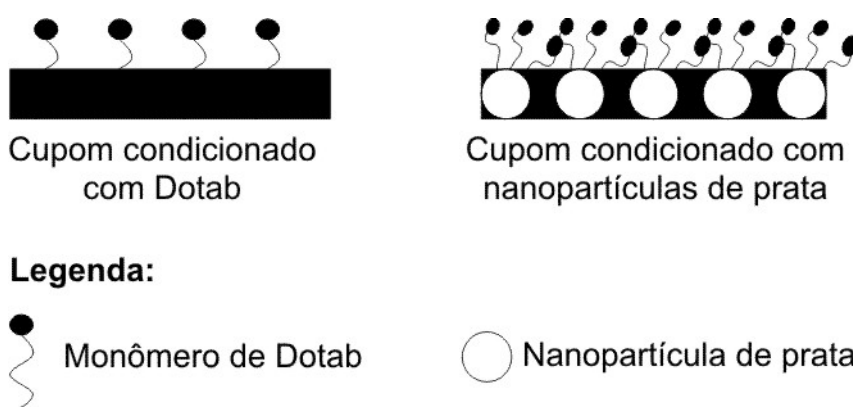


Figura 1 – Representação de cupons de aço inoxidável condicionados com Dotab e condicionados com nanopartículas de prata.

Tabela 3 – Valores dos componentes apolares (ΔG_{sas}^{LW}) e polares (ΔG_{sas}^{AB}) da energia livre total de interação das superfícies condicionadas de aço inoxidável

Superfícies	ΔG_{sas}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{sas}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{sas}^{TOT} (mJ/m ²)
Aço inoxidável condicionado com água	-4,493	-42,349	-46,842 ^a
Aço inoxidável condicionado com Dotab	-1,545	37,161	35,616 ^c
Aço inoxidável condicionado com nanopartículas	-6,202	47,662	41,460 ^b

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Em relação às espécies bacterianas estudadas, todas foram consideradas hidrofílicas tanto pelo valor do ângulo de contato com a água quanto pelo valor de ΔG_{sas}^{TOT} (Tabelas 4 e 5), sendo *S. aureus* a espécie mais hidrofílica e

Tabela 4 – Valores dos ângulos de contato entre diferentes superfícies bacterianas e água, formamida e α -bromonaftaleno

Bactérias	Água (°)	Formamida (°)	α -bromonaftaleno (°)
<i>S. aureus</i>	22,40 \pm 0,3	41,90 \pm 2,1	44,03 \pm 1,6
<i>E. coli</i>	16,53 \pm 0,8	22,30 \pm 0,7	52,07 \pm 3,1
<i>P. aeruginosa</i>	17,68 \pm 0,1	16,23 \pm 0,2	42,73 \pm 1,8
<i>L. innocua</i>	23,20 \pm 0,3	16,77 \pm 0,3	44,47 \pm 1,6

Tabela 5 – Valores dos componentes apolares (ΔG_{sas}^{LW}) e polares (ΔG_{sas}^{AB}) da energia livre total de interação das superfícies bacterianas

Superfícies	ΔG_{sas}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{sas}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{sas}^{TOT} (mJ/m ²)
<i>S. aureus</i>	-2,239	58,818	56,579 ^a
<i>E. coli</i>	-1,010	30,921	29,911 ^b
<i>P. aeruginosa</i>	-2,464	29,379	26,915 ^b
<i>L. innocua</i>	-2,164	24,135	21,971 ^c

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

L. innocua a menos hidrofílica. É importante mencionar que a análise de hidrofobicidade de bactérias não permite um grupamento das espécies de acordo com sua taxonomia microbiológica, demonstrando que generalizações em relação às propriedades hidrofóbicas e ácido-base da célula microbiana não podem ser feitas.

Sinde e Carballo (2000) demonstraram o efeito de hidrofobicidade na adesão de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* ao aço inoxidável, borracha e politetrafluor-etileno, que são superfícies tipicamente encontradas na indústria de alimentos. Eles observaram que as espécies de *Salmonella* são hidrofóbicas, assim como *L. monocytogenes* e que maior adesão ocorreu nas superfícies mais hidrofóbicas.

O tratamento de superfícies com irradiação de 50 keV Ar⁺ e por tratamento de plasma-O₂ foi realizado para polihidroximetilsiloxano (PHMS) e polietilenotereftalato (PET). O PET foi utilizado, pois seu caráter hidrofóbico não é afetado após aplicação de ambos os tratamentos. As modificações químicas induzidas pela irradiação mudaram drasticamente a energia livre das superfícies. A superfície PHMS antes do tratamento apresentava alta

hidrofobicidade, em virtude da orientação dos grupos metil na superfície. Esta superfície tornou-se moderadamente hidrofílica após a irradiação e muito hidrofílica após tratamento com plasma. Por outro lado, a molhabilidade do PET não teve mudanças significativas após a irradiação e aumentou levemente após o tratamento com plasma. Em ambos os tratamentos para PHMS, a energia livre da superfície aumentou. Este efeito é devido ao aumento das forças dispersivas Lifshitz-van der Waals e polar de Lewis. No caso da superfície de PET, as modificações da energia livre foram menos pronunciadas, no entanto os componentes dispersivos e polares tiveram pequenas variações (CARNAZZA *et al.*, 2005).

Nas bactérias, essencialmente são as biomoléculas da parede celular que determinam as propriedades da superfície. Entretanto, as condições de multiplicação microbiana afetam o sistema de síntese da parede que por sua vez afetam os polímeros aniônicos e as enzimas presentes na parede celular do micro-organismo. As características da superfície dependem do pH da cultura e do estado energizado da membrana. Mudanças nas propriedades de superfície induzidas por diferentes valores de pH do ambiente de multiplicação celular pode explicar aumento na adesão à superfície.

No nosso trabalho observou-se também que a termodinâmica de adesão tornou-se desfavorável para todas as bactérias nas superfícies condicionadas com surfactante e nanopartículas de prata, sendo mais desfavorável ainda quando o aço inoxidável foi coberto com película de nanopartículas de prata (Tabela 6).

Esta termodinâmica desfavorável pode ser devido ao fato das duas superfícies interagentes (aço inoxidável e bacteriana) terem apresentado características hidrofílicas. Sabe-se que para estabelecer o contato entre a superfície celular e superfície de aço, o filme de água que reveste deve ser removido. Assim, como as duas superfícies são hidrofílicas, a camada de água interagindo fortemente com ambas as superfícies dificulta a remoção. Portanto, há maior gasto energético para a dessolvatação da interface bacteriana e, a adesão e conseqüente formação de biofilmes são controladas.

A hidrofobicidade de diferentes espécies de bactérias representativas dos principais gêneros isoladas de uma ordenhadeira mecânica foi estudada assim como a hidrofobicidade dos seguintes materiais: borracha, aço inoxidável

Tabela 6 – Energia livre de adesão (mJ/m^2) entre diferentes espécies e superfícies de aço inox condicionadas com água, Dotab e nanopartículas de prata

Espécie Bacteriana/Superfície	Energia Livre de Adesão (mJ/m^2)		
	$\Delta G_{\text{bls}}^{\text{LW}}$	$\Delta G_{\text{bls}}^{\text{AB}}$	$\Delta G_{\text{adesão}}$
<i>S.aureus</i> /aço_água	-3,1711	-7,8714	-11,0424 ^c
<i>S.aureus</i> /aço_Dotab	-1,8598	12,7542	10,8944 ^b
<i>S.aureus</i> /aço_nanopartículas	-3,7270	21,9534	18,2264 ^a
<i>E.coli</i> /aço_água	-2,1298	-3,2709	-5,4007 ^c
<i>E.coli</i> /aço_Dotab	-1,2491	9,1560	7,9069 ^b
<i>E.coli</i> /aço_nanopartículas	-2,5032	17,5295	15,0263 ^a
<i>P.aeruginosa</i> /aço_água	-3,3267	-7,4436	-10,7703 ^c
<i>P.aeruginosa</i> /aço_Dotab	-1,9511	5,9336	3,9825 ^b
<i>P.aeruginosa</i> /aço_nanopartículas	-3,9098	14,1424	10,2324 ^a
<i>L.innocua</i> /aço_água	-3,1176	-8,0387	-11,1563 ^c
<i>L.innocua</i> /aço_Dotab	-1,8284	4,4702	2,6417 ^b
<i>L.innocua</i> /aço_nanopartículas	-3,6641	12,4123	8,7482 ^a

Médias seguidas por letras iguais para cada micro-organismo não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

AISI 316 e AISI 304, vidro e polimetilmetacrilato. Em relação à hidrofobicidade das bactérias, todas as espécies de *Lactobacillus lactis lactis* bem como de *Enterococcus faecalis* foram consideradas hidrofóbicas. As espécies de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus sciuri* apresentaram valores variados para a hidrofobicidade, tendo estirpes da mesma espécie classificadas como hidrofóbicas, enquanto outras foram hidrofílicas. Todos os materiais avaliados foram hidrofóbicos, sendo a borracha, aço inoxidável AISI 316 e AISI 304 as superfícies mais hidrofóbicas e o vidro a superfície mais hidrofílica. A energia livre de adesão entre a bactéria e os materiais em meio aquoso foi calculado a fim de prever qual a superfície possui maior capacidade para a formação de biofilmes. Para todas as situações estudadas, a adesão foi termodinamicamente favorável ao aço inoxidável AISI 316, AISI 304 e à borracha e menos favorável nas superfícies de polimetilmetacrilato e vidro (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

A implantação do íon N^+ , O^+ , SiF_3^+ na superfície do aço inoxidável AISI 316 foi investigada por Zao *et al.* (2008), uma vez que os íons implantados tornam a superfície menos atrativa para a bactéria afetando o processo de

adesão. Uma das razões é que a implantação do íon reduz a energia livre da superfície, influencia a molhabilidade e diminui a rugosidade da superfície. Neste estudo, a dose e a energia de implantação dos íons foram de 10^{16} íons/cm² e 30 KeV, respectivamente. Todas as superfícies avaliadas apresentaram-se lisas e com morfologia uniforme. A rugosidade das superfícies R_a para os íons implantados N^+ , O^+ , SiF_3^+ foram 200, 129 e 36 Å respectivamente. Com relação à energia da superfície, não houve diferença ($p > 0,05$) no componente apolar da superfície, entretanto, o componente polar para SiF_3^+ foi o menor componente entre as superfícies avaliadas. Como resultado, a energia total da superfície de aço inoxidável com SiF_3^+ implantado foi a menor (48,30 mN/m) enquanto para os outros sistemas foram 56,10 mN/m para N^+ implantado e 54,23 mN/m para O^+ implantado. Os autores também observaram que a superfície com a presença do íon SiF_3^+ apresentou a melhor redução da adesão bacteriana. Neste estudo, a adesão bacteriana reduziu com a diminuição da energia da superfície. As superfícies com íons implantados apresentaram melhores resultados que as superfícies controle, quanto à adesão. Os autores concluíram que a superfície de aço inoxidável com SiF_3^+ pode exercer importante função na redução de células aderidas.

Deve-se destacar também que neste trabalho foi estudado apenas um fator termodinâmico que influencia no processo de adesão. Além dos aspectos termodinâmicos, outros fatores podem afetar o mecanismo do fenômeno de adsorção, como a presença de apêndices celulares que são capazes de sobrepor a repulsão eletrostática entre as superfícies e facilitar a adesão.

Diante dos resultados obtidos, observou-se que as nanopartículas de prata apresentaram vantagens no uso para condicionamento de superfícies de processamento de alimentos. Além de alterar a hidrofobicidade da superfície que foi importante para dificultar o processo de adesão celular, as nanopartículas de prata apresentam amplo espectro antimicrobiano.

A partir da análise dos resultados obtidos sugere-se o uso de nanopartículas de prata como mais uma alternativa de agente químico no procedimento de sanitização, devido ao seu efeito antimicrobiano nas superfícies que entram em contato com os alimentos. Outra aplicação poderia ser também para

a imersão de formas de queijos, por exemplo, que são amplamente empregadas nos laticínios, bem como para sanitização de utensílios empregados no processamento mínimo de frutas e hortaliças antes do seu uso a fim de reduzir possíveis contaminações. Portanto, o uso de nanopartículas de prata na indústria de alimentos poderá contribuir com uma etapa adicional nas barreiras que são impostas à contaminação microbiana.

4. CONCLUSÃO

As nanopartículas de prata usadas para o condicionamento de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4 podem ser consideradas eficientes no controle microbiológico das espécies avaliadas uma vez que tornou o processo de adesão termodinamicamente desfavorável, sugerindo ser uma estratégia interessante para o controle da adesão e consequente formação de biofilmes em indústria de alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BERRA, L.; CURTO, F.; BASSI, G. L.; PITTS, B.; BACCARELLI, A., KOLOBOW, T. Antimicrobial-coated endotracheal tubes: an experimental study. **Intensive Care Medicine**, v. 34, p.1020-1029, 2008.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H.; VAN DER, MEI H. C.; VAN PELT, A. W.; DE JONG, H. P.; ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 980-983, 1984.

CARNAZZA, S.; SATRIANO, C.; GUGLIELMINO, S.; MARLETTA, G. Fast exopolysaccharide secretion of *Pseudomonas aeruginosa* on polar polymer surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 289, p. 386-393, 2005.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Minho, 2004.

DAS, S. K.; BHOWAL, J.; DAS, A. R.; GUHA, A. K.; Adsorption behavior of rhodamine B on *Rhizopus oryzae* biomass. **Langmuir**, v. 22, p. 7265-7272, 2006.

DUFRENE, Y. F.; Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 317-323, 2003.

GUZMÁN, M. G.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. **International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2 n. 3, p. 104-111, 2009.

JIANG, H.; MANOLACHE, S.; WONG, A. C. L.; DENES, F. S. **Plasma-enhanced deposition of silver nanoparticles onto polymer and metal surfaces for the generation of antimicrobial characteristics**. Publicação on line: Wiley InterScience (disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>). Acesso em: 6 jun. 2010.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v. 68, p. 337-348, 1971.

NORDE, W.; **Colloids and interfaces in life sciences**, Marcel Dekker, Inc: New York, 2003.

OLIVEIRA, K. M. P. **Adesão de *Salmonella enteritidis* em diferentes superfícies de processamento de alimentos**. 2006. 115 f. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2006.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, p.439-447, 2000.

SOMASUNDARAN, P.; MARKOVIC, B.; YU, X.; KRISHNAKUMAR, S. In BIRDI, K. S. (Ed.) **Handbook of Surface and Colloid Chemistry**, CRC Press: Lincoln, 2003.

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

TEIXEIRA, P.; LOPES, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M. J.; Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. **Food Microbiology**, v. 22, p. 247-251, 2005.

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

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. **Interfacial forces in aqueous media**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994. 440 p.

van OSS, C. J.; GIESE, R. F. The Hydrophilicity and Hydrophobicity of Clay Minerals. **Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VICENT, B. **Colloid science**: principles, methods and applications. Cosgrove, T. (Ed.) Blackwell Publishing: Ames, 2005.

ZHAO, Q.; LIU, Y.; WANG, C.; PENG, N.; JEYNES, C. Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. **Medical Engineering & Physics**, v. 30, p. 341-349, 2008.

3. CONCLUSÃO GERAL

Nanopartículas de prata foram obtidas por uma metodologia nova e simples e foram caracterizadas e confirmadas pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho, espalhamento dinâmico de luz, microscopia de transmissão eletrônica e difração de raios-X. As micelas de DOTAB catalisaram a reação, caracterizando-se a síntese como uma reação de catálise micelar e, além disso, as micelas do surfactante agiram como estabilizantes das nanopartículas formadas. O diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas variou de 2,8 – 4,4 nm.

As nanopartículas de prata obtidas pela nova metodologia apresentaram também ação antimicrobiana contra as espécies *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Salmonella Choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* e foram eficientes para o condicionamento de superfície de aço inoxidável AISI 304 #4, uma vez que tornaram o processo de adesão termodinamicamente desfavorável. Sugerem-se as nanopartículas de prata como uma estratégia interessante para o controle da adesão e consequente formação de biofilmes em indústria de alimentos, podendo ser empregadas na sanitização de utensílios que entrarão em contato com os alimentos.