



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Rachel Ouvinha de Oliveira

**Preparação e avaliação biocida de compósitos à base de resinas reticuladas contendo nanopartículas de prata**

Rio de Janeiro

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Rachel Ouvinha de Oliveira

**Preparação e avaliação biocida de compósitos à base de resinas reticuladas contendo nanopartículas de prata**

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio de Santa Maria

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

O48 Oliveira, Rachel Ouvinha de.  
Preparação e avaliação biocida de compósitos à base de resinas reticuladas contendo nanopartículas de prata. / Rachel Ouvinha de Oliveira. - 2010.  
121 f.

Orientador : Luiz Claudio de Santa Maria.  
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Nanopartículas - Teses. 2. Bactericidas – Teses. 3. Prata - Teses. 4. Compósitos poliméricos – Teses. 5. Química ambiental – Teses. I. Santa Maria, Luiz Claudio de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. III. Título.

CDU577. 4

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

---

Data

Rachel Ouvinha de Oliveira

**Preparação e avaliação biocida de compósitos à base de resinas reticuladas contendo nanopartículas de prata**

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química Ambiental.

Aprovada em \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Claudio de Santa Maria (Orientador)  
Departamento de Química Orgânica da UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fabio Merçon  
Departamento de Tecnologia de Processos Bioquímicos da UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edwin Gonzalo Azero Rojas  
Departamento de Ciências Naturais da UNIRIO

Rio de Janeiro

2010

## DEDICATÓRIA

A todos aqueles que acreditaram e tornaram possível a realização deste trabalho, em especial aos meus pais Djalma e Marcia.

Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza - e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade - é saber que outros crêem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos.

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado iluminando os meus caminhos. A Ele toda honra e toda glória.
- Aos meus pais e irmão por todo amor, companheirismo e esforço dedicado a me tornar o que sou hoje.
- Ao meu namorado pelo carinho, amor, dedicação, atenção e por sempre me compreender mesmo nos momentos de ausência para a conquista de meus ideais.
- Ao meu orientador e mestre Prof. Luiz Claudio de Santa Maria, modelo de profissionalismo e competência, pela orientação, oportunidade, confiança, amizade e por sempre acreditar e contribuir na realização dos meus projetos e sonhos.
- As queridas amigas Ana Lucia e Aline Sol, sempre dispostas a ajudar e trocar informações, pelo treinamento na metodologia microbiológica.
- A Prof<sup>a</sup> Luciana da Cunha, com quem tive o prazer de trabalhar e dividir o espaço no laboratório; pela amizade, paciência, apoio e pelos conhecimentos transmitidos.
- Aos alunos de iniciação científica Philippe Campos e Raquel Galvão com que tive o prazer de co-orientar.
- Aos alunos de iniciação científica Leandro e Dominique.
- Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Ambiental: Dolores, Maria Elena, Eduardo, Soraia, Alexandre e Érica.
- Ao Departamento de Tecnologia de Processos Bioquímicos: Prof. Fábio Merçon, Prof<sup>a</sup>. Márcia Gonçalves e aos técnicos de laboratório Flávia e Veiga. Todos contribuíram de forma única e muito me ensinaram.
- Aos professores Fábio Merçon, Edwin Gonzalo Azero Rojas, Viviane Gomes Teixeira e Marcos Antônio da Silva Costa por aceitarem o convite para participar da banca examinadora.
- A Lorna e Mônica Machado do Laboratório de Caracterização Instrumental I (IQ/UERJ) pelas análises termogravimétricas (TGA).
- Ao Eduardo Castello Branco do Laboratório de Caracterização Instrumental II (IQ/UERJ) pelas análises de ASAP e CHNS.



- Ao Prof. Hernane S. Barud do Instituto de Química da UNESP pelas análises de TGA e DRX.
- Ao José Luiz Mantovano do Instituto de Energia Nuclear IEN, responsável pelas análises de fluorescência de raios x.
- À Prof<sup>a</sup>. Márcia Amorim, Flávia e Lessandra pelo auxílio nas análises de microscopia ótica.
- À Prof<sup>a</sup>. Wang Shu Hui do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.
- À Lígia Reis pela doação da cepa de *Escherichia Coli* fornecida pelo Laboratório de análises clínicas LAGO LAB.
- Ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Química.
- Aos colegas do curso de Mestrado em Química.
- Ao secretário da Pós-Graduação, Luiz e aos funcionários do IQ-UERJ e da biblioteca do IQ-UERJ.
- À CAPES, FAPERJ, CNPQ e UERJ, pelos auxílios concedidos.
- A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação.

## RESUMO

OUVINHA DE OLIVEIRA, Rachel. *Preparação e avaliação biocida de compósitos à base de resinas reticuladas contendo nanopartículas de prata*. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Neste trabalho, foram utilizadas três resinas reticuladas comerciais de troca iônica e caráter ácido à base de estireno e divinilbenzeno: Amberlite®GT73 da *Rohm and Haas Co.* com grupo tiol, Lewatit® VPOC1800 da *Bayer Co.* com grupo sulfônico e Amberlyst® 15WET da *Rohm and Haas Co.* também com grupo sulfônico. As citadas resinas comerciais foram escolhidas por apresentarem grande capacidade de troca iônica, estabilidade e grupos funcionais de interesse para a introdução de íons  $\text{Ag}^+$ . As resinas foram tratadas com ácido clorídrico para garantir as formas ácidas de seus grupos funcionais e em seguida a redução dos íons  $\text{Ag}^+$ , provenientes de solução de nitrato de prata, foi realizada *in situ* pela hidroxilamina em presença de solução protetora de colóide composta por 2-hidróxi-etil-celulose e gelatina 1:1. Alguns parâmetros foram modificados durante a redução dos íons  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , como por exemplo, o tempo de adição da solução redutora de hidroxilamina, a solução utilizada para controle do pH, e condições do repouso após o controle do pH. Após a incorporação das nanopartículas de prata, tanto as resinas comerciais quanto o produto final foram caracterizados por titulometria, fluorescência de raios-x, análise termogravimétrica, análise elementar, grau de inchamento, difração de raios-x, microscopias ótica e eletrônica. A avaliação da atividade biocida foi realizada através do método da contagem em placas utilizando-se uma cepa de *Escherichia Coli* ATCC®25922™ em concentrações de  $10^3$  a  $10^7$  células/mL. Todos os compósitos obtidos mostraram atividade bactericida significativa, sendo que foi possível perceber que a ação bactericida dos compósitos está relacionada com a presença de prata na forma metálica e a características como tamanho, formato e dispersão das partículas na matriz polimérica. Para efeito de comparação, foram realizados ensaios bactericidas com os copolímeros de partida e assim foi comprovado que a ação bactericida pôde ser atribuída somente às nanopartículas de prata.

Palavras-chave: Nanopartículas, prata, bactericida.

## ABSTRACT

In this study, three commercial cross-linked ion exchange resins with acid character based on styrene divinylbenzene were used: Amberlite®GT73 from Rohm and Haas Co. with thiol group, Lewatit ® VPOC1800 Bayer Co. and Amberlyst ® 15WET Rohm and Haas Co. both with sulfonic group. These commercial resins were chosen because they have a high ion exchange capacity, stability and good functional groups for the introduction of Ag<sup>+</sup> ions. The resins were treated with hydrochloric acid to ensure its acidic functional groups and then to procedure the reduction of Ag<sup>+</sup> ions. The silver ions were coming from solution of silver nitrate and the reduction was carried out *in situ* by hydroxylamine in the presence of protective agent 1:1 solution composed of 2-hydroxyethylcellulose and gelatin. Some parameters were changed during the reduction of Ag<sup>+</sup> ions to Ag<sup>0</sup>, for example, the time of addition of hydroxylamine solution, the solution used for pH control, and conditions that the solution was left at rest after controlling the pH. After the incorporation of silver nanoparticles, both commercial resins and the final product were characterized by titration, fluorescence x-ray, thermal analysis, elemental analysis, swelling degree, X-ray diffraction, optical and electron microscopy. The evaluation of biocidal activity was performed using the viable plate count method and a strain of *Escherichia coli* ATCC® 25922™ at concentrations from 10<sup>3</sup> to 10<sup>7</sup> cells/mL. All composites showed significant bactericidal activity, and it is noted that the bactericidal action of the composites is related to the presence of silver in metallic form and characteristics such as size, shape and dispersion of particles in the polymer matrix. Tests were performed also with the commercial resins and it was verified that bacterial action could be attributed only to silver nanoparticles.

Keywords: Nanoparticles, silver, bactericidal

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Relógio elétrico com revestimento em baquelite	24
Figura 2	Exemplos de materiais micrométricos e nanométricos	27
Figura 3	Representação esquemática do aumento da superfície	28
Figura 4	Diferentes colorações das soluções contendo nanopartículas de ouro de acordo com o tamanho das partículas	29
Figura 5	Representação de dois mecanismos de estabilização de partículas em soluções coloidais	31
Figura 6	Mudanças na atividade respiratória em <i>E. coli</i> e <i>V. cholerae</i>	37
Figura 7	Interação entre $Ag^+$ e célula bacteriana	38
Figura 8	Microscopia Eletrônica de Transmissão de <i>E.Coli</i> após tratamento com nanopartículas de prata	38
Figura 9	Possíveis mecanismos de atividade antimicrobiana exercidos pela prata	39
Figura 10	MEV de uma mistura de prata esférica e cilíndrica (A) e MET de partículas de prata com facetas triangulares (B)	40
Figura 11	Número de publicações em diferentes assuntos referentes às nanopartículas, até dezembro de 2008	43
Figura 12	tubo de ensaio contendo a coluna de eluição	58
Figura 13	Contador de colônias utilizado para contagem de UFC	60

Figura 14	Ilustração da obtenção de nanopartículas de prata através da formação de complexo $[Ag(NH_3)_2]^+$ suportadas em matriz polimérica contendo grupo sulfônico	66
Figura 15	Ilustração da obtenção de nanopartículas de prata em presença de $Ag_2O$ suportadas em matriz polimérica contendo grupo sulfônico	67
Figura 16	Microscopias óticas do copolímero 15WET e seus derivados contendo prata	71
Figura 17	Microscopias óticas do copolímero VPOC e seus derivados contendo prata	72
Figura 18	Microscopias óticas do copolímero GT73 e seus derivados contendo prata	73
Figura 19	MEV-EDX da amostra WET 1, respectivamente: A) MEV com magnitude 1000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero	75
Figura 20	MEV-EDX da amostra WET 2, respectivamente: A) MEV com magnitude 1000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero.	76
Figura 21	MEV-EDX da amostra VPOC 1, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da superfície do copolímero	77
Figura 22	MEV-EDX da amostra VPOC 2, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da superfície do copolímero	78
Figura 23	MEV-EDX da amostra GT73 1, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero	79

Figura 24	MEV-EDX da amostra GT73 2, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero	80
Figura 25	MEV-EDX da amostra GT73 3, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero	81
Figura 26	MEV-EDX da amostra GT73 4, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero	82
Figura 27	Gráficos de DRX dos compósitos contendo prata	84
Figura 28	Esquema de resultados para confirmação da pureza das cepas	93
Figura 29	Formação de bolhas e turbidez acentuada pela ATCC®25922™ (A), turbidez leve e não formação de bolhas pela OHd5-k-12 (B)	94
Figura 30	Formação de colônias transparentes pela OHd5-k-12 (A), formação de colônias pretas com brilho metálico pela ATCC®25922™ (B)	94
Figura 31	Representação do contato entre partículas de diferentes formatos com a <i>E.coli</i> : esféricas e cilíndricas (A); formato agulha (B)	99
Figura 32	MEV do copolímero VPOC 1 com aumento de 120 X	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Capacidade de troca iônica (IEC) de algumas resinas hidrocarbônicas	34
Tabela 2	Condições de síntese dos copolímeros contendo nanopartículas de prata	51
Tabela 3	Principais características dos três copolímeros utilizados como suporte para as nanopartículas de prata	64
Tabela 4	Códigos das resinas e suas descrições	68
Tabela 5	Caracterização da porosidade dos compósitos	69
Tabela 6	Padrão de picos de DRX da prata e seus óxidos	86
Tabela 7	Teor de prata obtido por titulometria e EDFRX dos compósitos sintetizados	87
Tabela 8	Análise elementar das resinas antes e depois da impregnação com prata	88
Tabela 9	Grau de inchamento das resinas comerciais	89
Tabela 10	Características térmicas dos copolímeros	90
Tabela 11	pH das soluções contendo as resinas de partida antes e depois da neutralização	96
Tabela 12	Ação bactericida dos copolímeros de partida não neutralizados	97
Tabela 13	Ação bactericida dos copolímeros de partida neutralizados	97
Tabela 14	Ação bactericida dos compósitos contendo nanopartículas de prata neutralizados contra suspensão de <i>E.coli</i>	98

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Cálculo de grau de inchamento	53
Equação 2	Cálculo do teor de prata das resinas	55
Equação 3	Redução do número de células viáveis	61



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15WET	Amberlyst®15WET
15WET 1	Derivada da Amberlyst®15WET
15WET 2	Derivada da Amberlyst®15WET
CF	Coliformes Fecais
CHNS	Analisador elementar
CLM	Council of Logistics Management
C <sub>rep</sub>	Condições de repouso
CT	Coliformes Totais
D	Diâmetro médio de poros
DVB	Divinilbenzeno
DTG	Derivada termogravimétrica
EC	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDFRX	Fluorescência de raios X por dispersão de energia
EDX	Espectrômetro de dispersão de energia de raios X
EMB	Eosina Azul de Metileno
GT73	Amberlite®GT73
LST	Lauril sulfato triptose
me <sub>Ag</sub>	Miliequivalente da prata
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MO	Microscopia ótica
M <sub>SCN</sub>	Massa de tiocianato
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
S	Área específica
S <sub>pH</sub>	Solução para controle de pH
STY	Estireno
T <sub>ad</sub>	Tempo de adição
TGA	Análise termogravimétrica
T <sub>onset</sub>	Temperatura inicial de degradação
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFC <sub>f</sub>	Unidades formadoras de colônias após a eluição
UFC <sub>i</sub>	Unidades formadoras de colônias antes da eluição
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
V	Volume de poros
VPOC	Lewatit <sup>®</sup> VPOC1800
VPOC 1	Derivada da Lewatit <sup>®</sup> VPOC1800
VPOC 2	Derivada da Lewatit <sup>®</sup> VPOC1800

Parte desta dissertação foi submetida para publicação no seguinte periódico:

- Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia; sob o título: “Preparation and bactericidal effect of composites based on crosslinked copolymers containing silver nanoparticles”.

Parte desta dissertação foi apresentada nos seguintes eventos:

- Colóquio Franco-Brasileiro de Polímeros e Meio Ambiente, Rio de Janeiro / RJ, 2009 sob o título:  
“Modificação e caracterização de polímeros contendo nanopartículas de prata e avaliação de sua atividade biocida”.
- XII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, Rio de Janeiro / RJ, 2009 sob o título:  
“Modificação e caracterização de polímeros contendo nanopartículas de prata”.

Durante a realização da parte experimental desta Dissertação, a autora teve a oportunidade de co-orientar os trabalhos de Iniciação Científica (PIBIC/UERJ) dos alunos relacionados abaixo:

- Philippe C. de Oliveira, aluno do curso de Engenharia Química do IQ/UERJ.
- Raquel C. Galvão, aluna do curso de Engenharia Química do IQ/UERJ.

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.	<b>OBJETIVO</b> .....	23
1.1.	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
2.	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	24
2.1	<b>Polímeros</b> .....	24
2.2	<b>Nanotecnologia e nanomateriais</b> .....	26
2.2.1.	<u>Propriedades mecânicas</u> .....	28
2.2.2.	<u>Propriedades ópticas</u> .....	29
2.2.3.	<u>Métodos de obtenção</u> .....	29
2.3.	<b>Compósitos de polímeros e nanopartículas metálicas</b> .....	32
2.4.	<b>Introdução de grupos iônicos na unidade estrutural polimérica</b> .....	33
2.5.	<b>Propriedades biocidas da prata</b> .....	34
2.6.	<b>Formas de apresentação da prata vs atividade biocida</b> .....	39
2.7.	<b>Resistência microbiana à prata</b> .....	40
2.8.	<b>Antibióticos e meio ambiente</b> .....	42
2.8.1.	<u>Nanopartículas de prata e o meio ambiente</u> .....	42
3.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
3.1.	<b>Produtos químicos e biológicos</b> .....	46
3.2.	<b>Equipamentos</b> .....	47

3.3.	<b>Procedimentos</b> .....	49
3.3.1.	<u>Modificação das resinas</u> .....	49
3.3.1.1	Ativação das resinas comerciais por acidificação.....	49
3.3.1.2	Impregnação das resinas com Ag <sup>+</sup> .....	50
3.3.1.3	Reação de redução dos íons Ag <sup>+</sup> .....	50
3.4.	<b>Caracterização dos materiais</b> .....	51
3.4.1.	<u>Porosidade e área superficial específica (ASAP)</u> .....	51
3.4.2.	<u>Microscopia ótica (MO)</u> .....	52
3.4.3.	<u>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u> .....	52
3.4.4.	<u>Análise elementar (CHNS)</u> .....	52
3.4.5.	<u>Grau de inchamento (GI)</u> .....	52
3.4.6.	<u>Análise termogravimétrica (TGA)</u> .....	53
3.4.7.	<u>Fluorescência de raios x por dispersão de energia (EDFRX)</u> .....	53
3.4.8.	<u>Titulometria</u> .....	53
3.4.9.	<u>Difratometria de raios x</u> .....	55
3.5.	<b>Ensaio para confirmação da pureza da cepa</b> .....	55
3.6.	<b>Escolha dos meios de cultura</b> .....	56
3.7.	<b>Avaliação da atividade biocida</b> .....	57
3.8.	<b>Ensaio de estabilidade dos copolímeros</b> .....	61
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62
4.1.	<b>Modificação dos copolímeros comerciais</b> .....	62

4.2.	<b>Caracterização dos compósitos e de suas matrizes poliméricas</b> .....	68
4.2.1.	<u>Determinação do grau de porosidade por ASAP</u> .....	68
4.2.2.	<u>Microscopia ótica (MO)</u> .....	70
4.2.3.	<u>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u> .....	75
4.2.4.	<u>Análise do formato das partículas</u> .....	83
4.2.5.	<u>Determinação da composição dos copolímeros</u> .....	86
4.2.6.	<u>Expansão das resinas em água</u> .....	88
4.2.7.	<u>Análise termogravimétrica (TGA)</u> .....	89
4.3.	<b>Escolha da cepa e meios de cultura</b> .....	91
4.4.	<b>Avaliação da atividade biocida</b> .....	95
5.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	101
6.	<b>SUGESTÕES</b> .....	102
7.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103
	<b>ANEXO 1: Curvas de TGA e DTG</b> .....	116

## INTRODUÇÃO

O corpo humano apresenta mais da metade de sua massa composta por água (WATSON *et al.*, 1980). A perda natural de líquidos através da urina, fezes e suor acarreta uma conseqüente necessidade de reposição.

Além de a água representar um fundamental recurso para o funcionamento bioquímico do corpo, também é indispensável para as necessidades sanitárias. De acordo com a *United Nations World Water Development Report* (2003), o ser humano precisa de 20 a 50 litros de água por dia (DAVIDHIZAR *et al.*, 2004). Entretanto, a água pode servir de veículo para agentes patogênicos e, por esta razão, um eficiente mecanismo de desinfecção tanto na água de rejeito, quanto na água consumida se faz necessário.

Ainda que não se tivesse conhecimento sobre como o processo de desinfecção acontecia, há indícios de práticas como o uso de água fervida, desde 500 a.C (LAUBUSCH, 1971). Conforme o conhecimento científico vem sendo ampliado, novas técnicas cada vez mais eficientes estão sendo estudadas e aplicadas.

Uma grande diferença entre a contaminação química e a contaminação biológica das águas é o fato de que a química tende a manter ou até mesmo reduzir o seu fator impactante enquanto a contaminação biológica tende a se multiplicar (WESTBROOKS, 1998), diminuindo as chances de uma recuperação natural, necessitando assim, da intervenção humana.

A contaminação de águas por bactérias pode causar diversas doenças como febre tifóide, disenteria e cólera. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no mundo, 25 % dos leitos hospitalares são ocupados por vítimas de doenças de veiculação hídrica e mais de 5 milhões de pessoas morrem por ano por doenças relacionadas à má qualidade da água e às péssimas condições de higiene (WATSON *et al.*, 1998).

Fontes importantes desta contaminação são os esgotos domésticos, efluentes industriais e hospitalares, sendo a presença de coliformes totais um indicativo de poluição biológica. O esgoto doméstico típico contém de  $10^6$  a  $10^9$  coliformes totais por 100 mL, dependendo do seu nível de poluição (ESCWA, 2003).

A presença de coliformes tem sido detectada em alimentos e água potável (TIMMS *et al.*, 1996), e para evitar níveis prejudiciais à saúde e ao bem estar

humano é necessário um método eficaz de desinfecção da água. Este procedimento permite a reciclagem da água sem que a saúde humana e o meio ambiente sejam prejudicados.

Nanopartículas de prata têm mostrado efeito antibacteriano contra várias espécies de bactérias nocivas (EBY *et al.*, 2009) e têm sido largamente utilizadas na indústria têxtil (GUPTA *et al.*, 2008) e em aplicações médicas (MATIJEVIC, 2008).

As propriedades bactericidas da prata em adição às características dos polímeros como resistência mecânica e baixa massa específica fornecem atributos únicos aos copolímeros contendo nanopartículas de prata que garantem vantagens em relação às técnicas atualmente utilizadas para desinfetar a água, como a cloração, uso de antibióticos e ozonização (SOUZA *et al.*, 2006). A não-formação de subprodutos, o não favorecimento à resistência, a estabilidade química do material e possibilidade de reciclagem são algumas destas vantagens (HU *et al.*, 1999).

Outras características desejáveis nestes compósitos contendo prata são a não toxicidade e impenetrabilidade quando em contato com a pele, garantindo segurança na manipulação, insolubilidade em água evitando a sua perda e consequente despejo em corpos receptores, rápida ação biocida e a possibilidade de regeneração quando houver perda de atividade (KENAWY *et al.*, 2007).

Tendo em vista as técnicas empregadas atualmente para desinfecção de águas, o presente estudo visa o aperfeiçoamento de compósitos com nanopartículas de prata que englobem vantagens e características desejáveis relacionadas à morfologia do compósito, garantindo assim a reprodutibilidade do experimento.

Não há na literatura muita informação a respeito do uso das nanopartículas de prata para remediação ambiental, uma vez que esse procedimento não é amplamente utilizado, dando-se preferência às técnicas convencionais. Por esse aspecto, a pesquisa se torna relevante no sentido de lançar luz sobre a possibilidade de implementação de novas tecnologias eficazes na despoluição microbiológica e menos agressivas ao meio ambiente.

Neste estudo, foram utilizadas três diferentes resinas comerciais à base de estireno e divinilbenzeno como suporte para a impregnação das nanopartículas de prata e, assim, gerar uma classe de compósitos com potencial biocida. Dentre os suportes utilizados, dois possuem grupo funcional sulfônico e um possui grupo funcional tiol, todos com diferentes graus de porosidade. Após intensa pesquisa



sobre o material a ser utilizado como suporte, foram escolhidas as resinas Amberlite®GT73, Amberlyst®15WET (ambas da *Rohm and Haas*) e Lewatit®VPOC1800 (da *Bayer*) por apresentarem grande capacidade de troca iônica, estabilidade e grupos funcionais de interesse para a introdução de íons  $\text{Ag}^+$ . Solução de nitrato de prata foi utilizada como fonte de  $\text{Ag}^+$  e a sua redução foi realizada para que se obtivesse nanopartículas. Os compósitos resultantes foram caracterizados através de diferentes técnicas e avaliados quanto a sua atividade biocida.

## 1. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi sintetizar, caracterizar e avaliar a capacidade biocida de oito compósitos contendo nanopartículas de prata obtidos através da modificação de três polímeros comerciais baseados em estireno e divinilbenzeno. O foco da pesquisa foi produzir compósitos com capacidade de reduzir o número de células viáveis de *Escherichia coli*.

### 1.1 Objetivos específicos

- 1) Modificar os polímeros comerciais por meio de adição de íons  $\text{Ag}^+$  nos grupos funcionais sulfônicos e tiol presentes, usando nitrato de prata como fonte de  $\text{Ag}^+$  e sua posterior redução a  $\text{Ag}^0$ ;
- 2) Caracterizar os copolímeros antes e depois da impregnação da prata e verificar a modificação da sua morfologia;
- 3) Caracterizar os compósitos sintetizados quanto ao teor e dispersão da prata, assim como analisá-los termicamente;
- 4) Desenvolver uma metodologia eficaz contra possíveis contaminações da cepa original de *Escherichia coli*;
- 5) Avaliar a capacidade bactericida dos compósitos antes e depois da adição das nanopartículas de prata usando suspensão com diferentes concentrações de *Escherichia coli*;
- 6) Verificar a relação entre a morfologia, teor e dispersão da prata incorporada sobre a capacidade bactericida dos compósitos obtidos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a realização dos objetivos propostos, procedeu-se a revisão bibliográfica pertinente ao tema em estudo. Inicialmente será apresentado, um breve histórico sobre os polímeros e seu manejo pela sociedade, seguido de nanotecnologia, compósitos poliméricos, antibióticos e resistência bacteriana, propriedades biocidas da prata e sua interação com o meio ambiente. Durante a revisão, serão analisados alguns trabalhos balizadores da importância da obtenção de um novo material biocida para controle e despoluição do meio ambiente.

### 2.1 Polímeros

Os polímeros são abundantes na natureza e em 1000 a.C. os chineses já faziam uso de um verniz natural extraído da árvore *Rhus verniciflua*. Porém, somente no início de século XVIII o primeiro plástico sintético foi produzido pelo belga Leo Baekeland e foi chamado de baquelite. Conhecido como o “material dos mil usos”, aos poucos foi substituindo metais, madeira e vidro pela sua resistência, leveza e facilidade na moldagem. A Figura 1 mostra a imagem de um dos primeiros relógios produzidos com revestimento em baquelite (ELLIS, 1934).

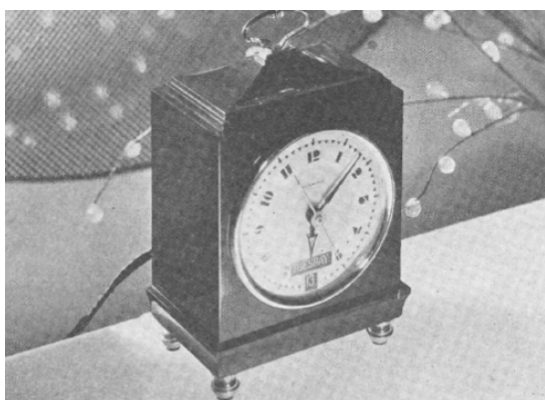


Figura 1: Relógio elétrico com revestimento em baquelite (ELLIS, 1934).

As qualidades dos polímeros como conveniência, baixo preço e estética mostraram-se evidentes e vários polímeros foram sintetizados nos anos seguintes. Contudo, a produção em massa foi desenvolvida apenas durante a Segunda Guerra Mundial quando rodas de borracha sintética, pára-quadras e outros materiais de

guerra foram largamente produzidos. Desde então, a indústria de polímeros é uma das que mais cresce no mundo sendo hoje o volume de plástico produzido anualmente comparado ao do aço (RIPPEL e GALEMBECK, 2009).

O descarte dos polímeros era feito indiscriminadamente até que o volume de lixo descartado proveniente desta fonte e sua conseqüente poluição visual ficaram evidentes. Além disso, a preocupação com as fontes não-renováveis como o petróleo, matéria prima para fabricação de muitos polímeros, tornou o plástico alvo de críticas (MOHANTY *et al.*, 2000).

No entanto, a utilização dos polímeros já se tornara essencial e nos anos 80 os processos de reciclagem e reuso começaram a ser empregados com o intuito de minimizar o impacto ambiental. Inicialmente, a reciclagem era feita pelas próprias indústrias para reaproveitamento das perdas de produção. Todavia, as características que tornaram os polímeros tão atrativos, como a leveza e modelagem em formatos quase ilimitados, fizeram da reciclagem dos plásticos um desafio. Por exemplo, a necessidade de uma pré-seleção dos polímeros assim como a retirada de impurezas são fatores que demandam tempo e energia, tornando o processo dispendioso.

As etapas que envolvem a reciclagem são: coleta, seleção e preparação, reciclagem industrial e reintegração ao ciclo produtivo (CLM, 1993), e para se avaliar a economia proporcionada pela reciclagem fatores como matéria prima, água, controle ambiental, energia, custos de coleta e disposição final do lixo devem ser considerados. Segundo Calderoni (2003), a reciclagem é uma opção favorável comparada com a produção utilizando-se de matérias primas virgens, pois são necessários menos recursos hídricos, matéria prima, energia, reduzindo custos de controle ambiental e disposição final.

A sociedade ciente da adequabilidade, ajuste ou implementação de novas tecnologias iniciou o estudo de polímeros verdes e a produção de biopolímeros começou a ser vista como uma alternativa aos polímeros petroquímicos (MOHANTY *et al.*, 2000). Contudo, até o presente momento, ainda não foi sintetizado um polímero proveniente inteiramente de fontes verdes e que seja 100 % biodegradável mantendo as características dos polímeros tradicionais. Sendo assim, a escolha do tipo de polímero depende das características desejáveis para a sua aplicação.

No caso de controle e despoluição do meio ambiente, os polímeros oferecem uma imensa gama de produtos com morfologia variada. Recentemente, os polímeros quelantes têm despertado a atenção por sua eficiência na remediação de águas e solo. As variadas estruturas, assim como o tipo de ligante, o pH e a solubilidade do polímero devem ser minuciosamente avaliados a fim de maximizar a eficiência e seletividade quando em contato com o meio a ser tratado (ZALLOUM e MUBARAK, 2008; MICIOI, 2007). Especificamente no caso da utilização de polímeros em colunas, são desejadas características como insolubilidade, estabilidade física e química em ampla extensão de temperatura e pH.

## **2.2 Nanotecnologia e nanomateriais**

O estudo da nanotecnologia tem atraído a atenção dos pesquisadores principalmente nas últimas duas décadas. Há um grande interesse econômico e ambiental, pois são necessários novos e mais sofisticados materiais para atender à demanda crescente de tecnologias (WOJCIECHOWSKI, 2000).

Quando a nanotecnologia começou a ganhar espaço, as maiores áreas de atuação eram as de telecomunicações, eletrônica, robótica e informática. Contudo, as características dos nanomateriais possibilitaram um maior campo de estudo também nas áreas química, física e biomédica.

O termo nano aplicado às nanopartículas indica que o objeto de estudo possui pelo menos uma de suas dimensões físicas na ordem de nanômetro, ou seja, uma parte em um bilhão, o que corresponde a um bilionésimo do metro. As nanopartículas são formadas por um número relativamente pequeno de moléculas ou de átomos, constituindo-se de um intermediário entre o átomo e o sólido estendido (POOLE, 2003), também chamado de sólido “bulk”<sup>1</sup>. A Figura 2 demonstra comparativamente materiais naturais em escala micrométrica e nanométrica.

<sup>1</sup>Entende-se por sólido “bulk” um conjunto de partículas sólidas grandes o suficiente para que a média estatística de suas propriedades seja independente do número de partículas. É uma expressão genérica para pós ou granulados (SCHULZE, 2006).

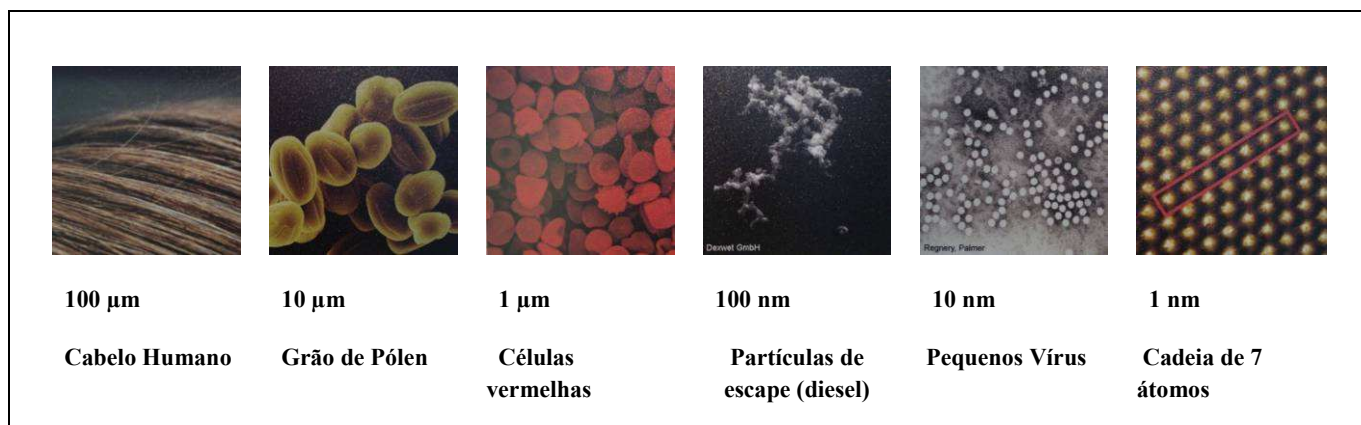


Figura 2: Exemplos de materiais micrométricos e nanométricos (Deutsches Museum – Museu de Ciências e Tecnologia, Munique).

A utilização de nanotecnologia vem produzindo dispositivos eletrônicos cada vez menores e mais eficazes. Os computadores, por exemplo, possuem milhões de transistores impressos em um bloco de silício em seu processador. Estudos recentes indicam a possibilidade de combinar ou até mesmo substituir esta técnica que utiliza blocos de silício pela aplicação de nanotubos de carbono, diminuindo ainda mais o seu tamanho (DRESSELHAUS, 2001).

A nanotecnologia já vem sendo utilizada pela indústria farmacêutica e continua sendo alvo de pesquisas. É possível utilizar materiais nanométricos que servem de revestimento para moléculas do princípio ativo farmacológico, facilitando o seu transporte e controlando a taxa de liberação do medicamento no corpo humano. Recentes pesquisas mostram que nanopartículas de prata tem apresentado resultados satisfatórios contra o vírus HIV (ELECHIGUERRA *et al.*, 2005).

O desenvolvimento da nanotecnologia desencadeou muitas pesquisas, objetivando a busca de agentes mais eficientes que possam ser utilizados no controle da poluição de águas, solo e ar. Nanopartículas são empregadas, por exemplo, com o objetivo de despoluir águas de processos industriais e esgoto. A nanofiltração é um processo que utiliza membranas e possibilita a separação de moléculas e íons indesejáveis com grande seletividade (FREIRE *et al.*, 2000). Devido ao desenvolvimento da nanotecnologia, muitas pesquisas têm como foco a

busca de agentes que melhorem a eficiência dos tratamentos químicos no controle da poluição ambiental.

Além do benefício da redução de tamanho, as nanopartículas podem revelar características diferentes das encontradas nos sólidos estendidos. Alterações nas propriedades mecânicas e na coloração do material, reatividade química, propriedades magnéticas, tolerância à temperatura são algumas dessas características.

Um dos responsáveis por algumas dessas mudanças nas características físico-químicas é o aumento da superfície de contato, isto é, os chamados efeitos de superfície (MACIEL *et al.*, 2004). À medida que o tamanho da partícula é diminuído, a razão entre o número de átomos encontrados na superfície e o número de átomos dispersos no interior da partícula aumenta. Esses átomos dispostos na superfície da partícula diferentemente dos átomos presentes em seu interior estão mais disponíveis para interagir física e quimicamente, atuando de forma mais efetiva nesses processos. A Figura 3 representa esquematicamente o aumento de superfície de contato à medida que é diminuído o tamanho da partícula.

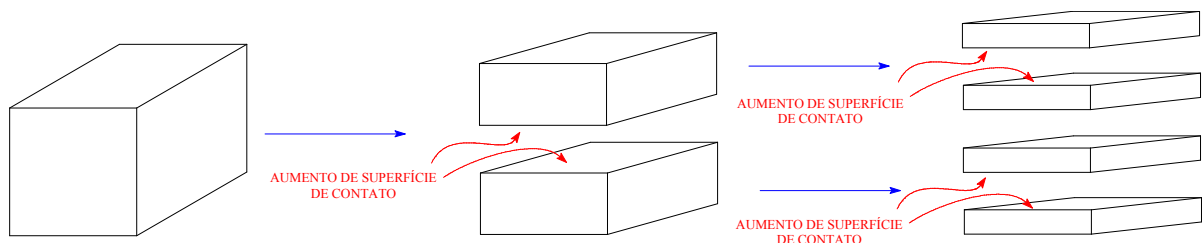


Figura 3: Representação esquemática do aumento da superfície.

### 2.2.1. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos nanomateriais estão intimamente ligadas ao tamanho das nanopartículas que os compõem e seu arranjo espacial. Em geral, quanto menores são as partículas, mais resistente será o material. Um exemplo é o caso dos nanotubos de carbono que estão substituindo o aço em diversas aplicações, por serem mais resistentes e leves (COURTNEY, 1990).

### 2.2.2. Propriedades ópticas

A coloração dos nanomateriais, assim como as suas propriedades mecânicas, dependem do tamanho das partículas que os compõem. Nanopartículas de um mesmo elemento podem emitir comprimentos de onda diferentes de acordo com o seu tamanho, gerando diferentes colorações (GAPONENKO, 1998). A Figura 4 mostra as diferentes colorações das soluções contendo nanopartículas de ouro, de acordo com o tamanho das partículas em estudo realizado por Hansen (2005). A temperatura também pode atuar modificando a coloração dos nanomateriais já que influencia o estado de agregação das partículas no meio (BONIFÁCIO, 2006).

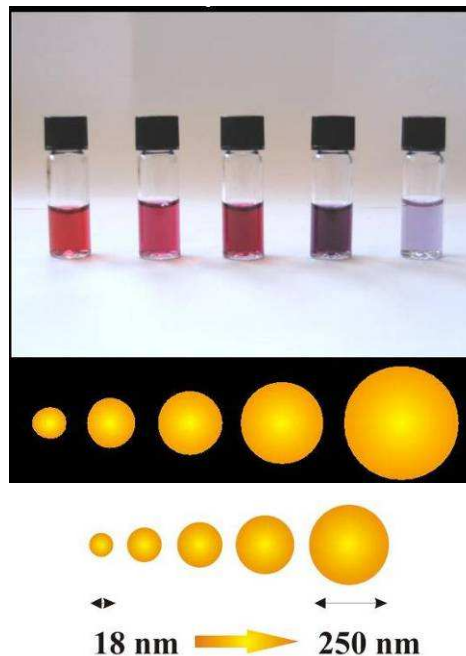


Figura 4: Diferentes colorações das soluções contendo nanopartículas de ouro de acordo com o tamanho das partículas (HANSEN, 2005).

### 2.2.3. Métodos de obtenção

Nanopartículas metálicas podem ter suas propriedades físicas modificadas pelo ajuste de composição, forma e tamanho dos cristais. Contudo, a obtenção de amostras de tamanho nanométrico é extremamente difícil, uma vez que dependem da etapa de síntese destes materiais (YIN e ALIVISATOS, 2005).

Basicamente é possível dividir os métodos de obtenção das nanopartículas em duas grandes categorias: o *top down* e o *bottom up* (MIJATOVIC, 2005). O método *top down*, que quer dizer de cima para baixo ou do maior para o menor tamanho, é um método físico onde o material encontrado em macro escala é fragmentado até chegar a dimensões nanométricas. O método *bottom up*, que quer dizer de baixo para cima ou do menor para o maior tamanho, é um método químico que parte de precursores moleculares ou atômicos e que chegam ao tamanho desejado através de reações químicas. (ZARBIN, 1997).

O *bottom up* tem sido o método mais utilizado, pois não requer aparelhagem sofisticada para a sua execução e possibilita um maior controle durante a produção, possibilitando a obtenção de nanopartículas de tamanhos e estruturas mais definidas. Porém, recentes estudos mostram que a combinação dos dois métodos também pode ser aplicada com bons resultados (ALBUSCHIES *et al.*, 2006).

Várias rotas de obtenção de nanopartículas por processo *bottom up* através de precursores em solução têm sido descritas na literatura. Nesse caso, as nanopartículas permanecem na solução original que se assemelha a uma solução homogênea, porém são na realidade dispersões coloidais (ZANCHET, 1999).

O desenvolvimento de processos de síntese (biossíntese) de nanopartículas metálicas, tais como Ag, Au, Pt e Pd, tem sido descrito na literatura. O processo de redução pode ocorrer através de enzimas presentes em bactérias (HUSSEINY *et al.*, 2007), fungos (SASTRY *et al.*, 2003) e plantas (SHARMA *et al.*, 2007). A enzima redutase presente no fungo *Fusarium oxysporum* tem sido documentada como catalisadora da redução de  $\text{AgNO}_3$  a nanopartículas de prata utilizando NADPH como agente redutor (DURAN *et al.*, 2007).

Durante a síntese, nanopartículas tendem a se agregar de forma rápida para constituir cristais maiores e termodinamicamente mais estáveis, pois isoladamente elas apresentam alta área superficial e, portanto, alta energia superficial. As nanopartículas coloidais estão sujeitas a forças de atração que tendem a agrupá-las em grandes aglomerados (ATKINS, 2000). No entanto, para que sejam estudadas as propriedades dependentes de parâmetros como tamanho e morfologia e possíveis aplicações, são desejáveis partículas metálicas não aglomeradas, com forma e estruturas controladas e com distribuição de tamanhos estreita (monodispersa).



A agregação de nanopartículas, em geral, possui grande contribuição das forças intermoleculares e, no caso das nanopartículas metálicas monodispersas, mais especificamente, ocorre interação do tipo dipolo-dipolo magnético tornando essa interação significativamente forte. Sendo assim, torna-se necessário adicionar ao meio reacional um material que agirá como agente protetor estabilizando as partículas durante o processo de síntese, evitando assim a sua coalescência.

Basicamente dois tipos de mecanismos são utilizados nesse processo de estabilização das nanopartículas: eletrostática e estérica representados na Figura 5 (FENDLER,1996).

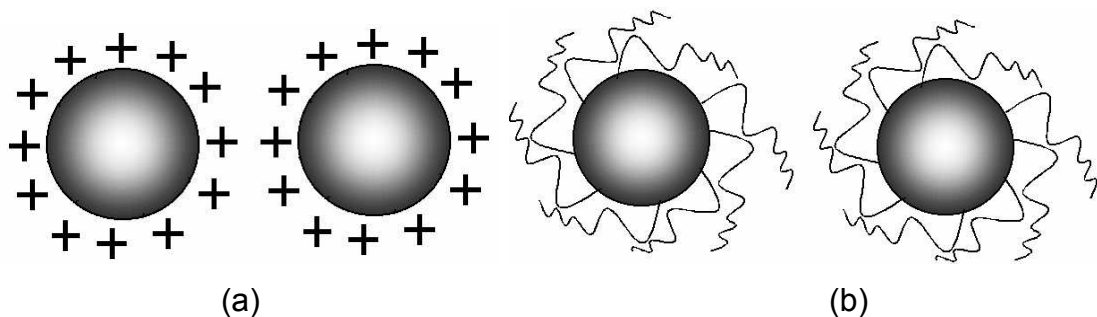


Figura 5: Representação de dois mecanismos de estabilização de partículas em soluções coloidais: (a) estabilização eletrostática e (b) estabilização por efeito estérico (COUTO, 2006).

Durante a estabilização eletrostática as nanopartículas se repelem, pois possuem suas superfícies carregadas eletricamente. O mecanismo que evita a coalescência das partículas se baseia no fato de que cargas iguais se repelem, seguindo o princípio da repulsão Coulombiana, consequência do campo elétrico.

A repulsão Coulombiana, neste caso, favorece o processo. O inverso acontece na física nuclear, onde a maior dificuldade reside na necessidade de se utilizar condições extremas de pressão e temperatura para que haja a fusão de dois núcleos atômicos, superando a repulsão Coulombiana (ROHLF, 1994).

Entretanto, na estabilização por efeito estérico não há cargas na superfície da nanopartícula e a aproximação entre elas é limitada por uma camada de outro material, funcionando como um protetor de colóide. Para esse tipo de estabilização,

podem ser utilizados surfactantes, polímeros ou moléculas orgânicas que limitem as superfícies das partículas evitando o seu contato.

Para a síntese de partículas metálicas em meio líquido, os métodos mais utilizados envolvem a redução de sais metálicos em presença de estabilizantes no meio reacional, promovendo assim o controle do crescimento e a estabilização das nanopartículas. As partículas metálicas coloidais monodispersas, derivadas deste processo, são estáveis por mais tempo em solução e podem ser secas, precipitadas e redissolvidas sem perder a estabilidade (SARATHY, 2007).

Algumas variáveis definem o tamanho final das partículas, assim como seu comportamento quando aplicadas em processos químicos e, por isso, devem ser consideradas como, por exemplo, precursor metálico, temperatura de reação, tipo de estabilizante utilizado e a razão precursor metálico / agente estabilizante.

Polímeros têm sido amplamente aplicados em sínteses de nanopartículas metálicas, com grande eficácia no processo, pois muitos deles possuem vantagens como solubilidade em água ou álcool, resistência a altas temperaturas e por possuírem afinidade por metais.

### **2.3. Compósitos de polímeros e nanopartículas metálicas**

Materiais compósitos podem ser definidos como materiais multifásicos constituídos por duas ou mais fases com composições distintas, adequadamente arranjadas, e que estão separados por uma interface (CHAWL, 1987). Assim, pela combinação adequada de diferentes matérias primas com características particulares, um compósito pode reunir um conjunto de propriedades convenientes e desejáveis, formando um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes.

Em compósitos formados por apenas duas fases, uma é chamada matriz, a qual é contínua e envolve a outra fase, denominada fase dispersa. No caso dos compósitos de polímeros e nanopartículas metálicas a sua constituição é composta por uma matriz polimérica e uma fase dispersa, contendo as nanopartículas.

A fixação das nanopartículas na matriz polimérica pode ser realizada de diversas maneiras, por exemplo, a incorporação física ou química do metal em

microesferas poliméricas ou pela oxidação de complexos formados pelo polímero e o íon metálico (MARTIN *et al.*, 2004).

O copolímero pode ser obtido basicamente de três formas: com a fixação das partículas magnéticas após a obtenção do polímero, polimerização após a obtenção das nanopartículas e formação das nanopartículas e polimerização simultâneas (TAVARES, 2004). Em todos os casos o procedimento deve ser cuidadosamente controlado, pois a introdução de partículas metálicas no polímero pode causar distúrbio no processo de polimerização, produzindo partículas poliméricas sem forma definida (SANTA MARIA *et al.*, 2006).

A presença de uma matriz polimérica pode levar a uma seletividade em reações catalisadas em função da influência estérica, enantiomérica ou eletrostática, além da cobertura polimérica poder estabilizar as partículas, evitando agregação. (ANTIPOV *et al.*, 2000).

Assim, a etapa inicial da busca do produto a ser sintetizado é definir uma classe de nanopartículas com propriedades de interesse, e que possam ser incorporadas regularmente a uma matriz desejada.

#### **2.4. Introdução de grupos iônicos na unidade estrutural polimérica**

Uma das formas de obtenção de copolímeros trocadores de íons é a modificação da estrutura polimérica pela introdução de grupos sulfônicos. Estudos comparativos mostram que copolímeros sulfonados possuem algumas vantagens sobre aqueles formados pelos polímeros precursores (HUCK e BONN, 2000).

A sulfonação de cadeias poliméricas tem se mostrado uma opção eficiente e versátil para a obtenção de polímeros polieletrófilos (SMITHA *et al.*, 2005). O controle do grau de sulfonação se faz necessário de forma a maximizar a condutividade protônica das membranas sem que estas se degradem ou percam a insolubilidade em água, característica necessária para a sua aplicação (ELABD e NAPADENSKY, 2004).

A capacidade de troca iônica é uma das principais características desejadas quando se utilizam polímeros sulfonados, sendo que, esta característica aumenta conforme o grau de sulfonação (BASTOS, 2005).

Existem três principais métodos para a sulfonação de polímeros. A sulfonação da cadeia principal, o enxerto por radiação com subsequente sulfonação e a reação de polimerização com monômeros sulfonados (AZEVEDO *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Becker mostram que amostras sulfonadas de resinas hidrocarbônicas têm sua capacidade de troca iônica aumentada de acordo com o teor de grupos ácidos na amostra. A Tabela 1 mostra os valores da capacidade de troca iônica em relação ao grau de sulfonação da resina encontrados em estudos realizados por Becker (2006). Becker observou também que as resinas que apresentavam grau de sulfonação superior a 30 % foram totalmente solubilizadas no meio aquoso devido à introdução dos grupos ácidos  $-SO_3H$  na molécula do polímero.

Tabela 1: Capacidade de troca iônica (IEC) de algumas resinas hidrocarbônicas (BECKER, 2006).

Grau de sulfonação (mol %)	IEC (meq/g)
11,9	0,99
16,9	1,34
18,6	1,52
20,9	1,65
24,6	1,90
28,9	2,15
45,0	3,03
55,6	3,55
58,4	3,69

## 2.5. Propriedades biocidas da prata

As propriedades biocidas de alguns metais são conhecidas desde a antiguidade. Civilizações da Pérsia e México usavam jarros de prata e cobre para armazenar água, pois estes mantinham a água limpa e fresca por mais tempo. Os fenícios armazenavam água, vinagre e vinho em recipientes de prata para evitar a sua deterioração (DAVIES e ETRIS, 1997).

Hipócrates menciona a prata como cicatrizante de feridas e em 400 d.C é listada como tratamento para úlceras em forma de pó fino. Os exércitos do czar Alexandre utilizavam barris de água revestidos com prata para purificar a água retirada dos rios e córregos durante as guerras napoleônicas (CUMSTON, 1928).

As pesquisas modernas confirmam o que Hipócrates já havia verificado experimentalmente: as menores partículas possuem maior eficácia bactericida (RAI *et al.*, 2009; RUPARELIA *et al.*, 2008; MORONES *et al.*, 2005).

Metais como cobre, titânio (RETCHKIMAN-SCHABES *et al.*, 2006), zinco, ouro (GU *et al.*, 2003), magnésio e prata são estudados em forma de nanomateriais por suas propriedades biocidas mas a prata tem apresentado melhores resultados tanto contra bactérias, como para fungos e vírus (GONG *et al.*, 2007).

Atualmente, destacam-se algumas aplicações da prata: tratamento de água, produtos odontológicos, fibras e tecidos, revestimento, tratamento de pele como queimaduras e acne. As propriedades biocidas da prata contam com o benefício da alta estabilidade térmica e baixa volatilidade e toxicidade para as células humanas (DURAN *et al.*, 2007). A toxicidade da prata em humanos foi verificada apenas quando ingerida em altas concentrações causando sobrecarregamento dos rins, indigestão, cefaléia e Argyria, doença que causa o azulamento da pele (FUNG e BOWEN, 1996).

Uma aplicação recente são os polímeros impregnados com prata utilizados em catéteres e válvulas cardíacas com o objetivo de evitar a formação de biofilmes bacterianos (SAMPATH *et al.*, 1995; DASGUPTA, 1997).

Dentre vários estudos envolvendo a interação da prata com microorganismos, destacam-se os realizados contra *Escherichia coli* (FENG *et al.*, 2000; SONDI e SONDI, 2004), *Pseudomonas mendocina* (ZODROW *et al.*, 2009), *Streptococcus mutans* (CRISTÓBAL *et al.*, 2009), *Streptococcus pyrogens* (SU *et al.*, 2009), *Candida spp.* (PANACEK *et al.*, 2009), *Bacillus subtilis* (YOON *et al.*, 2007), *Trichophyton mentagrophytes* (KIM *et al.*, 2008) e HIV-1 (ELECHIGUERRA *et al.*, 2005).

O potencial biocida da prata pode ser verificado nas formas de nanopartículas ( $Ag^0$ ), prata coloidal como  $AgCl$  e também na forma de íons  $Ag^+$ . Devido à grande superfície de contato verificada nas nanopartículas, a interação entre microorganismo e o metal ocorre em maior extensão, apresentando maior poder

bactericida (RAI *et al.*, 2009). Pesquisas realizadas por Choi e colaboradores (2008) apontam a eficácia prata em forma de colóide AgCl como sendo tão significativa quanto os íons Ag<sup>+</sup>. Entretanto, é difícil realizar uma comparação generalizada já que o potencial biocida não está somente relacionado à forma de apresentação da prata mas também a parâmetros como tamanho, forma e concentração.

O mecanismo de ação das nanopartículas de prata com as bactérias foi estudado por Zodrow e colaboradores (2009) e diz que a interação ocorre entre os íons Ag<sup>+</sup> liberados pelas nanopartículas e o enxofre ou o fósforo presentes na membrana plasmática bacteriana. O fósforo presente no DNA, as pontes de dissulfeto assim como os grupos tiol são alvos deste ataque. Contudo, quando os íons prata entram na célula bacteriana há uma diminuição de peso molecular na região central da bactéria, protegendo o DNA da prata. Sendo assim, as nanopartículas atacam preferencialmente a cadeia respiratória, o transporte de elétrons e a divisão celular antes de inibir a replicação do DNA bacteriano (TREVORS, 1987; RUSSELL e HUGO, 1994, FENG *et al.*, 2000). Krishnara e colaboradores (2009) investigaram a interação da prata na cadeira respiratória em *E. coli* e *V. cholerae* concluindo que as nanopartículas de prata inibem a atividade das enzimas citocromo oxidase, malato desidrogenase e succinato reduzindo drasticamente a taxa de respiração das bactérias, comparando-se com a cepa não tratada com prata como mostra a Figura 6. De forma equivalente, as propriedades antivirais dos íons prata envolvem a interação com o DNA viral e grupos tiol presentes nas proteínas encontradas nos vírus (KIM *et al.*, 2008).

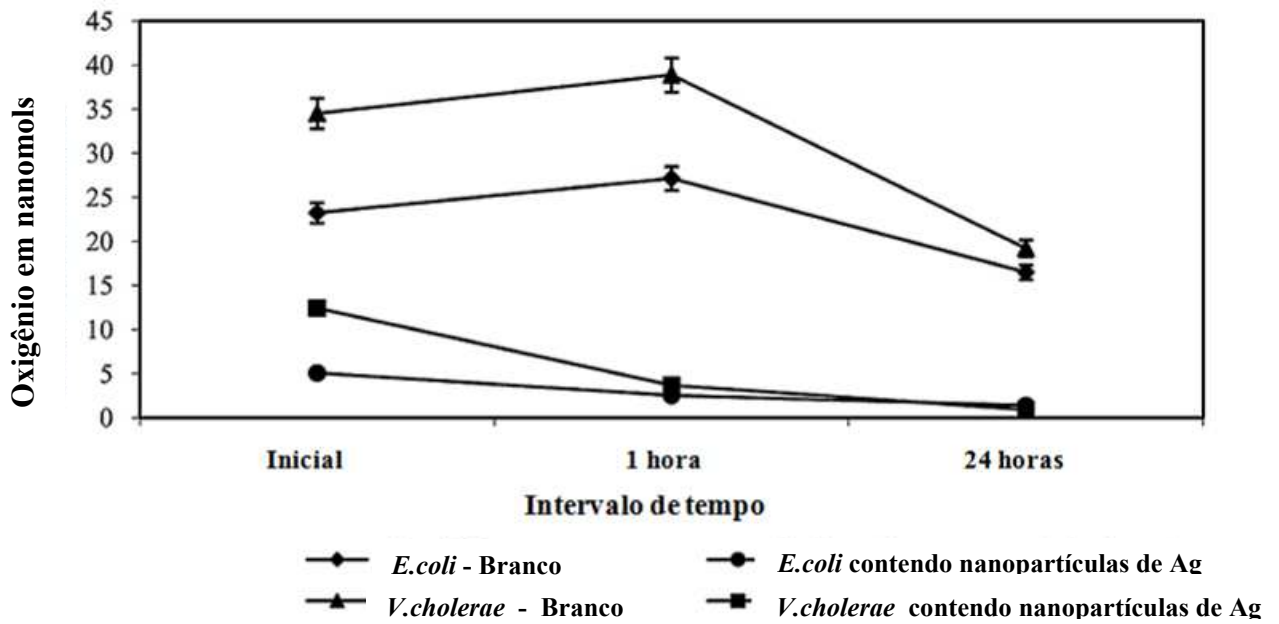


Figura 6: Mudanças na atividade respiratória em *E. coli* e *V. cholerae* (KRISHNARA *et al.*, 2009).

Esta afinidade da prata com as proteínas bacterianas e consequente interação preferencial com a parede celular e membrana plasmática vão de encontro a pesquisas mais antigas como a de Modax e Fox (1973) que trataram *Pseudomonas aeruginosa* com doses não letais de sulfadiazina de prata e verificaram que menos de 0,5 % da prata se encontrava na parte lipídica da bactéria, concentração inferior a 3 % foi encontrado na fração do RNA e menos de 12 % na fração do DNA e o restante da prata foram encontrados nas demais partes da bactéria que incluem proteínas e polissacarídeos. A distribuição da prata em *Citrobacter intermedius* foi de 5 % no citoplasma, cerca de 27 % da membrana celular e cerca de 68 % na parede celular (GODDARD e BULL, 1989). A Figura 7 mostra a interação entre  $Ag^+$  e célula bacteriana.

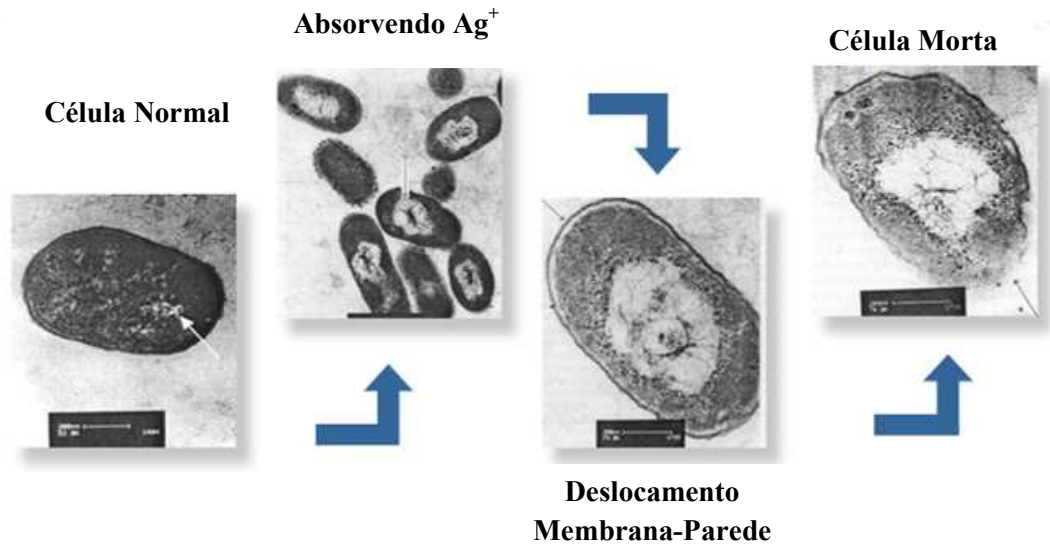


Figura 7: Interação entre  $Ag^+$  e célula bacteriana (ALYA HEALTH, 2005).

A liberação de íons prata não é o único mecanismo de ataque das nanopartículas a células bacterianas e virais. Alguns estudos mostram que danos a células microbianas foram causados pela prata em sua forma metálica causando a morte celular (SONDI e SONDI, 2004; MORONES *et al.*, 2005; PANACEK *et al.*, 2006). O mecanismo de ação destas nanopartículas provavelmente ocorreu por um aumento na permeabilidade da membrana celular causando um colapso osmótico e perda de material intracelular (ZODROW *et al.*, 2009).

A Figura 8 mostra nanopartículas de prata de variados tamanhos em processo de penetração em uma célula bacteriana.

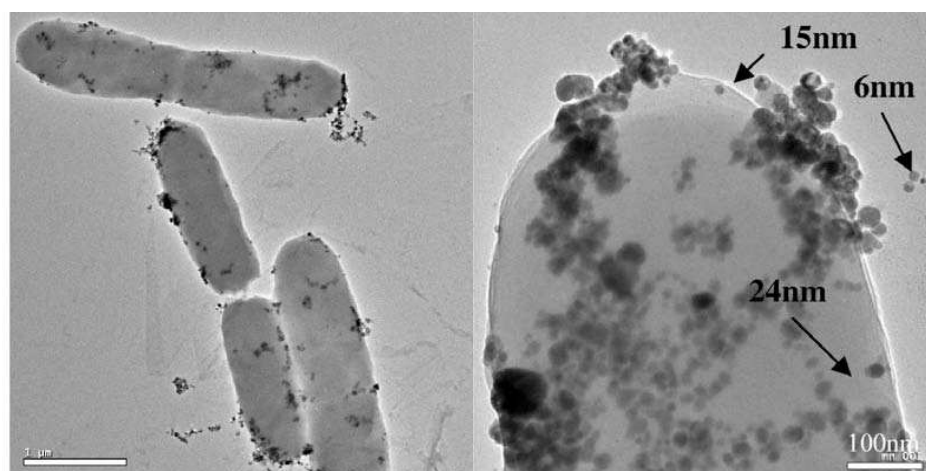


Figura 8: Microscopia Eletrônica de Transmissão de *E. Coli* após tratamento com nanopartículas de prata (A) Barra 1  $\mu m$  e (B) 100 nm (DROR-EHRE *et al.*, 2009).



Um fator desfavorável ao entendimento do mecanismo e diferenças entre a interação entre a prata iônica e metálica é a presença de íons  $\text{Ag}^+$  gerados a partir da oxidação da superfície das nanopartículas de prata (SAMBHY *et al.*, 2006). A Figura 9 representa alguns mecanismos de ação antimicrobiana.

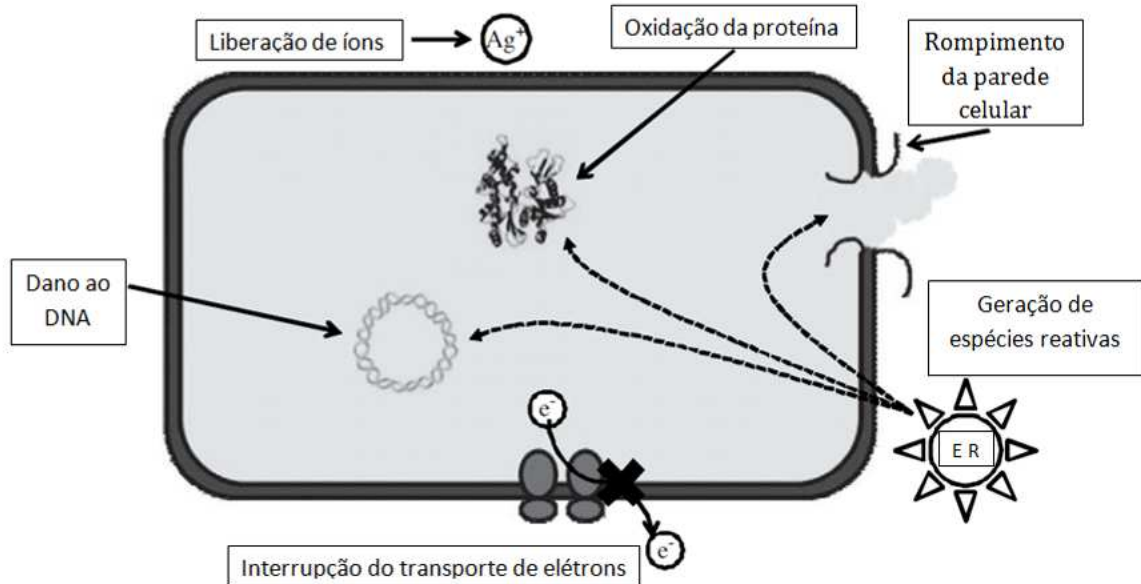


Figura 9: Possíveis mecanismos de atividade antimicrobiana exercidos pela prata (adaptações de LI *et al.*, 2008).

## 2.6. Formas de apresentação da prata vs atividade biocida

Propriedades físico-químicas também influenciam no potencial biocida da prata. Elechiguerra e colaboradores (2005) verificaram que a ligação entre o vírus HIV-1 e células hospedeiras foi impedida através do bloqueio do vínculo com a glicoproteína GP 120 pelas nanopartículas de prata que apresentavam tamanhos de 1 a 10 nm. Em geral, partículas menores que 10nm são mais tóxicas às bactérias como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (XU *et al.*, 2004; GOGOI *et al.*, 2006) pois além de promover um maior contato entre as superfícies da célula e da partícula, aumenta a possibilidade de ocorrer a penetração da prata na célula causando citotoxicologia (SU *et al.*, 2009).

Os resultados de Choi e colaboradores (2008) surpreendentemente mostraram os percentuais de inibição de crescimento de *E. coli* como sendo 55 %, 100 % e 66 % para nanopartículas de prata, íons  $\text{Ag}^+$  (na forma de  $\text{AgNO}_3$ ) e

colóides de AgCl. A baixa eficiência neste caso pode ser atribuída ao tamanho médio de 14 nm das nanopartículas.

Além do tamanho da partícula a sua forma também influencia na capacidade biocida. Apesar de não haver vasta literatura relacionando o formato das nanopartículas com seu poder antimicrobiano, Pal e colaboradores (2007) desenvolveram um importante estudo sobre o assunto e concluíram que os cristais de prata que exibiram formato triangular tiveram ação biocida mais forte comparando com íons  $\text{Ag}^+$  ( $\text{AgNO}_3$ ) e com nanopartículas esféricas ou cilíndricas (PAL *et al.*, 2007). Foram observadas interações de partículas esféricas e cilíndricas de até 80 nm em bactérias, porém partículas menores que 10 nm com alta densidade e formatos triangulares são mais favoráveis à interação com a célula (XU *et al.*, 2004; MORONES *et al.*, 2005; GOGOI *et al.*, 2006). A Figura 10 mostra a microscopia eletrônica de varredura de uma mistura de prata esférica e cilíndrica (A) e a microscopia eletrônica de transmissão de partículas de prata com facetas triangulares.

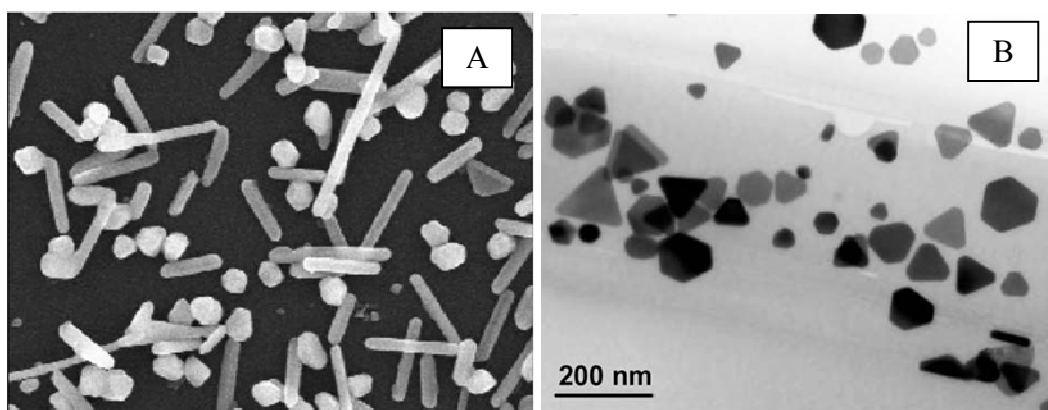


Figura 10: (A) MEV de uma mistura de prata esférica e cilíndrica (LIU *et al.*, 2005); (B) MET de partículas de prata com facetas triangulares (MANSOURI e GHADER, 2009).

## 2.7. Resistência microbiana à prata

A resistência a bactericidas e antibióticos é um assunto de grande interesse devido ao desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes. As primeiras cepas de bactérias gram-positivas resistentes surgiram após a Segunda Guerra Mundial devido ao uso extensivo de penicilina (SILVEIRA *et al.*, 2006). Com a necessidade

de novos medicamentos eficazes contra estas cepas, surgiram os análogos penicilínicos como meticilina, tetraciclina e eritromicina e após não muito tempo apareceram as cepas de enterococos e estafilococos multiresistentes. A vancomocina surgiu como nova geração de antibióticos capazes de destruir bactérias não suscetíveis aos derivados da penicilina. A primeira linhagem de *Enterococos vancomicina* resistentes em 1988 foi responsável por contaminações como infecções hospitalares (KAUFFMAN, 2003) e então novas pesquisas foram necessárias contra os novos microorganismos mutantes. Além do desenvolvimento de antibióticos inteiramente novos, o estudo sobre possíveis efeitos sinérgicos entre substâncias conhecidas entra em discussão.

Existem vários mecanismos de ação, dependendo da classe de antibióticos. Inibição da síntese da parede celular, do ácido fólico, das proteínas que compõem a célula, do DNA, do RNA e desorganização da membrana celular são alguns destes mecanismos (ALANIS, 2005). Por outro lado, as bactérias desenvolveram diferentes mecanismos de defesa contra estes agentes como a degradação do antibiótico catalisada por enzimas; a modificação de grupos funcionais tornando o antibiótico inativo; o efluxo contínuo do antibiótico tornando sua excreção mais veloz do que a difusão celular e mantendo a concentração inexpressiva no interior da célula; a reprogramação e modificação das estruturas-alvo tais como ribossomo, proteína e constituintes da parede celular os tornando irreconhecíveis pelo fármaco (SILVEIRA *et al.*, 2006). Em alguns casos, bactérias desenvolvem resistência simultânea a duas ou mais classes de antibióticos tornando a terapia difícil e dispendiosa.

Micro-organismos parecem não desenvolver resistência à prata, o que não ocorre com os antibióticos convencionais, pois o metal ataca diferentes alvos na célula, o que significa que variadas mutagêneses seriam necessárias para que os micróbios fossem alheios à presença da prata (PAL *et al.*, 2007). Em forma de nanopartículas, a prata já mostrou ser altamente eficaz contra diversas cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas multiresistentes (AYALA-NÚÑEZ *et al.*, 2009) e combinadas a alguns antibióticos, promovem efeito adicional recuperando a eficácia destes compostos. Shahverdi e colaboradores (2007) verificaram a sinergia entre alguns antibióticos como amoxicilina, penicilina, eritromicina, vancomicina e clindamicina com nanopartículas de prata (SHAHVERDI *et al.*, 2007), comprovando a promissora aplicação da prata como poderoso bactericida.

## 2.8. Antibióticos e meio ambiente

A utilização dos antibióticos não se restringe à terapia humana, incluindo também a agropecuária e a agricultura. Mesmo após a administração oral, pacientes e animais excretam parte dos antibióticos no esgoto doméstico, hospitalar e nos solos, sendo persistentes nestes meios (AARESTRUP *et al.*, 2000; GONI-URRIZA *et al.*, 2000). Os resíduos provenientes destas aplicações podem conter tanto o antibiótico na forma original quanto bactérias resistentes aos mesmos podendo contaminar o meio ambiente. A consequência mais importante do descarte de antibióticos é a geração de bactérias mutantes já que mesmo em locais onde não há registros de contaminação por antibióticos, podem ser encontradas espécies mutantes já clinicamente identificadas, possivelmente derivadas de uma sucessiva transferência genética através das gerações. O efeito desta contaminação na biosfera é amplo, pois interfere no ciclo natural da microbiota (BILA e DEZOTTI, 2003).

Portanto, além de medidas como implementação de políticas de consumo consciente de antibióticos e pesquisas objetivando a descoberta de métodos alternativos aos antibióticos regulares que não favoreçam a resistência microbiana serem necessárias (MARTINEZ, 2009), é de fundamental importância que os resíduos potencialmente poluentes por carga bacteriana, resistente ou não, sejam tratados e reduzidos ao mínimo para evitar a proliferação deste material genético. Sendo assim, as plantas de tratamento de águas residuais devem atuar tanto na degradação dos antibióticos, quanto na eliminação de micróbios, evitando que ambos atinjam os corpos d'água (PAUWELS e VERSTRAETE, 2006).

### 2.8.1 Nanopartículas de prata e o meio ambiente

A aplicação clínica das nanopartículas de prata já foi extensivamente pesquisada e inúmeras rotas de síntese já foram apresentadas. Contudo, o uso para controle e remediação do meio ambiente até o momento, não tem sido consideravelmente reportado. A Figura 11 mostra o número de publicações relacionadas às nanopartículas através de uma estatística realizada com dados das

revistas *Water Research*, *Water, Science and Technology*, *Chemosphere*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *Waste Management*, *Air, Water and Soil Pollution*, *Journal of Environmental Quality*, *Aquatic Toxicology*, *Water Environment Research*, *Journal of Hazardous Materials* e evidencia a necessidade de uma maior atenção à aplicação destes materiais na remediação ambiental.

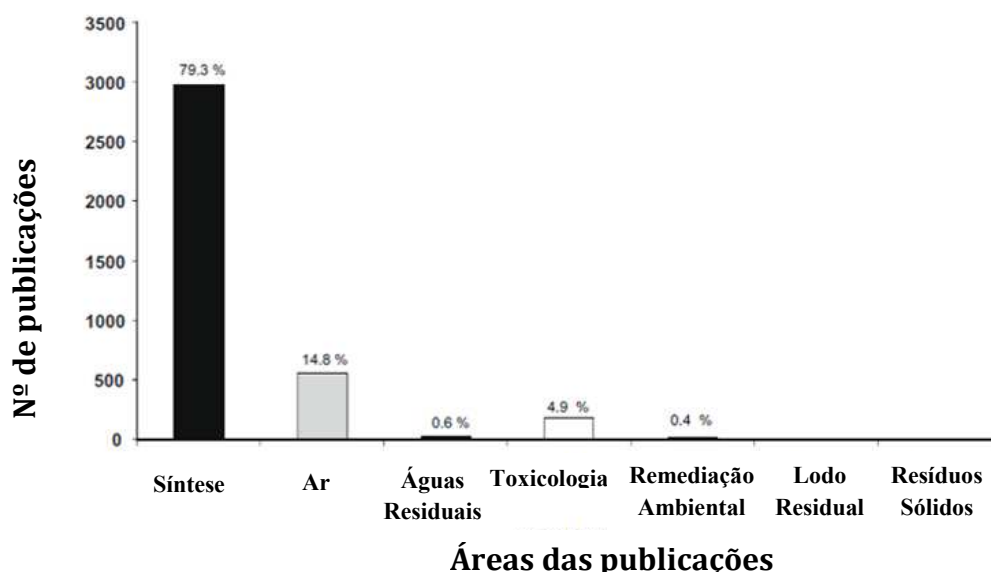


Figura 11: Número de publicações em diferentes assuntos referentes às nanopartículas, até dezembro de 2008. (BRAR *et al.*, 2009 com adaptações).

As nanopartículas de prata já provaram serem eficientes antimicrobianos sem predisposição ao desenvolvimento de cepas resistentes. Muhling e colaboradores (2009) verificaram que bactérias de ocorrência natural não desenvolveram resistência às nanopartículas de prata e por isso este material pode ser visto como uma alternativa para o tratamento de efluentes.

Contudo, as nanopartículas de prata também podem ser nocivas ao meio ambiente já que seu potencial bactericida pode ser fatal a colônias bacterianas naturais, como por exemplo, as bactérias nitrificantes necessárias ao ciclo do nitrogênio. As nanopartículas são persistentes no meio ambiente, sendo potencialmente tóxicas ao ambiente aquático. A sua afinidade com espécies biológicas, assim como com materiais particulados suspensos e com sedimentos, pode ser atribuída às forças eletrostáticas e covalentes.

A extensa superfície de contato destes materiais facilita a interação com águas superficiais e espécies biológicas pelo fenômeno de adsorção. Basicamente, a adsorção pode ser física (fisissorção) ou química (quimissorção) dependendo do tipo de interação ocorrido. Forças de Van der Waals promovem adsorção física já que não há transferência de elétrons, enquanto forças eletrostáticas e ligações covalentes geram adsorção química, pois ocorre transferência de elétrons entre o material adsorvido e o adsorvente (BRAR *et al.*, 2009). Além disso, a adsorção de matéria orgânica pelas nanopartículas é termodinamicamente favorável, pois gera suspensões estáveis (GAO *et al.*, 2009).

Por esta razão, o uso das nanopartículas de prata deve ser controlado para que não haja dispersão no meio ambiente. Um dos desafios ao aplicá-lo em forma de compósito é o desenvolvimento de um material suficientemente estável para que o procedimento não libere vestígios de prata.

Benn e Westerhoff (2008) sugerem que é importante quantificar e caracterizar a prata proveniente de produtos comerciais como coloidal ou iônica e assim escolher o melhor método para tratamento dos possíveis resíduos. Um exemplo de uso e despejo indiscriminados de nanopartículas de prata é uma linha de máquinas de lavar projetada para eliminar odores dos tecidos liberando nanopartículas de prata nas roupas durante a lavagem, porém as partículas vão além das roupas atingindo o esgoto doméstico. (BENN e WESTERHOFF, 2008).

Durán e colaboradores (2009) realizaram a biorremediação de águas de lavagem de tecidos impregnados com nanopartículas de prata utilizando a bactéria *Chromobacterium Violaceum* e obtiveram resultados satisfatórios. Com o procedimento adotado, houve a recuperação da prata descartada e não ocorreu dano à cepa bacteriana, já que a sua morfologia foi restaurada após uma nova cultura.

Uma possível utilização dos nanocompósitos com nanopartículas de prata é o tratamento de efluentes hospitalares. Estes efluentes devem ser vistos com especial atenção, pois apresentam níveis elevados de bactérias resistentes a antibacterianos quando comparado a outras fontes de poluição e o tratamento indevido destes resíduos gera a disseminação de bactérias multirresistentes (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008).

O cloro, geralmente em forma de hipoclorito de sódio, é a substância mais utilizada para desinfecção de efluentes hospitalares no Brasil, pois seu manejo é simples e econômico. Porém a cloração apresenta fatores que desfavorecem a sua utilização, pois além de não ser completamente eficaz contra microorganismos como os patógenos *Giardia* e *Criptosporidium* (COSTA e DANIEL, 2002), a cloração produz subprodutos orgânicos tóxicos como os trialometanos (THMs) e ácidos haloacéticos (HAAs) (TYRRELL *et al.*, 2005).

Na Europa, alguns hospitais já aplicam o processo de desinfecção por ozonização que apesar de não possuir a desvantagem da formação de organoclorados, há formação de subprodutos aldeídicos e cetônicos e ainda, existe a possibilidade de se formar bromato, dependendo do nível de brometo presente na água. Além disso, possui grande instabilidade necessitando além da produção *in situ*, de uma alta demanda energética. Alguns estudos mostram que a ozonização pode até mesmo favorecer o crescimento bacteriano pela conversão de material orgânico não biodegradável em formas mais facilmente degradáveis, fontes de carbono para os microorganismos (MILTNER *et al.*, 1192; SIDDIQUI *et al.*, 1997).

Com base nos dados expostos, o tratamento de água com a ajuda de nanocompósitos contendo nanopartículas de prata é um procedimento que possui potencial para substituir ou complementar as atuais técnicas de desinfecção utilizadas nas plantas hospitalares que utilizam cloro ou ozônio como agentes antimicrobianos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo, são apresentados os materiais e equipamentos, assim como a metodologia empregada para a execução dos experimentos.

### 3.1. Produtos químicos e biológicos

O desenvolvimento deste trabalho foi realizado utilizando os reagentes listados a seguir:

- Cepa ATCC<sup>®</sup>25922<sup>TM</sup> de *Escherichia Coli* – fornecida pelo Laboratório de análises clínicas LAGO LAB.
- Cepa (OHd5 – k-12) de *Escherichia Coli* – pertencente ao estoque do Laboratório de Tecnologia de Processos Bioquímicos - procedência: Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- Amberlite<sup>®</sup>GT73 (copolímero) - procedência: *Rohm and Haas Co.*, grau de pureza:comercial, resina contendo grupo tiol.
- Lewatit<sup>®</sup>VPOC1800 (copolímero) - procedência: *Rohm and Haas Co.*, grau de pureza:comercial, resina contendo grupo sulfônico.
- Amberlys<sup>®</sup>15WET (copolímero) - procedência: *Bayer Co.*, grau de pureza:comercial, resina contendo grupo sulfônico.
- Tiocianato de amônio – procedência: Vetec, grau de pureza: P.A.
- Ácido clorídrico – procedência: Vetec, grau de pureza: P.A.
- Ácido nítrico – procedência: Vetec, concentrado 65 % p/v.
- Carbonato de sódio – procedência: Vetec, grau de pureza: P.A.
- Bicarbonato de sódio – procedência: Isofar, grau de pureza: P.A.
- Cloreto de sódio – procedência: Vetec, grau de pureza: P.A.
- Hidróxido de sódio – procedência: Vetec, grau de pureza: P.A.
- Hidroxilamina – procedência: Riedel de Haën, grau de pureza: P.A.
- Nitrato de prata – procedência: Merck, grau de pureza: P.A.
- Sulfato de ferro III amoniacal - procedência: Vetec, grau de pureza: P.A.
- Hidróxido de amônio – procedência: Vetec, 28-30 %, grau de pureza: P.A.
- Álcool etílico - procedência: Isofar, grau de pureza: P.A.
- Gelatina – procedência: Oetker Produtos alimentícios Ltda., grau de pureza: comercial.
- 2-hidróxietilcelulose – procedência: Dow Comercial, grau de pureza: comercial.
- Fosfato dissódico - procedência: Merck, grau de pureza: P.A.
- Caldo Lactose (Lactose Broth) - procedência: Micromed, grau de pureza: P.A.
- Caldo Lauril Sulfato Triptose - procedência: Himedia, grau de pureza: P.A.



- Caldo verde brilhante lactose bile 2 % - procedência: Micromed, grau de pureza: P.A.
- Caldo EC (EC Medium) - procedência: Acumedia, grau de pureza: P.A.
- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) Levine - procedência: Himedia, grau de pureza: P.A.
- Tiras indicadoras de pH (Indicador universal) - procedência: Merck.

Todos os reagentes citados acima foram utilizados como recebidos.

### 3.2. Equipamentos

Além dos equipamentos e vidrarias tradicionais usados em laboratório, foram utilizados nesta Dissertação os seguintes aparelhos:

- Analisador automático de adsorção física de nitrogênio – Micromeritics, modelo ASAP 2020
- Analisador elementar (CHNS) - Elementar, modelo vario MACRO CHNS
- Analisador termogravimétrico (TGA) – TA Instruments, modelo Q50 V6.4 Build 193
- Difratorômetro de raios X (DRX) - Siemens Kristalloflex<sup>(1)</sup>
- Autoclave vertical – Phoenix modelo AV-50
- Balança analítica Marte – modelo AL 500 C
- Câmara de fluxo laminar
- Fluorescência de raios x por dispersão de energia.(EDFRX) - Shimadzu, modelo EDX 800 HS Detetor: Si(Li) resfriado com nitrogênio líquido e colimador de 10mm<sup>(2)</sup>
- Estufa para incubação - DeLeo equipamentos para laboratórios
- Estufa para esterilização e secagem – Odontobrás
- Contador de colônias – Phoenix CP600
- Estufa Quimis
- Agitador eletro-magnético com peneiras redondas - Bertel
- Agitador de soluções – Phoenix modelo AP 56
- Placa de aquecimento e agitação - IKA RH-KT/C

- Incubadora de bancada com agitação – Nova técnica modelo CT 712
- Microscópio eletrônico de varredura Philips, modelo XL-30 acoplado com EDX e detectores SE e BSE<sup>(3)</sup>
- Microscópio eletrônico de varredura, Jeol modelo JSM-5800LV com detector BSE<sup>(4)</sup>
- Microscópio ótico Olympus, modelo Bx60 acoplado com máquina fotográfica, modelo SC 35

(1) Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP, *Campus Araraquara*)

(2) Instituto de Engenharia Nuclear (IEN) da Comissão Nacional de Energia Nuclear.

(3) Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP).

(4) Seção de Engenharia Mecânica e de Materiais do Instituto Militar de Engenharia (IME).

Para o ensaio microbiológico foram usados os seguintes materiais:

- Pinça metálica
- Seringas descartáveis para tuberculina de 1 mL graduadas estéreis
- Ponteiras descartáveis 1-1000  $\mu\text{L}$  autoclaváveis para pipetadores tipo Eppendorf (azuis)
- Ponteiras descartáveis 1-200  $\mu\text{L}$  autoclaváveis para pipetadores tipo Eppendorf (amarelas)
- Pipetador automático 200-1000  $\mu\text{L}$
- Pipetador automático 10-200  $\mu\text{L}$
- Bico de gás.
- Erlenmeyer de 50 mL
- Tubos de ensaio de 13 mm
- Caixa com ponteiras 200  $\mu\text{L}$
- Caixa com ponteiras 1000  $\mu\text{L}$

- Pérolas de vidro de cerca de 3-4 mm
- Perolas de vidro de cerca de 2 mm
- Placas de Petri de 90 mm
- Alça de níquel cromo com cabo
- Tubos de Durham
- Lã de vidro

### 3.3. Procedimentos

Os principais métodos desenvolvidos na elaboração desta Dissertação são descritos a seguir.

#### 3.3.1. Modificação das resinas

Foram utilizadas três resinas reticuladas comerciais de troca iônica e caráter ácido à base de estireno divinilbenzeno: Amberlite®GT73 da *Rohm and Haas Co.* com grupo tiol, Lewatit® VPOC1800 da *Bayer Co.* com grupo sulfônico e Amberlyst® 15WET da *Rohm and Haas Co.* também com grupo sulfônico. As resinas foram tratadas com ácido clorídrico para garantir as formas ácidas de seus grupos funcionais e em seguida a redução dos íons  $\text{Ag}^+$ , provenientes de solução de nitrato de prata, foi realizada em presença de solução protetora de colóide composta por HEC e gelatina 1:1. Alguns parâmetros foram modificados durante a redução dos íons  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , como por exemplo, o tempo de adição da solução redutora de hidroxilamina ( $T_{ad}$ ), a solução utilizada para controle do pH ( $S_{pH}$ ) e condições do repouso após o controle do pH ( $C_{rep}$ ).

##### 3.3.1.1. Ativação das resinas comerciais por acidificação

As resinas comerciais foram ativadas com HCl 2 % v/v por 24 horas para se garantir a forma protonada dos grupos tiol e sulfônico presentes nas estruturas. Cerca de 10 g de cada resina foram deixados em contato com 200 ml de solução aquosa de ácido clorídrico. Após este tratamento, as resinas foram exaustivamente lavadas com água destilada e deionizada até o resíduo apresentar pH próximo ao da

água. Em seguida, foram lavadas com 50 ml de acetona e secas em estufa a 60 °C por 24 horas. Em nenhuma etapa, foi usada agitação magnética para se evitar a quebra de pérolas.

### 3.3.1.2. Impregnação das resinas com $\text{Ag}^+$

As resinas depois de ativadas foram tratadas com solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  2 % p/v acidificada com duas gotas de  $\text{HNO}_3$  concentrado por 48 horas. Foram pesados 10 g de cada resina, que posteriormente foram deixados em contato com 150 ml de solução aquosa de nitrato de prata e foram vedadas e guardadas ao abrigo de luz. As pérolas de resina impregnadas com  $\text{AgNO}_3$  foram filtradas e lavadas com água destilada e deionizada. A lavagem foi conduzida até teste negativo com solução aquosa de  $\text{NaCl}$  a 1 % p/v no filtrado. Após a filtração e a lavagem, procedeu-se a redução do íon  $\text{Ag}^+$ .

### 3.3.1.3. Reação de redução dos íons $\text{Ag}^+$

Para cada resina impregnada os procedimentos a seguir foram realizados: Duas soluções contendo 50 mL de água destilada, 1,5 g de gelatina e 1,5 g de hidróxi-etil-celulose (HEC) foram preparadas e deixadas sob agitação magnética por 24 h a 45 °C para que houvesse total solubilização. Ambas as soluções foram deixadas em banho de gelo e em uma destas soluções foram adicionados 3 g de cloridrato de hidroxilamina e o pH foi mantido próximo de 12 gotejando-se solução ( $S_{\text{pH}}$ ) de  $\text{NaOH}$  ou  $\text{NH}_4\text{OH}$  2 mol.L<sup>-1</sup>, de acordo com a Tabela 2.

A solução redutora contendo hidroxilamina foi transferida para um funil de adição e a resina foi transferida para a solução gelatina/HEC em banho de gelo. A solução redutora foi adicionada gota a gota à suspensão de resina. O tempo de adição ( $T_{\text{ad}}$ ) variou conforme Tabela 2. Após a adição, a suspensão foi deixada em repouso nas condições ( $C_{\text{rep}}$ ) apresentadas na Tabela 2.

As pérolas foram lavadas exaustivamente com água destilada e deionizada a 60 °C em filtro à vácuo, lavadas com 50 mL de etanol e secas em estufa por 24 h.

Todos os compósitos obtidos foram peneirados com auxílio de um agitador eletro-magnético para eliminar vestígios de prata metálica não aderida ao suporte.

Tabela 2: Condições de síntese dos copolímeros contendo nanopartículas de prata.

Resina	T <sub>ad</sub>	S <sub>pH</sub>	C <sub>rep</sub>
WET 1	20 min	NaOH	10 min banho gelo+1 h T <sub>amb</sub>
WET 2	20 min	NH <sub>4</sub> OH	10 min banho gelo+1 h T <sub>amb</sub>
VPOC 1	20 min	NaOH	10 min banho gelo+1 h T <sub>amb</sub>
VPOC 2	20 min	NH <sub>4</sub> OH	10 min banho gelo+1 h T <sub>amb</sub>
GT73 1	20 min	NaOH	10 min banho gelo+1 h T <sub>amb</sub>
GT73 2	40 min	NaOH	10 min banho gelo+1 h T <sub>amb</sub>
GT 73 3	40 min	NaOH	1h a 50 °C
GT73 4	20 min	NH <sub>4</sub> OH	10 min banho gelo+1 h T <sub>amb</sub>

### 3.4. Caracterização dos materiais

Além das informações retiradas da literatura, as resinas comerciais foram caracterizadas através de análises de área específica, volume e diâmetro médio do poro (ASAP); microscopia ótica (MO); microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDX); análise elementar (CHNS), grau de inchamento (GI) e análise termogravimétrica (TGA).

Os copolímeros sintetizados (WET 1, WET 2, VPOC 1, VPOC 2, GT73 1, GT73 2, GT73 3 e GT73 4) foram caracterizados através de titulometria; fluorescência de raios x por dispersão de energia (EDFRX); área específica, volume e diâmetro médio do poro (ASAP); microscopia ótica (MO); microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDX); análise elementar (CHNS), análise termogravimétrica (TGA) e difratometria de raios X.

#### 3.4.1. Porosidade e área superficial específica (ASAP)

A área específica (S), o diâmetro médio (D) e o volume dos poros (V) dos copolímeros, antes e depois da impregnação com prata, foram determinados por fisissorção de nitrogênio através de Analisador Automático de Adsorção Física Micromeritics, modelo ASAP 2010. A área específica foi calculada de acordo com a

equação de BET pela adsorção de N<sub>2</sub>, enquanto o diâmetro médio e o volume de poros foram calculados pela equação de BJH pela dessorção de N<sub>2</sub>.

#### 3.4.2. Microscopia ótica (MO)

Com o auxílio do microscópio ótico, as pérolas dos copolímeros, antes e depois da impregnação com prata, foram avaliadas quanto ao seu aspecto e morfologia. As pérolas foram colocadas em lâminas de vidro, sem tratamento prévio, e examinadas através da lupa estereoscópica.

#### 3.4.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A superfície externa e a estrutura interna dos copolímeros sintetizados foram avaliadas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV). O material analisado foi colocado em um suporte metálico com o auxílio de fita adesiva dupla face e recoberto com fina camada de ouro. A voltagem de aceleração foi de 20kV. O MEV foi acoplado a um espectrômetro de dispersão de energia de raios X (EDX). Dois detectores foram utilizados: detector de elétrons secundários (SE) e detector de elétrons retroespalhados (BSE).

#### 3.4.4. Análise elementar (CHNS)

Os copolímeros, antes e depois da impregnação com prata, foram macerados em gral de ágata e secos em estufa a 60 °C por 48 h. Numa cápsula de estanho, foram pesados 10 mg de amostra e colocados em um tubo de combustão onde flui corrente de hélio.

#### 3.4.5. Grau de inchamento (GI)

Os copolímeros de partida foram analisados quanto ao seu grau de inchamento para que a sua expansão em água fosse avaliada. As resinas foram empacotadas até o volume de 0,3 mL em seringas de 1 mL de capacidade, com precisão de 0,01 mL com o orifício selado. O leito da amostra foi nivelado com o

auxílio do próprio êmbolo. Foram adicionados 0,8 mL de água destilada e deionizada utilizando um pipetador pelas paredes da seringa. As bolhas de ar foram retiradas com auxílio de um fio de metal. Após 24 horas, o volume final foi verificado e o grau de inchamento foi calculado através da Equação 1. O ensaio foi feito em duplicata.

$$GI = (V_f - V_i) 100 / V_i \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

GI = grau de inchamento (%)

$V_i$  = volume do leito do copolímero seco (mL)

$V_f$  = volume do leito do copolímero em contato com a água após 24 h (mL)

#### 3.4.6. Análise termogravimétrica (TGA)

Para verificar a estabilidade térmica os copolímeros sintetizados foram submetidos à análise termogravimétrica. Uma pequena quantidade da amostra foi colocada em um porta-amostra de alumina e aquecida a 700 °C, numa taxa de aquecimento de 20 °C.min<sup>-1</sup>, em atmosfera de nitrogênio, sob fluxo de 100 mL.min<sup>-1</sup>. Foram obtidas curvas de degradação termogravimétrica da perda de massa em função do aumento da temperatura. As amostras foram maceradas para que a amostragem fosse mais homogênea e gerasse picos mais definidos.

#### 3.4.7. Fluorescência de raios x por dispersão de energia (EDFRX)

Os copolímeros modificados foram analisados quanto ao teor de prata através de fluorescência de raios X por dispersão de energia. A análise consiste de um detector semicondutor de Si(Li), resfriado com nitrogênio líquido e as condições de medida no equipamento de EDFRX foram: 50 kV, 100 µA, tubo de raios X de ródio, colimador com 10 mm de diâmetro no detector.

#### 3.4.8. Titulometria

O teor de prata foi também quantificado através da técnica de análise titulométrica. Os seguintes procedimentos foram realizados:

### Preparo dos reagentes

- Solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (0,01 M): O padrão de  $\text{AgNO}_3$  foi triturado e seco em estufa a  $150\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas. Após o tempo em estufa, o padrão de  $\text{AgNO}_3$  foi transferido para um dessecador até alcançar a temperatura ambiente e então, pesaram-se cerca de 0,85 g. A solução padrão foi preparada dissolvendo-se o sal em água destilada. Foram adicionados 0,5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado para evitar a hidrólise do íon  $\text{Ag}^+$ . A solução foi então transferida para balão de 500 mL e avolumou-se com água destilada e, em seguida, guardada em frasco escuro e rotulada.
- Solução aquosa de  $\text{KSCN}$  (0,01 M): Foram pesados 0,4 g do sal que foi dissolvido em água destilada em um balão de 500 mL, avolumou-se com água destilada.
- Solução aquosa de  $\text{HNO}_3$  (6 M): foram transferidos 208 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado para balão de 500 mL, avolumou-se com água destilada.

Pesou-se 0,1 g de cada resina em um erlenmeyer, onde foram adicionados 20 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. O erlenmeyer foi aquecido brandamente em capela, colocando-se um funil na boca, aquecendo-se à ebulição até completa expulsão dos vapores nitrosos. Após a digestão da prata, a solução foi filtrada em um funil contendo pequena porção de lã de vidro, para que as resinas fossem retiradas da solução. O funil contendo a resina foi lavado com mais 10 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado.

O filtrado foi transferido e avolumado em um balão de 100 mL. Em seguida, foram realizadas quatro titulações e a partir de duas titulações concordantes, calculou-se o volume médio gasto nas titulações. Titulou-se com solução de tiocianato 0,01M, empregando solução saturada de sulfato de ferro III amoniacal como indicador. O teor de prata encontrado em cada resina foi calculado através da Equação 2:



$$\% \text{ Ag} = \frac{V_{\text{SCN}} \times M_{\text{SCN}} \times \text{me}_{\text{Ag}} \times 100}{P \text{ amostra} \times 25/100} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

% Ag = Teor de prata das resinas (%)

$V_{\text{SCN}}$  = volume médio de tiocianato

$M_{\text{SCN}}$  = massa de tiocianato

$\text{me}_{\text{Ag}}$  = miliequivalente da prata

P amostra = peso da amostra

#### 3.4.9. Difratometria de raios x

Os difratogramas de raios X foram obtidos utilizando-se um difratômetro Siemens Kristalloflex, com filtro de níquel e radiação  $\text{CuK}\alpha$ , entre os ângulos  $2\theta$  de 4 a  $70^\circ$ , tempo de contagem de 3 s e passo 0,03. As amostras foram colocadas sobre um suporte de vidro.

### 3.5. Ensaio para confirmação da pureza da cepa

Os ensaios listados a seguir foram conduzidos em triplicata de acordo com a metodologia apresentada no Manual da Merck (1996). Os procedimentos foram realizados em fluxo laminar para prevenir contaminações.

Foram testadas as cepas de *Escherichia coli*: ATCC<sup>®</sup>25922<sup>TM</sup> e OHd5-k-12. A positividade do Teste Indicativo de *E.Coli* foi verificada pela coloração das colônias desenvolvidas na placa. Para todos os demais testes, a positividade foi observada pela produção de gás no interior dos tubos de Durham.

- Teste Presuntivo

Meio de crescimento: Caldo Lauril Sulfato Triptose - LST

Procedimento: A cepa foi semeada com auxílio de uma alça de níquel cromo em um tubo de ensaio contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose estéril e um tubo de Durhan invertido e foi incubada a 37 °C durante 48 h.

Teste Confirmativo para Coliformes Totais

Meio de crescimento: Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2 %

Procedimento: Uma alçada de cada tubo de Caldo LST positivo foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de Caldo verde brilhante lactose bile 2 % estéril e um tubo de Durhan invertido e foi incubada a 37 °C durante 48 h.

- Teste Confirmativo para Coliformes Fecais

Meio de crescimento: Caldo EC

Procedimento: Uma alçada de cada tubo de Caldo LST positivo foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de Caldo EC estéril e um tubo de Durhan invertido e foi incubada a 45,5 °C durante 48 h.

- Teste Indicativo de *E.Coli*

Meio de cultura: Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) Levine

Procedimento: As culturas positivas em caldo EC foram repicadas com auxílio de uma alça para as placas contendo Agar EMB em forma de estrias. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A presença de *E.coli* é indicada pelo aparecimento de colônias verde metálicas.

### 3.6. Escolha dos meios de cultura

O teste foi direcionado para a escolha do meio para enriquecimento e crescimento bacteriano a ser utilizado durante o período dos ensaios de avaliação da atividade biocida dos compósitos modificados. Foram testados os seguintes meios: lauril sulfato triptose, caldo lactose e caldo verde brilhante lactose bile 2 %.

Em um tubo de ensaio contendo um tubo de Durhan invertido foram adicionados 10 mL de cada meio. A cepa ATCC®25922™ foi semeada com auxílio de uma alça de níquel cromo e incubada a 37 °C durante 24 h. A turbidez e a

presença de gás no interior do tubo de Durhan, indicativos do crescimento bacteriano, foram verificadas 15 e 24 h após a semeadura. Os ensaios foram feitos em triplicata.

### 3.7. Avaliação da atividade biocida

Antes de se realizar o ensaio bactericida, as resinas comerciais e as respectivas resinas derivadas contendo prata foram submetidas à neutralização que se procedeu da seguinte maneira:

Cerca de 2 g de cada resina foram deixadas por 24 h em 100 mL de solução 2 % p/v de bicarbonato de sódio. Em seguida as pérolas foram lavadas exaustivamente com água destilada e deionizada até pH próximo ao da água e rinsadas com 40 mL de etanol. As resinas foram secas em estufa a 60 °C por 48 h.

As resinas de partida, neutralizadas e não neutralizadas, tiveram o seu pH medido com o auxílio de tiras indicadoras de pH. Cerca de 1 mL de água destilada e deionizada foram adicionadas a uma seringa de orifício fechado contendo resinas até o nível de 0,3 mL. A medição do pH foi realizada 2 minutos e 16 horas após a adição de água às resinas.

Por medida de comparação, as resinas de partida também foram avaliadas quanto a sua atividade biocida sem que se realizasse a neutralização prévia.

Os ensaios para avaliar a capacidade de redução do número de células viáveis dos copolímeros foram realizados utilizando suspensão de *Escherichia coli* ATCC®25922™ nas concentrações de  $10^3$  a  $10^7$  células/mL. Através da técnica de contagem em placas, foi determinado o número de células viáveis. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

A seguir, estão descritos as soluções e meios, bem como os materiais necessários para o desenvolvimento dos ensaios microbiológicos:

- Solução salina 0,9 %: 2,7g de NaCl foram dissolvidos em 300 mL de água destilada.
- Caldo Lauril Sulfato Triptose preparado conforme instruções da embalagem.
- Agar EMB Levine preparado conforme instruções da embalagem.
- Microtubos com solução salina para diluição: em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 900 µL de salina com auxílio de um pipetador automático.

- Tubos com solução salina para diluição das suspensões bacterianas: cinco tubos de polipropileno do tipo Falcon foram identificados com as concentrações de células/mL de  $10^3$  a  $10^7$ . Em seguida, foram preenchidos com 9000  $\mu$ L de salina 0,9 %. Ao tubo identificado com a concentração de  $10^7$  células/mL, foi adicionada uma alíquota a mais de 900  $\mu$ L de salina, com volume final de 9900  $\mu$ L.
- Colunas contendo as amostras: seringas de 1 mL foram utilizadas como colunas. Para suportar a amostra dentro da seringa, foi colocada, previamente, pequena quantidade de lã de vidro estéril dentro da mesma. O conjunto de seringa e lã de vidro foi preenchido com a amostra até o volume de 0,2 mL. O conjunto foi colocado em um tubo de ensaio de forma que a seringa fosse suspensa pela sua base, conforme mostrado na Figura 12.

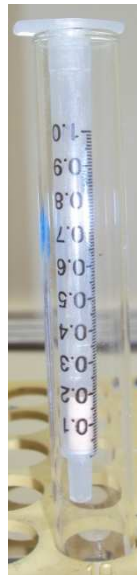


Figura 12: Tubo de ensaio contendo a coluna de eluição.

- Placas com Agar EMB Levine: Ao ser retirado da autoclave, o meio EMB Levine foi vertido em placas de Petri. Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e reservadas.
- Meio de Cultura: em ambiente estéril, foram pipetados 100  $\mu$ L de cultura pré-preparada de *Escherichia coli* em 10 mL de Caldo LST em erlenmeyer de 50 mL. A mistura foi deixada sob agitação a 120 rpm à temperatura de 37 °C em incubadora por uma noite, até a fase exponencial de crescimento de cerca de  $1-2 \times 10^9$  células/mL.

Os meios, soluções e materiais listados acima foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos para o controle de esterilidade. Todo preparo do ensaio microbiológico foi realizado em ambiente estéril (cabine de fluxo laminar).

A seguir serão delineadas as etapas realizadas para avaliar a atividade bactericida das amostras pelo método de contagem em placas:

- Suspensão de bactérias: A partir de 100 µL da cultura de pernoite, com concentração de aproximadamente  $10^9$  células/mL, foi preparada uma suspensão de células bacterianas com concentração de  $10^7$  células/mL. Os 100 µL da cultura de pernoite foram adicionados a 9900 µL de salina a 0,9 % e desta forma foi obtida a suspensão com concentração de  $10^7$  células/mL. Em seguida, a suspensão foi agitada vigorosamente em um agitador de tubos. Para o preparo da suspensão com concentração de  $10^6$  células/mL, foi transferida uma alíquota de 1000 µL do tubo contendo a suspensão com concentração de  $10^7$  células/mL para um tubo contendo 9000 µL de salina a 0,9 %. O mesmo procedimento foi realizado para preparar as suspensões com concentração de  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  células/mL. Estas suspensões foram utilizadas no ensaio de eluição.
- Ensaio de eluição: através da coluna contendo a amostra foram eluídas alíquotas de 500 µL de solução salina a 0,9 % e das suspensões de células com concentração de  $10^3$  a  $10^7$  células/mL. Inicialmente, foi eluída através da coluna uma alíquota de 500 µL de solução salina para acondicionar a amostra, a qual foi descartada. Em seguida, foram eluídas mais quatro porções de 500 µL a qual foi recolhida em tubo de ensaio. Após a eluição da solução salina, foi eluída através da mesma coluna uma alíquota de 500 µL da suspensão com concentração de  $10^3$  células/mL para o acondicionamento da amostra. Esta alíquota foi descartada. Após acondicionar a amostra foram eluídas mais três alíquotas de 500 µL e recolhidas em um tubo de ensaio. Foi mantido um fluxo médio de 21 gotas de percolado por minuto. O mesmo procedimento foi realizado para as suspensões com concentrações de  $10^4$  a  $10^7$  células/mL.

- Diluição das suspensões eluídas, das suspensões controle e inoculação: as suspensões eluídas e controle (antes da eluição através da coluna) com concentrações de  $10^4$  a  $10^7$  células/mL foram diluídas. As diluições foram feitas de 1:10. Uma alíquota de 100  $\mu$ L das suspensões iniciais foram transferidas para microtubos com 900  $\mu$ L de salina a 0,9 %. As diluições foram repetidas até alcançar a concentração de  $10^3$  células/mL. Em seguida, 100  $\mu$ L de cada diluição foi inoculada em placas de Petri contendo agar EMB. Para a solução salina foi aplicada na placa uma alíquota de 400  $\mu$ L. Para cada concentração foram inoculadas três placas para contagem.
- Incubação: as placas foram incubadas em posição invertida em estufa por 48 horas a 37 °C. Após esse período as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas com o auxílio do contador de colônias ilustrado na Figura 13.



Figura 13: Contador de colônias utilizado para contagem de UFC.

### 3.8. Ensaio de estabilidade dos copolímeros

O ensaio de estabilidade foi conduzido a fim de verificar se há desprendimento de partículas de prata durante a eluição, verificando-se assim a estabilidade dos compósitos sintetizados. Os mesmos materiais e meios de cultura empregados na avaliação da atividade biocida foram utilizados neste ensaio.

- Foram utilizados para o ensaio 450  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril, a qual foi eluída através da coluna contendo 0,2 mL da amostra de copolímeros. Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de suspensão com concentração de 104 células/mL. Após 3 minutos de contato da suspensão bacteriana com o eluído, foi retirada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  e plaqueada. Esse procedimento foi feito repetido mais duas vezes.

A ação bactericida dos copolímeros foi estimada pela redução do número de células viáveis através da Equação 3. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do Teste *t-Student* e Análise de Variância (ANOVA) (BEIGUELMAN, 2002).

$$\text{Ação} = [(UFC_i - UFC_f) / UFC_i] \times 100 \qquad \text{Equação 3}$$

Onde:

Ação = Redução do número de células viáveis (%)

$UFC_i$  = unidades formadoras de colônias antes da eluição através das pérolas de copolímeros

$UFC_f$  = unidades formadoras de colônias após a eluição através das pérolas de copolímeros

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho de pesquisa que gerou esta dissertação pode ser dividido em quatro principais partes. Para uma melhor disposição dos resultados e consequente compreensão do leitor, este capítulo será dividido da seguinte forma:

- ✓ Modificação dos copolímeros comerciais;
- ✓ Caracterização dos compósitos e de suas matrizes poliméricas;
- ✓ Escolha da cepa e meios de cultura;
- ✓ Avaliação da atividade biocida

### 4.1. Modificação dos copolímeros comerciais

A utilização de polímeros baseados em estireno (STY) e divinilbenzeno (DVB) foi em função da boa resistência física e mecânica, permitindo a sua estabilidade em uma larga faixa de temperatura e pH. A adição de grupos polares aos copolímeros baseados em STY-DVB confere uma maior interação entre a fase polimérica e aquosa. O aumento da hidrofiliabilidade do copolímero é desejado já que aumenta a difusão no processo de adsorção dos compostos, neste caso, a prata (Flores *et al.*, 2007).

Sendo assim, as resinas comerciais Amberlite®GT73, Lewatit® VPOC1800 e Amberlyst® 15WET foram escolhidas como suporte para as nanopartículas de prata. Elas são resinas de troca iônica baseadas em STY-DVB possuindo grupos polares em sua estrutura e seletividade para determinados íons, entre eles Ag<sup>+</sup>. Com isso, esperava-se que a prata tivesse grande interação com os grupos funcionais dos suportes garantindo compósitos estáveis ao final da síntese.

A escolha das resinas Amberlyst®15WET e Lewatit®VPOC1800 que possuem características bastante similares como o caráter ácido e o grupo funcional, foi visando analisar a relação entre o tamanho do poro e a incorporação da prata, já que há uma substancial diferença entre suas porosidades.



Já a porosidade da Amberlite®GT73 é similar a da Amberlyst®15WET, porém seus grupos funcionais são distintos, permitindo analisar a influência deste parâmetro na ancoragem da prata.

O protetor de colóide utilizado foi uma solução de HEC e gelatina. Esta mistura é usada com sucesso como agente de suspensão na síntese de copolímeros (COUTINHO, CUNHA e GOMES, 2004). No caso específico da síntese de nanopartículas, a HEC contribui aumentando a solubilidade da solução protetora ao comparar-se à solução composta unicamente por gelatina. A concentração de  $\text{AgNO}_3$  utilizada como precursora foi baixa enquanto a da mistura gelatina e HEC foi relativamente alta, considerando-se a possibilidade de ocorrer uma rápida reação de redução da prata, garantindo assim que uma maior quantidade de prata seria adsorvida pelo protetor de colóide, evitando a coalescência das partículas (LU e CHOU, 2008).

A Tabela 3 apresenta as principais características dos três copolímeros utilizados como suporte para as nanopartículas de prata. As informações foram obtidas com base nas fichas de informação dos produtos disponibilizadas pelos respectivos fabricantes.

Tabela 3: Principais características dos três copolímeros utilizados como suporte para as nanopartículas de prata.

Copolímero	Principais características
Amberlyst®15WET	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Resina catiônica, fortemente ácida, sulfônica de estrutura macrorreticulada.</li> <li>- Diâmetro médio dos poros: 300 Å</li> <li>- Capacidade retenção de água: 52-57 %</li> <li>-Densidade aparente: 0,770 g/cm<sup>3</sup></li> <li>- Capacidade de troca: 1,7 eq/L</li> <li>Dimensão média: 0.35 – 1.18 mm</li> </ul>
Lewatit®VPOC1800	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resina catiônica, fortemente ácida, sulfônica de estrutura tipo gel.</li> <li>- Diâmetro médio dos poros: 20 a 30 Å</li> <li>- Capacidade retenção de água: 47 %</li> <li>- Densidade aparente: 0,820-0920 g/cm<sup>3</sup></li> <li>- Capacidade de troca: 1,9 eq/L</li> </ul>
Amberlite®GT73	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resina catiônica, fracamente ácida, contendo grupo tiol, de estrutura macrorreticulada.</li> <li>- Diâmetro médio dos poros: 300 Å</li> <li>- Capacidade retenção de água: 50-56 %</li> <li>- Densidade aparente: 0,785 g/cm<sup>3</sup></li> <li>- Capacidade de troca: 1,2 eq/L</li> <li>- Dimensão média: 0.42 - 0.85 mm</li> </ul>

A proposta inicial era sintetizar um copolímero contendo prata para cada resina comercial, utilizando as mesmas condições de síntese e solução de NaOH para controle do pH reacional. Contudo, após a síntese foi observado que em todas as resinas houve uma grande aglomeração de partículas de prata, formando verdadeiras camadas ao redor das pérolas que se desprendiam facilmente. Chou e Ren (2000) reportaram este comportamento da prata em seus experimentos e

atribuíram este fato ao alto pH reacional. A obtenção de precipitado era proporcional a concentração de  $\text{OH}^-$ , indicando que a adição de NaOH catalisa a reação de redução de íons metálicos porém gera precipitados maiores. Lee e colaboradores (2004) concluíram que o aumento do pH leva a uma diminuição da proporção de nanopartículas e um aumento da monodispersão.

A literatura mostra que o tamanho da partícula de prata é inversamente proporcional (FABREGA *et al.*) ao seu efeito biocida, além da estabilidade do copolímero também ser uma característica desejada no material obtido. Sendo assim, outra rota foi empregada para ajustar os parâmetros utilizando-se  $\text{NH}_4\text{OH}$  para controle de pH. Por ser uma base fraca e por ser quimicamente similar à hidroxilamina, agente redutor utilizado, esperavam-se obter partículas mais finas.

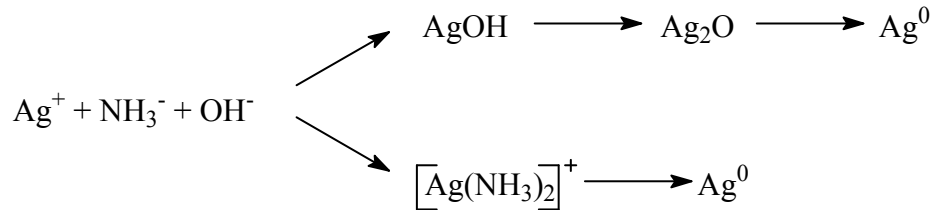
O uso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  no meio reacional produziu compósitos na forma de pérolas visivelmente mais dispersas e fixas ao suporte polimérico, o que indica a possibilidade da ocorrência da reação de redução à  $\text{Ag}^0$  por rotas distintas. No caso do  $\text{NH}_4\text{OH}$ , há indícios de que tenha havido a formação de um complexo de prata, esta técnica é conhecida como reação do espelho de prata (BUKREEVA *et al.*, 2008), pois macroscopicamente na reação conduzida com  $\text{NH}_4\text{OH}$  houve o aparecimento de pérolas metálicas.

Antipov e colaboradores (2002) implementaram pela primeira vez a síntese de nanopartículas metálicas diretamente na superfície de polieletrólitos pela redução de íons adsorvidos. Outros autores já reportaram a utilização desta técnica, empregando em sua maioria, açúcares como agentes redutores. Chen e colaboradores (2005) prepararam nanopartículas de prata suportadas em sílica pela redução por glicose. A formação do complexo confere um controle maior sob a agregação das partículas de prata, durante a redução dos íons  $\text{Ag}^+$  (Yin, *et al.*, 2002).

Na reação do espelho de prata, geralmente o agente redutor é um aldeído e pode ser simplificada pela reação a seguir:



Os reagentes empregados na síntese das nanopartículas possibilitam a ocorrência das reações segundo as rotas apresentadas a seguir e podem ocorrer simultaneamente.



O esquema apresentado é apenas uma representação de possíveis rotas reacionais para a redução da prata e não leva em consideração a estequiometria da reação assim como os estados físicos da matéria.

Usando  $\text{NH}_4\text{OH}$  durante a reação de redução, foi possível preparar nanopartículas de prata de menor tamanho e melhor distribuição do que a reação em que se utilizou apenas  $\text{NaOH}$ . A partir deste processo de síntese, é possível que a formação do intermediário  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  tenha favorecido a obtenção de altas taxas de partículas nanométricas bem distribuídas no suporte polimérico, conforme ilustração na Figura 14.

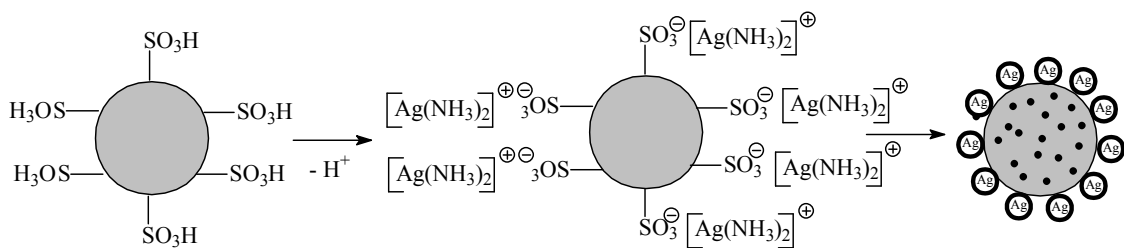


Figura 14: Ilustração da obtenção de nanopartículas de prata através da formação de complexo  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  suportadas em matriz polimérica contendo grupo sulfônico.

O maior tamanho das partículas de prata formadas no suporte polimérico na presença de  $\text{NaOH}$  é explicado pela forma em que ocorre a redução do  $\text{Ag}^+$  em presença de  $\text{Ag}_2\text{O}$ . A cinética desta reação foi estudada pela primeira vez por Lewis que verificou a ocorrência de uma autocatálise onde a formação de  $\text{Ag}_2\text{O}$  pode agir como núcleo que promove a redução do  $\text{Ag}^+$  na superfície do  $\text{Ag}_2\text{O}$  inicialmente formado e assim, consecutivamente, formando aglomerados de prata metálica. Este

processo pode ser representado na Figura 15. Uma das características desta reação é a de que a sua velocidade é aumentada pelo aumento da superfície de contato entre o  $\text{Ag}^+$  a ser reduzido e o  $\text{Ag}_2\text{O}$  depositado, alcançando desta forma a sua velocidade máxima de reação que só decresce quando há carência da fase reagente (L'VOV, 2009).

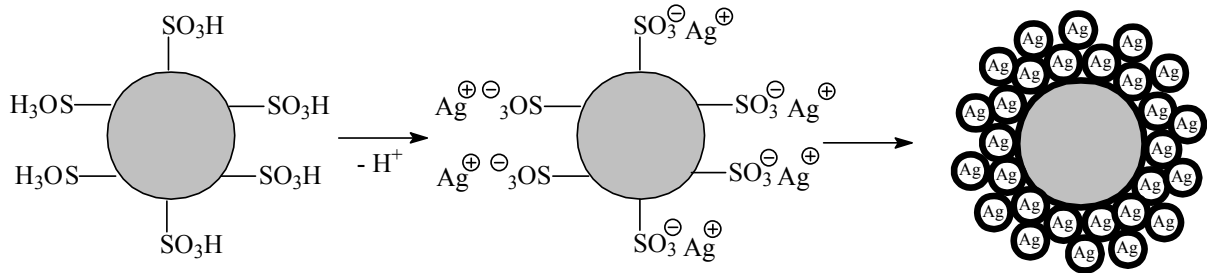


Figura 15: Ilustração da obtenção de nanopartículas de prata em presença de  $\text{Ag}_2\text{O}$  suportadas em matriz polimérica contendo grupo sulfônico.

Além da solução utilizada para regular o pH reacional, foram utilizados diferentes parâmetros como tempo de redução e repouso nas resinas derivadas da Amberlite<sup>®</sup>GT73, gerando assim, quatro diferentes copolímeros provenientes deste suporte. Na análise visual, não houve diferença significativa destes parâmetros no aspecto final das resinas.

As resinas originais e suas derivadas foram identificadas com os códigos descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Códigos das resinas e suas descrições

Código da Resina	Descrição
15WET	Amberlyst <sup>®</sup> 15WET
15WET 1	Derivada da Amberlyst <sup>®</sup> 15WET
15WET 2	Derivada da Amberlyst <sup>®</sup> 15WET
VPOC	Lewatit <sup>®</sup> VPOC1800
VPOC 1	Derivada da Lewatit <sup>®</sup> VPOC1800
VPOC 2	Derivada da Lewatit <sup>®</sup> VPOC1800
GT73	Amberlite <sup>®</sup> GT73
GT73 1	Derivada da Amberlite <sup>®</sup> GT73
GT73 2	Derivada da Amberlite <sup>®</sup> GT73
GT73 3	Derivada da Amberlite <sup>®</sup> GT73
GT73 4	Derivada da Amberlite <sup>®</sup> GT73

## 4.2. Caracterização dos compósitos e de suas matrizes poliméricas

Os resultados das caracterizações serão mostrados e discutidos nesta seção.

### 4.2.1. Determinação do grau de porosidade por ASAP

A avaliação do grau de porosidade dos compósitos foi realizada antes e depois da adição da prata. Com base das medidas de área específica, volume e diâmetro de poros objetivou-se avaliar o grau de interferência que a ancoragem da prata representa sobre estes parâmetros. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos pelo analisador automático de adsorção física (ASAP) para os copolímeros.

Tabela 5 - Caracterização da porosidade dos compósitos

Compósito	S <sup>a</sup> (m <sup>2</sup> /g)	V <sup>b</sup> (cm <sup>3</sup> /g)	D <sup>c</sup> (Å)
15WET	42,109	0,321	234,914
15WET 1	35,835	0,265	242,709
15WET 2	36,386	0,276	251,865
VPOC	3,798	0,002	21,559
VPOC 1	0,042	*	*
VPOC 2	0,038	*	*
GT73	48,394	0,108	119,92
GT73 1	22,629	0,073	131,534
GT73 2	18,628	0,088	190,278
GT73 3	18,198	0,091	197,013
GT73 4	16,517	0,091	261,797

a) Área superficial obtida pela equação de BET; b) Volume poros fixos obtido pela equação de BJH;

c) Diâmetro médio de poros obtido pela equação de BJH.

\*abaixo do limite de detecção

Os baixos valores encontrados nas resinas VPOC, VPOC 1 e VPOC 2 são explicados por esta resina ser do tipo gel, sendo assim possui uma fase polimérica contínua quando se encontra no estado seco, enquanto as resinas macroporosas possuem canais que interligam os poros em grande extensão da resina (TEIXEIRA, COUTINHO e GOMES, 2001). Os valores de área superficial e volume de poros diminuiram significativamente em todos os compósitos sintetizados ao comparar-se com sua respectiva matriz polimérica. Este comportamento pode ser atribuído a presença e aglomeração de partículas de prata dentro dos poros e canais, resultando na diminuição de espaços livres e sua consequente não-medição (CAI, ZHANG e ZHONG, 1998). Na verdade, o valor da área superficial dos compósitos sintetizados não representa a realidade, já que existem partículas de prata de dimensões tão diminutas no interior dos poros, que se encontram abaixo do limite de detecção do aparelho. Um dos fatores que determinam o tamanho das partículas de prata formadas é o tamanho do poro, já que este espaço representa uma barreira física que impede a aglomeração das partículas, servindo como *templates* (moldes).

As resinas macroporosas apresentaram aumento do diâmetro do poro com a adição da prata. Este fato pode ser explicado por uma possível distensão das paredes do poro gerada pela presença da partícula em seu interior (GUO et al.,

2003). No entanto, na resina tipo gel houve a tendência contrária, possivelmente neste caso as partículas não foram capazes de alargar o poro da matriz polimérica e a diminuição do diâmetro do poro ocorre pelo seu preenchimento parcial.

#### 4.2.2. Microscopia ótica (MO)

A morfologia da superfície dos copolímeros foi avaliada através de um microscópio ótico. As Figuras 16, 17 e 18 mostram as microscopias das resinas matrizes 15WET, GT73 e VPOC e seus respectivos copolímeros derivados.



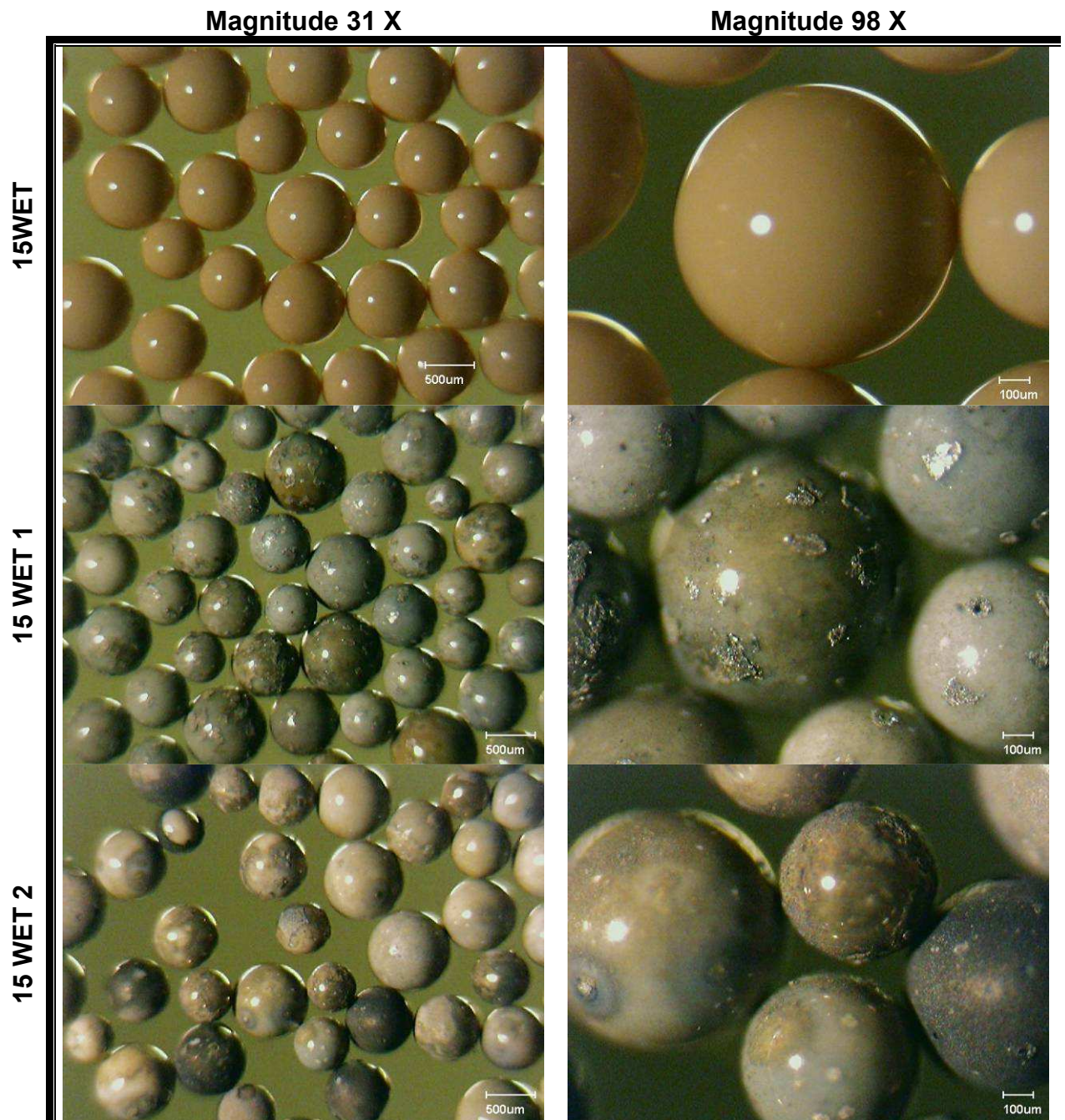


Figura 16: Microscopias óticas do copolímero 15WET e seus derivados contendo prata.

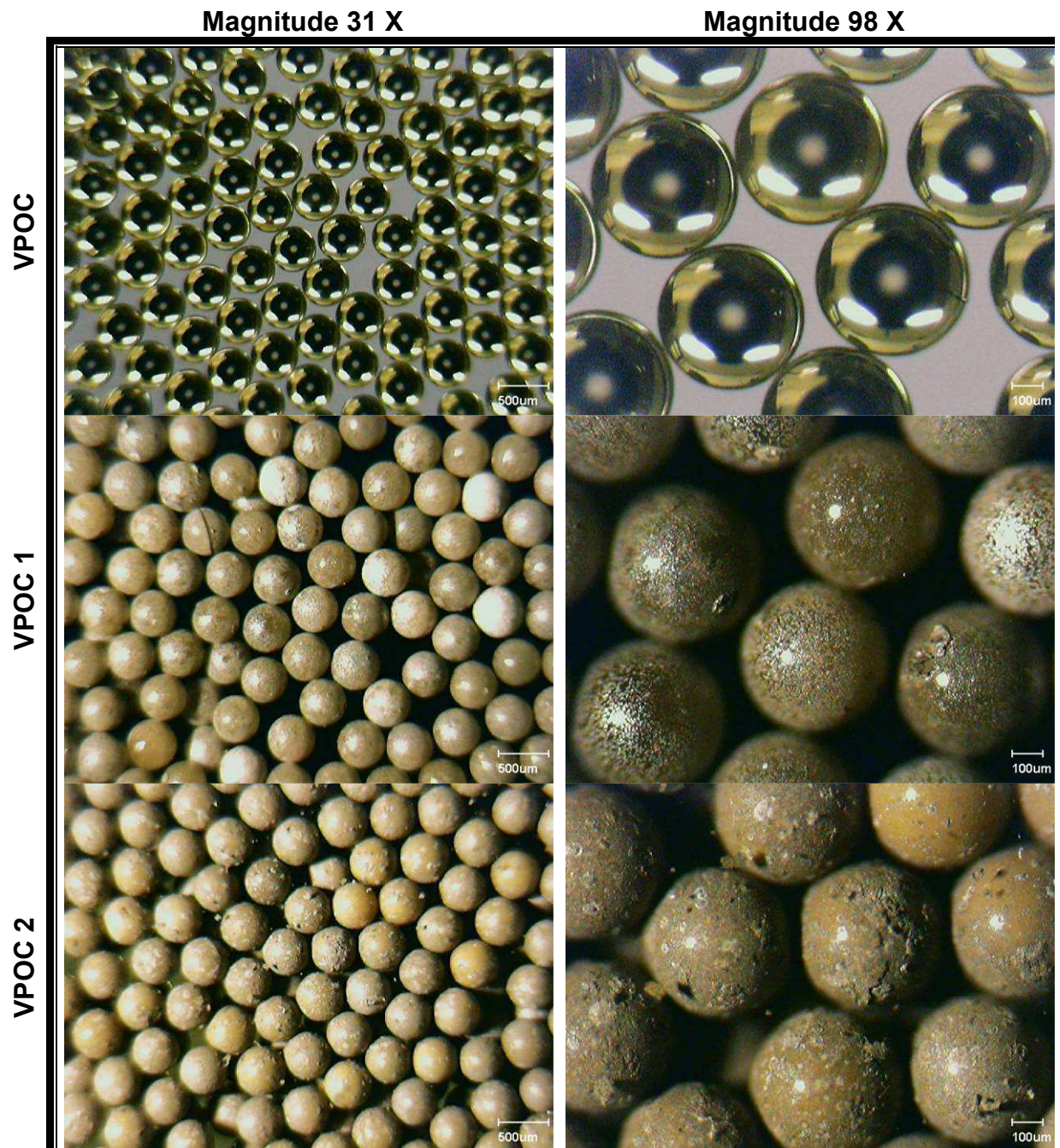


Figura 17: Microscopias óticas do copolímero VPOC e seus derivados contendo prata.

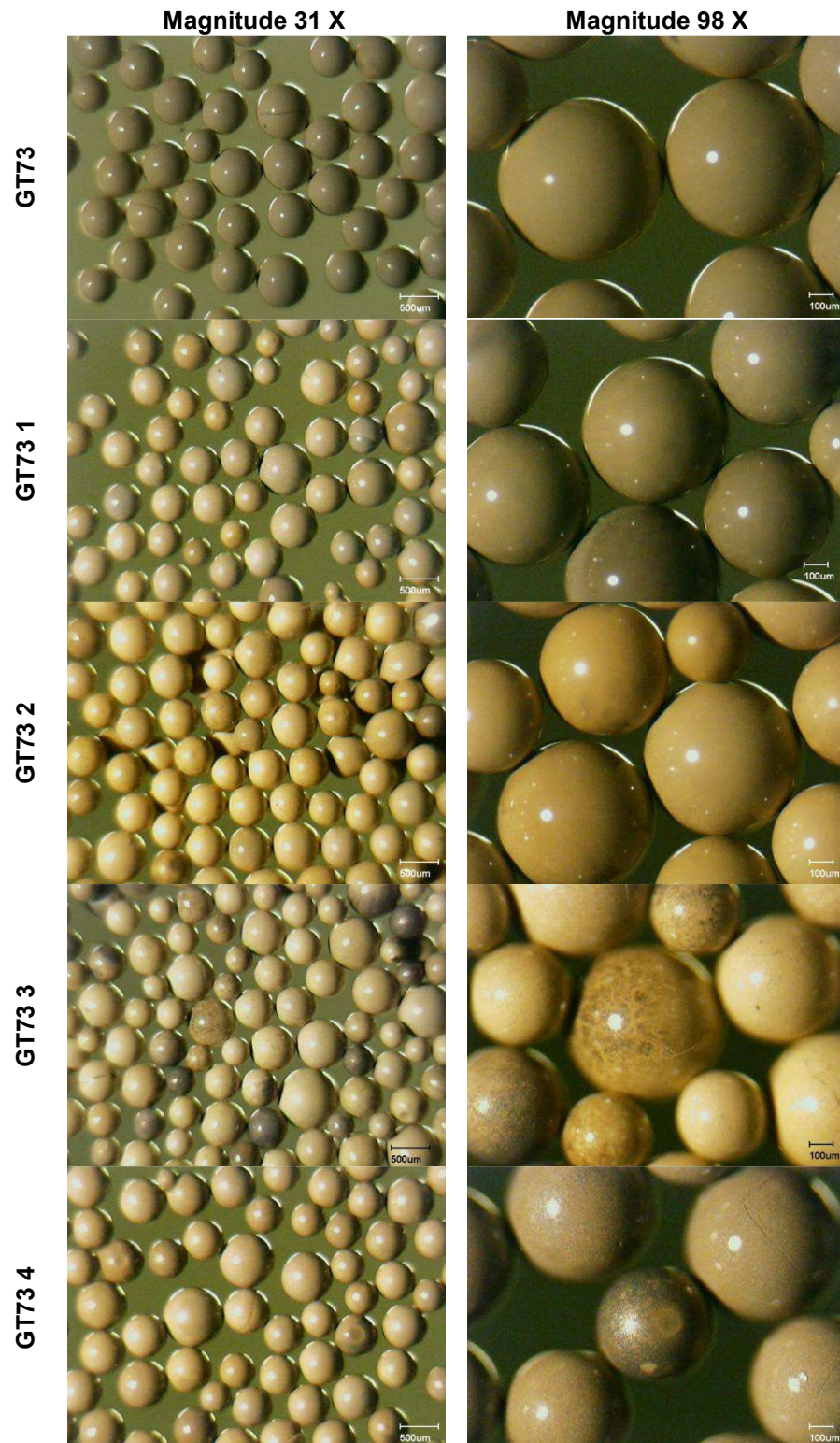


Figura 18: Microscopias óticas do copolímero GT73 e seus derivados contendo prata.

Através do microscópio ótico com aumentos de 31 e 98 vezes, foi possível avaliar a morfologia externa das resinas. Todas as resinas que tiveram adição de prata mantiveram suas dimensões similares aos seus copolímeros de partida, porém foi possível verificar uma diferença de coloração na superfície polimérica que variou de sutil a marcante.

As resinas derivadas da GT73 obtiveram depósito de prata menos evidente. A coloração da resina comercial, bege opaca, praticamente não foi alterada nos compósitos GT73 1 e GT73 2. No entanto, a prata mostra-se evidente nos compósitos GT73 3 e GT73 4, sendo que no GT73 3, as pérolas mostraram uma distribuição mais heterogênea variando de pérolas claras a pérolas acinzentadas. O compósito GT73 4 apresentou pérolas mais castanhas do que as demais resinas derivadas de GT73 e com brilho notavelmente metálico e distribuição homogênea.

A resina 15WET, assim como a GT73, é de natureza macroporosa com aspecto opaco. Os compósitos resultantes 15WET 1 e 15WET 2 apresentaram diferença marcante em suas colorações quando comparados a resina de partida, pois as pérolas obtiveram coloração acinzentada com brilho metálico. Em ambas foi possível perceber a presença da prata tanto na superfície, quanto em seu interior. A 15WET 1 formou placas metálicas na superfície, devido à aglomeração das partículas.

O copolímero VPOC apresenta pérolas translúcidas e brilhantes características de resinas do tipo gel. Contudo, com a adição da prata, as resinas adquiriram aparência opaca de coloração castanha. A perda da transparência das resinas pode ser atribuída às partículas de prata em seu interior que dificultam a propagação da luz. A micrografia mostra o compósito VPOC 1 com menor formação de partículas agregadas na superfície, porém a olho nu foi possível observar uma característica peculiar na VPOC 1: a formação de um pó roxo completamente desprendido da matriz polimérica. Essa coloração foi reportada em estudos anteriores como sendo uma evidencia da síntese de nanopartículas de prata (ZHANG *et al.*, 2003; CHAIRAM, POOLPERM e SOMSOOK, 2009; MATSUMOTO *et al.*, 2005).

#### 4.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura permitiram observar o tamanho, formato e dispersão das nanopartículas formadas. O detector a ser utilizado (BSE ou SE) foi determinado no momento da análise em função das melhores imagens geradas por cada um. A composição das nanopartículas foi obtida através da técnica de espectroscopia por dispersão de energia de raios X (EDX) realizada durante os ensaios de MEV. As Figuras 19 a 26 mostram a morfologia e distribuição das partículas nos compósitos e seus respectivos gráficos de EDX.

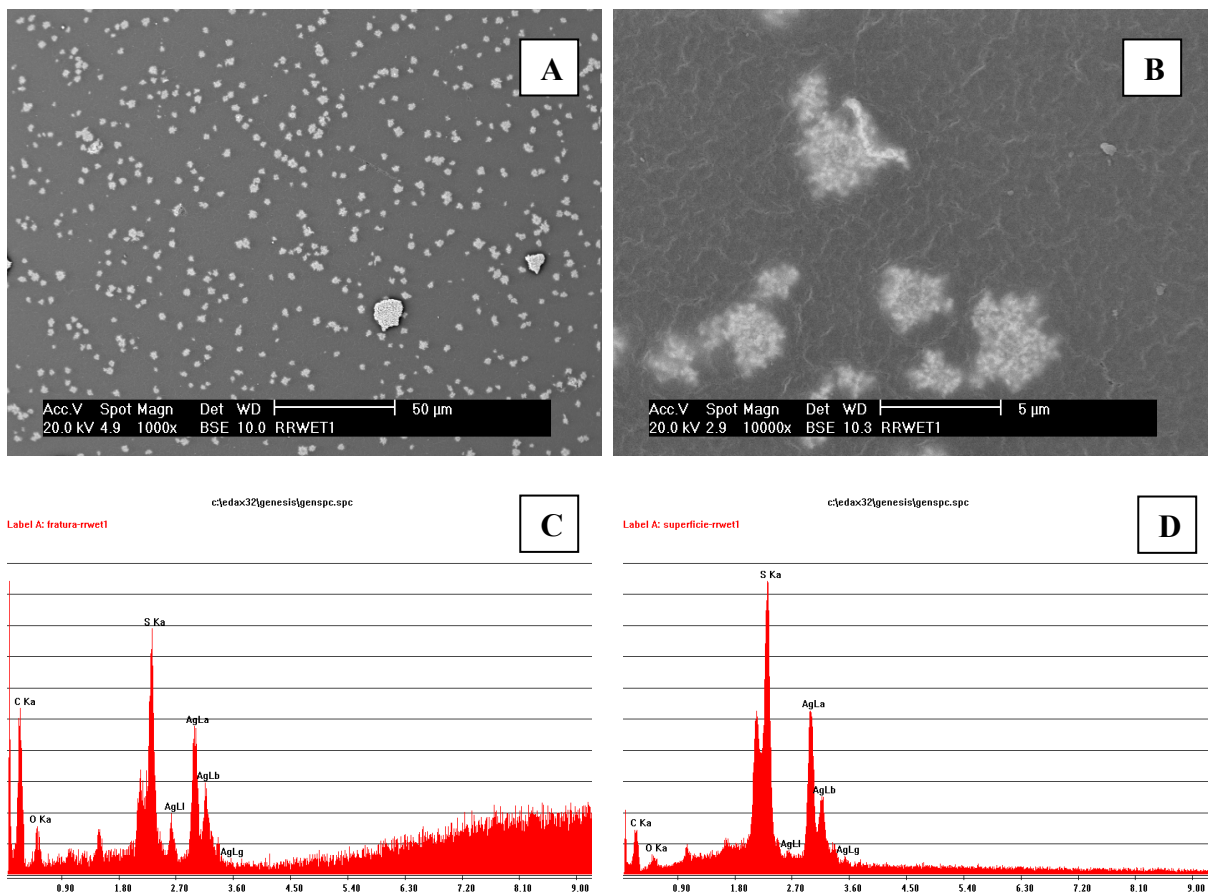


Figura 19: MEV-EDX da amostra WET 1, respectivamente: A) MEV com magnitude 1000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero.

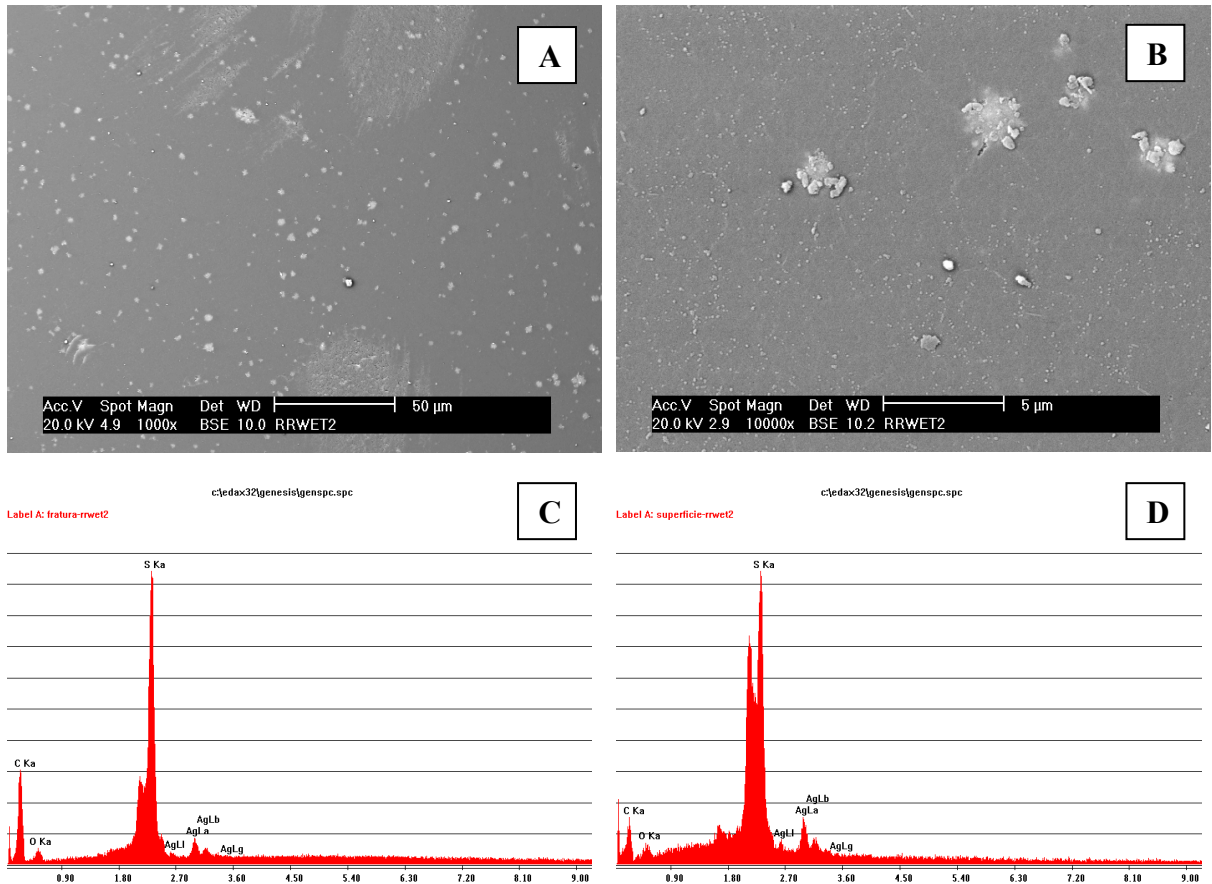


Figura 20: MEV-EDX da amostra WET 2, respectivamente: A) MEV com magnitude 1000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero.

Foi possível verificar pelas Figuras 19 e 20 que houve formação de partículas de prata bem distribuídas na matriz polimérica 15WET. Os picos de EDX confirmam a presença da prata no sistema. A distribuição das partículas formadas no compósito 15WET 1 foram mais homogêneas, porém a sua aglomeração ocorreu em maior extensão, gerando partículas maiores do que as formadas na 15WET 2. A redução do tamanho médio das partículas na 15WET 2 foi em torno de 80 % em relação as partículas encontradas na 15WET 1.

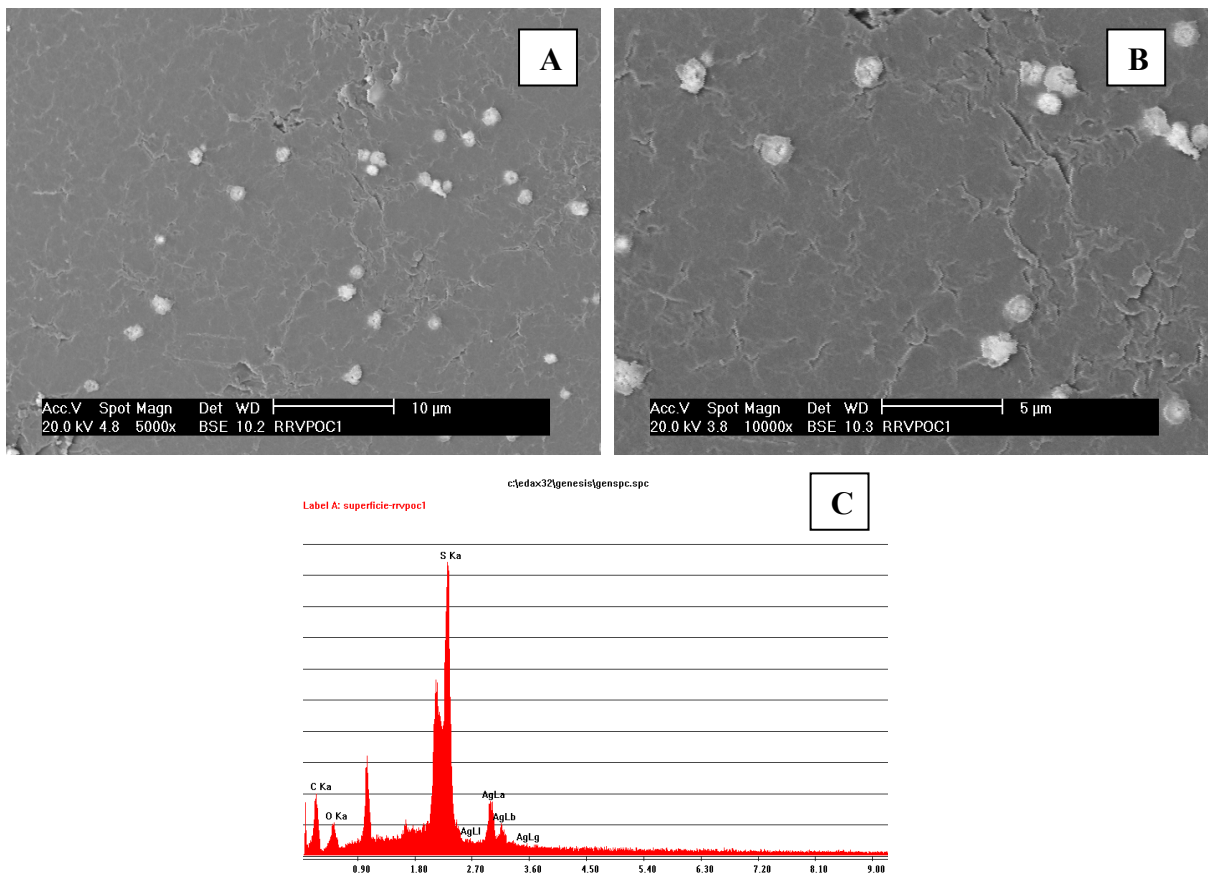


Figura 21: MEV-EDX da amostra VPOC 1, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da superfície do copolímero.

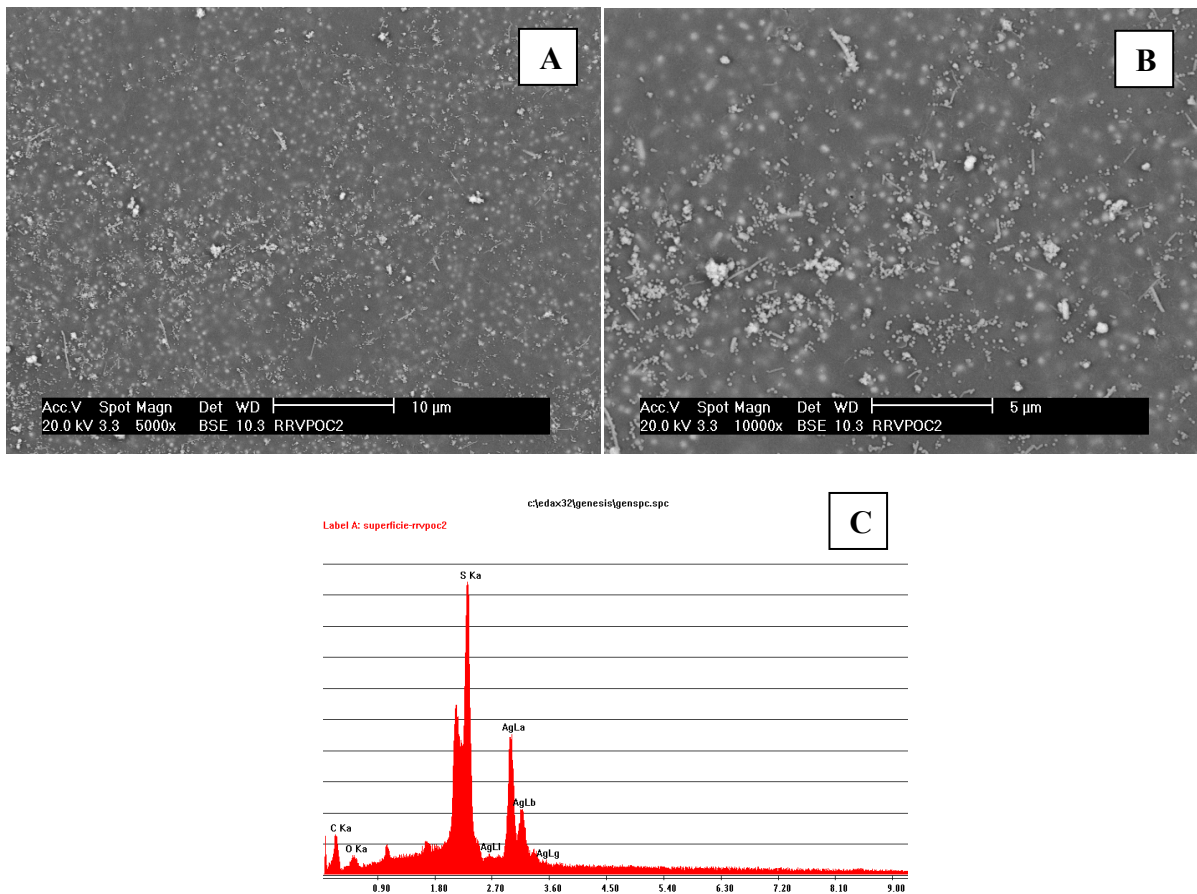


Figura 22: MEV-EDX da amostra VPOC 2, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da superfície do copolímero.

Nas Figuras 21 e 22, foi possível perceber que a formação de nanopartículas foi significativamente diferente nos compósitos VPOC 1 e VPOC 2. Por outro lado, na VPOC 1, houve formação de partículas grandes com distribuição aleatória. A VPOC 2 apresentou partículas em torno de 100 % menores do que as formadas na VPOC 1 e bem distribuídas na matriz polimérica. Não foi possível gerar gráficos de EDX do interior dos compósitos por se tratarem resinas do tipo gel.



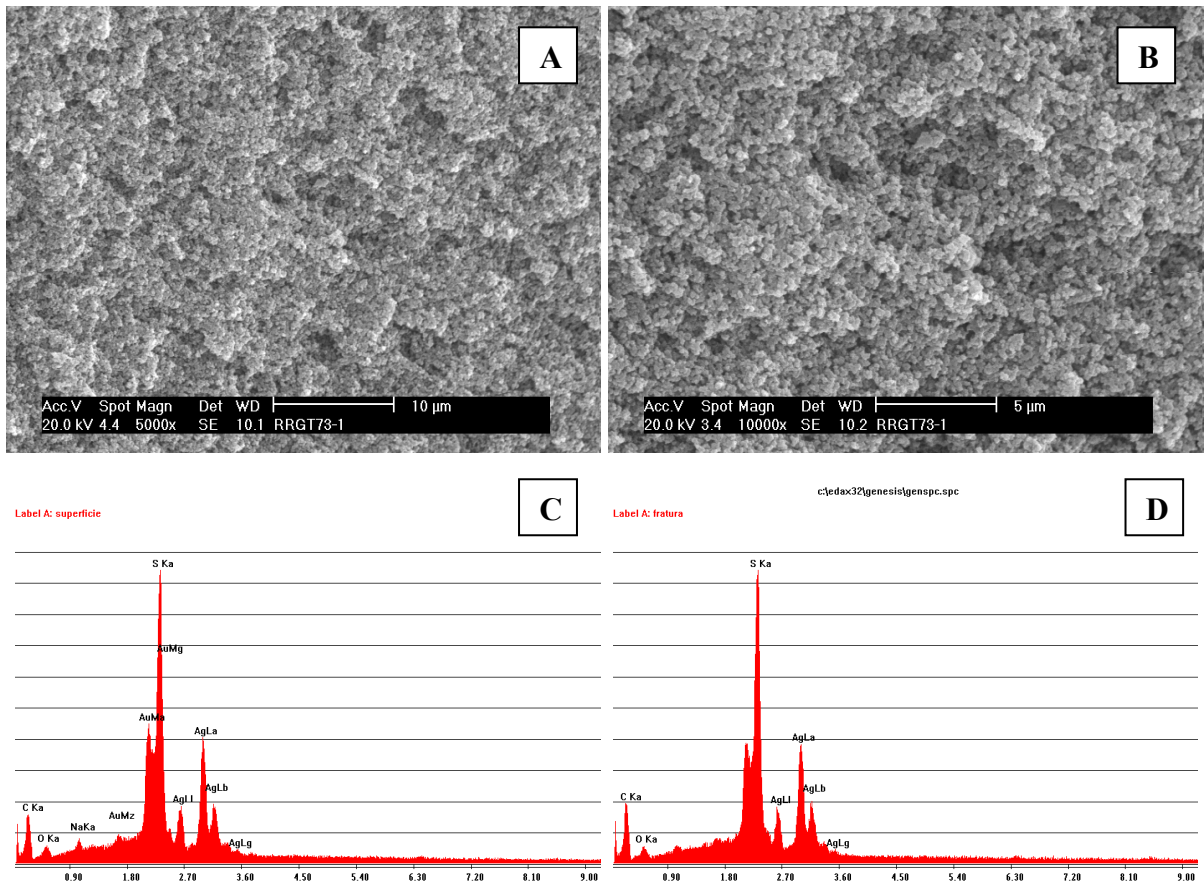


Figura 23: MEV-EDX da amostra GT73 1, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero.

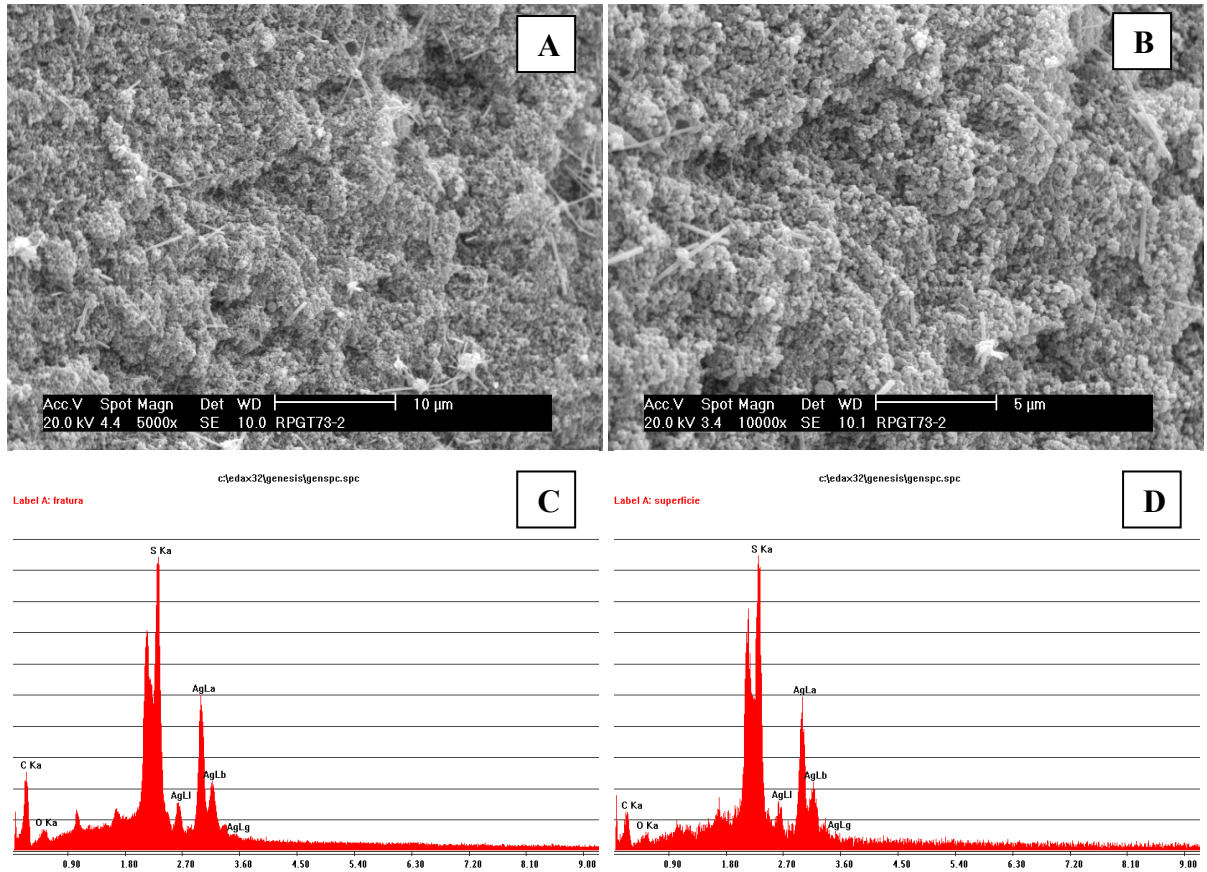


Figura 24: MEV-EDX da amostra GT73 2, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero.

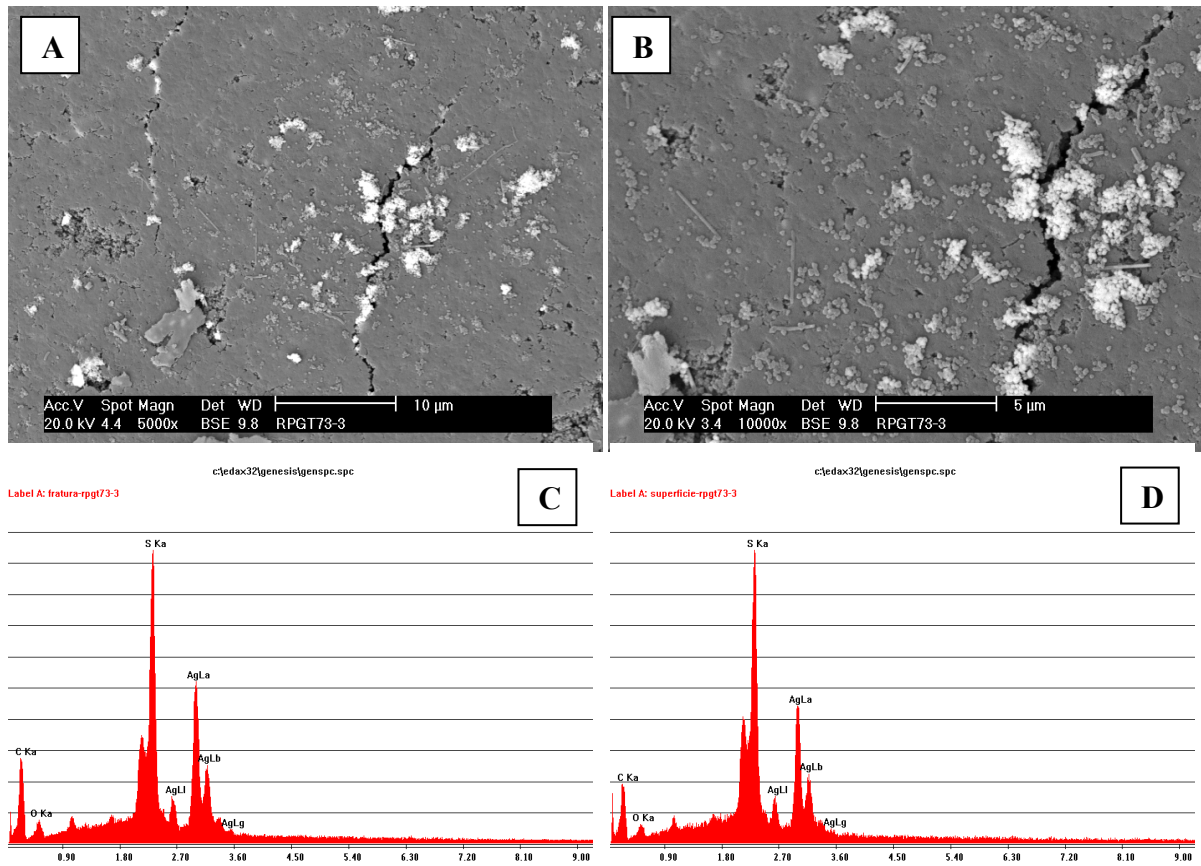


Figura 25: MEV-EDX da amostra GT73 3, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero.

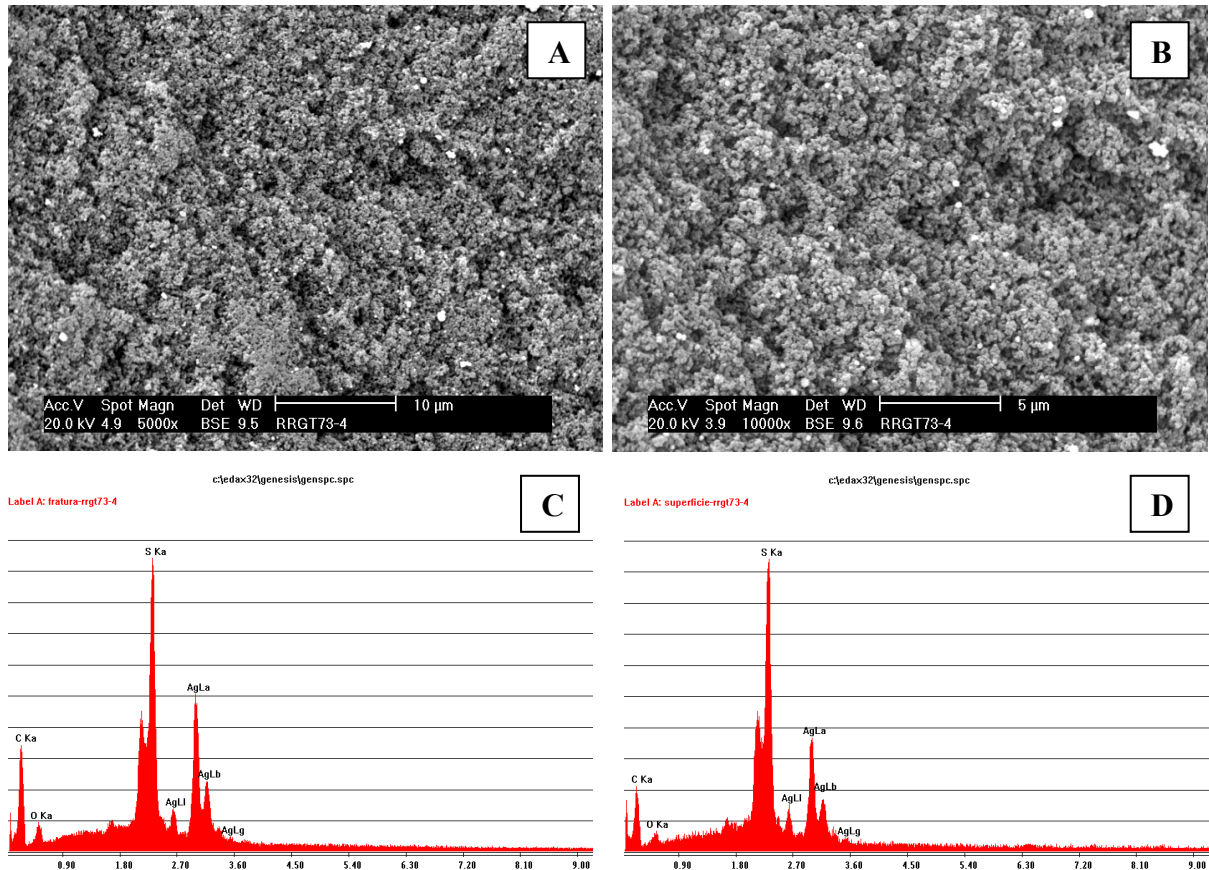


Figura 26: MEV-EDX da amostra GT73 4, respectivamente: A) MEV com magnitude 5000 X; B) MEV com magnitude 10000 X; C) EDX da parte interna do copolímero; D) EDX da superfície do copolímero.

As Figuras 23 a 26 mostram a formação de partículas nos 4 compósitos derivados da matriz GT 73 que foram confirmadas a partir dos gráficos de EDX. A micrografia do compósito GT73 1 não favoreceu a visualização das partículas de prata, não permitindo uma comparação da sua morfologia com as demais resinas. Foi possível observar que houve uma curiosa diferença que distinguiu a resina GT73 2 das demais: a formação cristalina não foi esférica sendo visível a presença de cristais pontiagudos em forma de agulhas, o que já foi reportado por Santa Maria e colaboradores (2007) em condições de síntese similares. O compósito GT73 3 apresentou partículas bastante aglutinadas de grandes dimensões e heterogeneamente distribuídas. Contudo, as partículas formadas na GT73 4 apresentaram tamanho em torno de 100 % menores em relação a GT73 3 com distribuição homogênea.

Em suma, as Figuras 19 a 26 mostram, além da morfologia e distribuição das partículas nos compósitos, os gráficos de EDX com picos característicos da presença da prata, confirmando que a impregnação foi efetiva em todos os compósitos. Não houve diferenças significativas entre as quantidades de prata encontrada na parte interna e na superfície dos copolímeros. O alcance dos íons  $\text{Ag}^+$  ao interior dos copolímeros foi facilitado pela sua porosidade e pela característica intrínseca aos três copolímeros de partida: sua capacidade em trocar íons.

A análise de MEV indica que houve uma grande diferença nas dimensões das partículas formadas variando de 50 a 2500 nm. Entretanto, é possível perceber que os compósitos que tiveram a adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  durante a síntese, obtiveram partículas de 80 a 100 % menores do que os compósitos que tiveram  $\text{NaOH}$  adicionados. Como o protetor de colóide utilizado durante a redução da prata foi o mesmo para todas as resinas, é possível relacionar este fato ao maior controle da síntese proporcionado pela geração do complexo  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$  pelo  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A formação do intermediário possibilitou que uma maior quantidade de partículas de prata fossem adsorvidas pelo protetor de colóide, evitando assim que houvesse agregação das partículas.

É possível que a concentração da solução de  $\text{AgNO}_3$  utilizada e o tempo em que as resinas ficaram em suspensão na etapa de impregnação dos íons  $\text{Ag}^+$  tenham colaborado para a aglomeração da prata promovendo uma saturação da resina de partida pela prata iônica que na etapa de redução formou prata metálica coalescendo na proximidade entre elas.

#### 4.2.4. Análise do formato das partículas

Os gráficos obtidos por DRX estão apresentados na Figura 27 e indicam através dos picos, alguns constituintes dos compósitos.

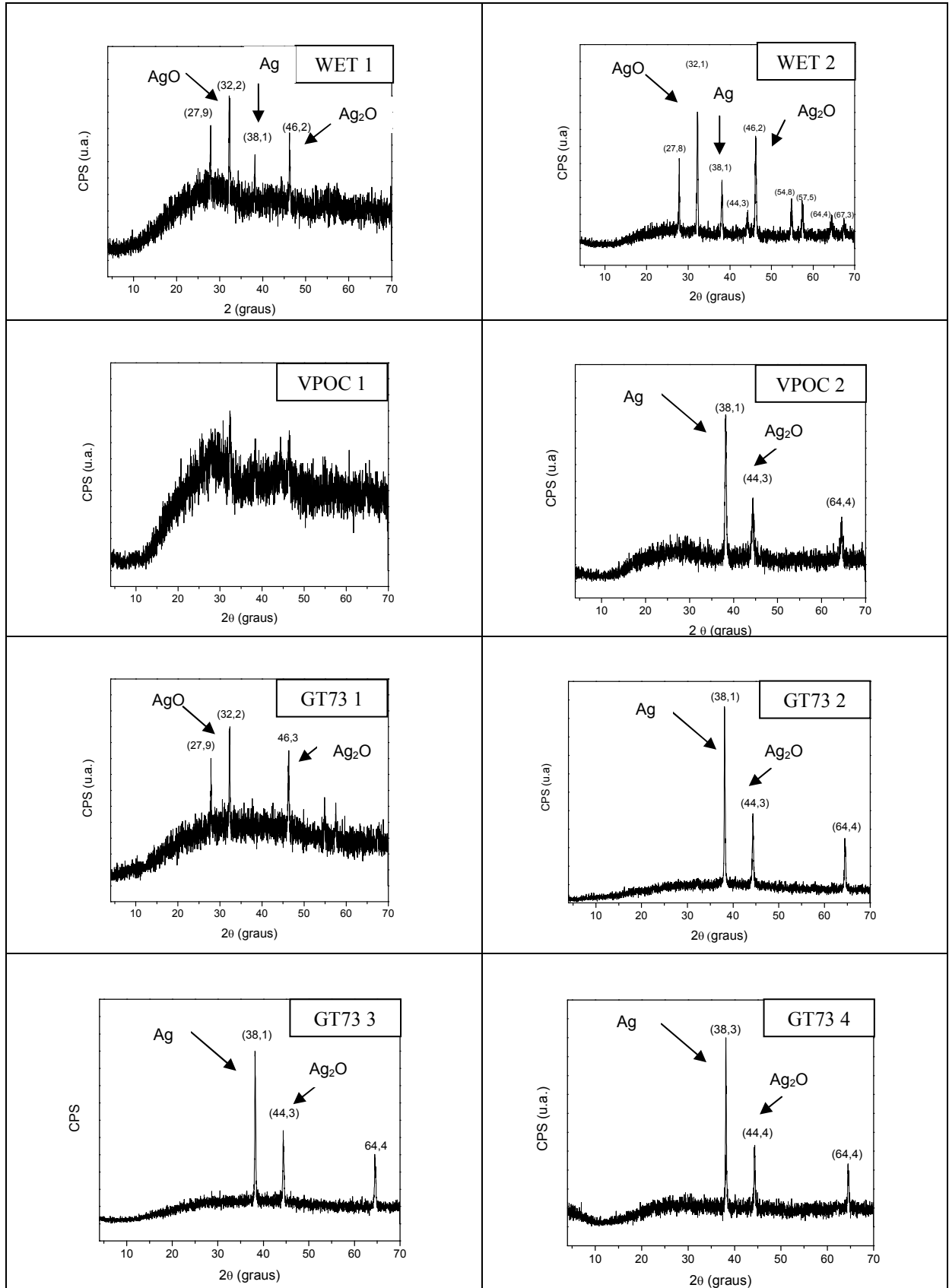


Figura 27: Gráficos de DRX dos compostos contendo prata.

Os picos de difração com 38,1; 44,3 e 64,4° que correspondem aos planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) indicam que a amostra pode ser relacionada à estrutura cristalina cúbica de face centrada da prata pertencente ao grupo espacial Fm3m (LIU *et al.*, 2005; LI, GU e ZHOU, 2009). A Tabela 6 exhibe os padrões de picos de DRX da prata e alguns óxidos.

Alguns autores afirmam que o formato o plano (1 1 1) é termodinamicamente mais estável quando em contato com determinadas moléculas, principalmente contendo grupos tiol, o que pode ter acontecido entre a matriz polimérica GT73, que contém grupo –SH e as nanopartículas de prata formadas já que os picos (1 1 1) podem ser encontrados em três dos quatro copolímeros provenientes deste suporte (Jiang *et al.*, 2007).

Os picos menos evidentes apresentados nos gráficos de DRX provavelmente pertencem a subprodutos da prata. Como é possível verificar com a ajuda dos gráficos, a prata não foi reduzida em sua totalidade, restando ainda óxidos de prata na superfície da matriz polimérica (Al-Kuhaili, 2007).

Os compósitos que tiveram a reação de redução conduzida na presença de NaOH apresentaram picos característicos da prata metálica pequenos ou ausentes, enquanto todos os compósitos obtidos na presença de NH<sub>4</sub>OH tiveram picos bem definidos característicos do plano (1 1 1).

Tabela 6: Padrão de picos de DRX da prata e seus óxidos.

Pico ( $2\theta$ )	Plano	Composto
26.67	(1 1 0)	Ag <sub>2</sub> O
32.01	(2 0 0)	AgO
32.28	(-1 1 1)	AgO
32.59	(-1 0 1)	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
32.79	(1 1 1)	Ag <sub>2</sub> O
33.66	(-1 3 0)	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
34.22	(0 0 3)	Ag <sub>2</sub> O
37.18	(1 1 1)	AgO
38.12	(1 1 1)	Ag
38.61	(1 0 1)	Ag <sub>2</sub> O
44.34	(2 0 0)	Ag <sub>2</sub> O
46.23	(0 0 4)	Ag <sub>2</sub> O
52.10	(1 1 3)	Ag <sub>2</sub> O
59.68	(2 1 0)	Ag <sub>2</sub> O

Fonte: JCPDS: Joint Committee on Powder Diffraction Standards

#### 4.2.5. Determinação da composição dos copolímeros

Dois métodos foram empregados para quantificar o teor de prata contida nos compósitos. Primeiramente a titulometria foi empregada, porém esta metodologia foi exaustiva, pois a digestão das resinas ocorreu muito lentamente. Além disso, os resultados obtidos pareceram não estar em conformidade com o esperado ao compará-los com outros estudos envolvendo este método (Souza, 2007).

Com o objetivo de obter uma quantificação mais acurada do teor de prata, a análise por EDX foi procedida e os resultados de ambas as análises encontram-se na Tabela 7.



Tabela 7: Teor de prata obtido por titulometria e EDFRX dos compósitos sintetizados

COMPÓSITO	TEOR DE PRATA %	
	EDFRX	TITULOMETRIA*
WET 1	44.95	9,48
WET 2	23.10	3,77
VP 1	7.90	2,20
VP 2	9.63	5,34
GT 1	20.91	15,32
GT 2	29.65	22,44
GT 3	38.12	25,02
GT 4	14.51	11,30

\* erro = 0,2 %

Os dois métodos apresentaram diferenças consideráveis ao se compararem os teores de prata de uma mesma resina. É provável que este erro possa ter acontecido no momento da digestão da prata. A concentração de ácido nítrico em solução P.A. é em torno de 65 % e com isso, pode não ter havido a digestão completa da prata ancorada nos compósitos. Sendo assim, a transferência dos íons  $\text{Ag}^+$  para a solução foi prejudicada. A maior diferença entre os resultados encontrados por EDFRX e titulometria das resinas fortemente trocadoras de íons corrobora com esta possibilidade já que neste caso pode ter havido uma intensa estabilidade entre as resinas e os íons prata, devido ao grupo sulfônico contido nestes copolímeros. A resina que contém grupo tiol apresentou resultados mais compatíveis entre os teores de prata encontrados por titulometria e EDFRX, o que pode ser explicado pela afinidade que as resinas de troca iônica fracamente ácidas possuem pelo íon  $\text{H}^+$  sendo facilmente regeneradas por ácidos fortes (ALEXANDRATOS, 2009).

Além do teor de prata, os copolímeros foram analisados por CHNS com o objetivo de comparar a composição química antes e depois da troca iônica. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Análise elementar das resinas antes e depois da impregnação com prata

RESINA	N (%)	C (%)	S (%)	H (%)
15WET	0,43	44,55	13,02	6,34
WET 1	0,78	37,46	11,52	4,50
WET 2	4,64	36,48	11,51	4,66
VPOC	0,52	40,45	10,97	5,10
VP 1	0,92	39,30	13,36	4,51
VP 2	4,25	35,37	12,06	5,73
GT73	1,03	51,92	19,30	5,62
GT 1	0,80	40,07	16,48	3,51
GT 2	1,22	38,36	13,99	3,40
GT 3	1,18	38,14	13,90	3,48
GT 4	2,73	40,07	14,78	3,90

Erro = 0,5 %

Os resultados mostram que houve uma leve tendência à diminuição da quantidade dos elementos C, S e H em relação aos copolímeros comerciais, porém a diferença está dentro da margem de erro do método. Todavia, o N apresentou aumento significativo, principalmente ao comparar os compósitos sintetizados na presença de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , o que fortalece a hipótese da formação do complexo com a amônia. A permanência de N no compósito indica que pode haver  $\text{Ag}^+$  não reduzido, permanecendo a prata inserida na matriz polimérica ainda na forma complexada.

#### 4.2.6. Expansão das resinas em água

As pérolas dos copolímeros de partida foram avaliadas quanto ao seu comportamento de expansão através do cálculo do grau de inchamento. A aplicação destes polímeros se dá em suspensões bacterianas em meio aquoso, sendo assim o GI foi determinado em água destilada e deionizada. A intenção foi comparar estes resultados com os obtidos pela análise de porosidade (ASAP). A Tabela 9 apresenta os resultados do grau de inchamento em água.

Tabela 9: Grau de inchamento das resinas comerciais.

Resina	GI (%)
15WET	34 %
VPOC	66,75%
GT73	0,67%

Os resultados da análise de GI foram importantes, pois revelaram que as resinas em questão possuem capacidades de inchar em água bem diferentes entre si. O resultado obtido para o inchamento da resina VPOC já era esperado por se tratar de uma resina do tipo gel. Resinas do tipo gel normalmente são levemente reticuladas, contendo teores de DVB em torno de 0,5-8 % e dependem de um bom solvente, capaz de inchar o polímero, permitindo o acesso à rede polimérica interna. No estado inchado, estas resinas são macias e compressíveis. As resinas macroporosas, em geral, possuem alto grau de reticulação contendo teores de DVB que podem chegar a 80 % e possuem uma rede complexa de poros permanentes e por isso não necessitam de bons solventes para se alcançar seu sistema de poros. Estas resinas apresentam maior rigidez, mesmo em contato com solvente. Apesar das resinas GT73 e 15WET serem ambas macrorreticuladas, elas apresentaram diferentes graus de inchamento o que provavelmente ocorre pelo grau de reticulação destas resinas. Sabendo-se que o DVB é o agente reticulante e que o grau de reticulação da resina é inversamente proporcional ao grau de inchamento, é possível prever que a porcentagem de DVB na resina GT73 é maior do que na resina 15WET e que por sua vez é maior do que na resina VPOC (HOWDLE, 2000; TEIXEIRA, COUTINHO e GOMES, 2001).

#### 4.2.7. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica dos copolímeros foi realizada em atmosfera de nitrogênio antes e depois da impregnação com prata. O Anexo 1 mostra os gráficos gerados por TGA e DTG. A Tabela 10 apresenta as características térmicas dos copolímeros sintetizados antes e depois da adição da prata.

Tabela 10 – Características térmicas dos copolímeros

COPOLÍMERO	T <sub>onset</sub> <sup>a</sup> (°C)	TEOR DE RESÍDUO (%)
15WET	257	31,3
WET 1	310	46,2
WET 2	325	40,2
VPOC	463	57,1
VP 1	343	49,5
VP 2	344	39,2
GT73	332	45,5
GT 1	276	54,5
GT 2	397	59,4
GT 3	391	57,8
GT 4	384	50,5

a) Temperatura inicial de degradação

Os copolímeros derivados das resinas 15WET e GT73 apresentaram uma tendência ao aumento da temperatura de degradação evidenciando o aumento da resistência térmica do material pela impregnação da prata na matriz polimérica. O teor de resíduo destes compósitos também aumentou, sendo este mais um indício da presença de prata nestes materiais (SANTOS, 2009). No entanto, as resinas derivadas do copolímero VPOC mostraram características opostas. Mesmo com a adição de prata houve um decréscimo na temperatura de degradação destes copolímeros o que indica que a presença de prata pode ter catalisado a termodecomposição da resina, diminuindo o teor de resíduo gerado como resultado da menor produção de coque durante a decomposição térmica. Essa propriedade catalítica observada em algumas nanopartículas metálicas é reportada em estudos envolvendo nanotubos de carbono (PUMERA, 2007). Purcar e colaboradores (2009) verificaram a influência das nanopartículas de prata na catálise de estireno e concluíram que partículas menores geralmente são responsáveis por altas atividades catalíticas. Dessa forma, quanto menor o tamanho da nanopartícula maior é a tendência delas promoverem uma catálise.

A formação de múltiplos picos no gráfico de TGA sugere que estes sejam provenientes de íons Ag<sup>+</sup> não reduzidos, explicando assim a presença de um

número maior de produtos como AgO e Ag<sub>2</sub>O oriundos da reação incompleta de redução da prata (PURCAR *et al.*, 2009).

### 4.3. Escolha da cepa e meios de cultura

Inicialmente, o objetivo era utilizar a metodologia empregada para ensaios bactericidas em estudos anteriores (VALLE, 2009; SANTOS, 2009) onde a cepa utilizada para os ensaios bactericidas era a *Escherichia coli* OHd5-k-12, pertencente ao estoque do Laboratório de Tecnologia de Processos Bioquímicos da UERJ. Porém, foi observado que o crescimento bacteriano estava prejudicado gerando número de UFC abaixo do intervalo de 25 a 250 unidades formadoras de colônias, faixa recomendada para o método de contagem em placas (SUTTON, 2006).

Sendo assim, uma nova cepa de *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup>25922<sup>™</sup>) foi doada pelo Laboratório de análises clínicas LAGO LAB e foram realizados testes com ambas as estirpes de *Escherichia coli* para que fosse descartada a possibilidade de contaminação da cepa a ser utilizada nos ensaios de atividade biocida da prata, prejudicando assim a confiabilidade dos resultados.

Os testes foram baseados no princípio de que a bactéria *Escherichia coli* é um coliforme fecal, pertencente ao grupo coliforme. Segundo Silva (2001), o grupo coliforme inclui bactérias na forma de bastonetes gram-negativos variando de 0.3-1.0 a 1.0-6.0 µm, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e capazes de fermentar a lactose com produção de gás dentro de 24 a 48 h de incubação à temperatura de 32-37 °C.

O grupo coliforme fecal compreende população predominantemente constituída por *Escherichia coli*, e a característica principal que distingue os coliformes fecais dos coliformes totais é a sua capacidade de fermentar a lactose com produção de gás em 24h a 44,5-45,5 °C (SILVA, 2001).

Os princípios bioquímicos que norteiam a sequencia de testes realizados são descritos a seguir:

- Teste Presuntivo

Meio de crescimento: Caldo Lauril Sulfato Triptose - LST

Princípio Bioquímico: O meio contém lactose como fonte de carbono que é rapidamente fermentada pelas bactérias do grupo coliforme. Este processo é evidenciado pela formação de gás no tubo de Durhan. O lauril sulfato ainda apresenta ação seletiva, inibindo o crescimento de microorganismos indesejáveis.

- Teste Confirmativo para Coliformes Totais

Meio de crescimento: Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2 %

Princípio Bioquímico: O meio contém bile e verde brilhante que são inibidores de microflora acompanhante, principalmente de bactérias gram-positivas. O caldo ainda contém lactose como fonte de carbono, permitindo a sua fermentação com produção de gás.

- Teste Confirmativo para Coliformes Fecais

Meio de crescimento: Caldo EC

Princípio Bioquímico: O caldo contém sais biliares que inibem o crescimento de bactérias gram-positivas e de microbiota não adaptada ao ambiente intestinal. A lactose favorece a fermentação e formação de gás pelos coliformes. Apesar da composição do caldo favorecer os coliformes totais, apenas os fecais sobrevivem a temperaturas maiores que 44,5 °C.

- Teste Indicativo de *E.Coli*

Meio de cultura: Agar Eosin Methylene Blue (EMB) Levine

Princípio Bioquímico: EMB Levine é um meio de cultura diferencial e seletivo para plaqueamento que permite detectar e isolar coliformes. A eosina e o azul de metileno não favorecem o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas fastidiosas e ainda, permitem diferenciar as bactérias fermentadores e não fermentadoras de lactose. Fermentadores fortes como a *E.Coli* produzem colônias pretas com brilho verde metálico, fermentadores fracos produzem colônias roxas e não fermentadores de lactose produzem colônias transparentes.

Os resultados dos testes são demonstrados na Figura 28.

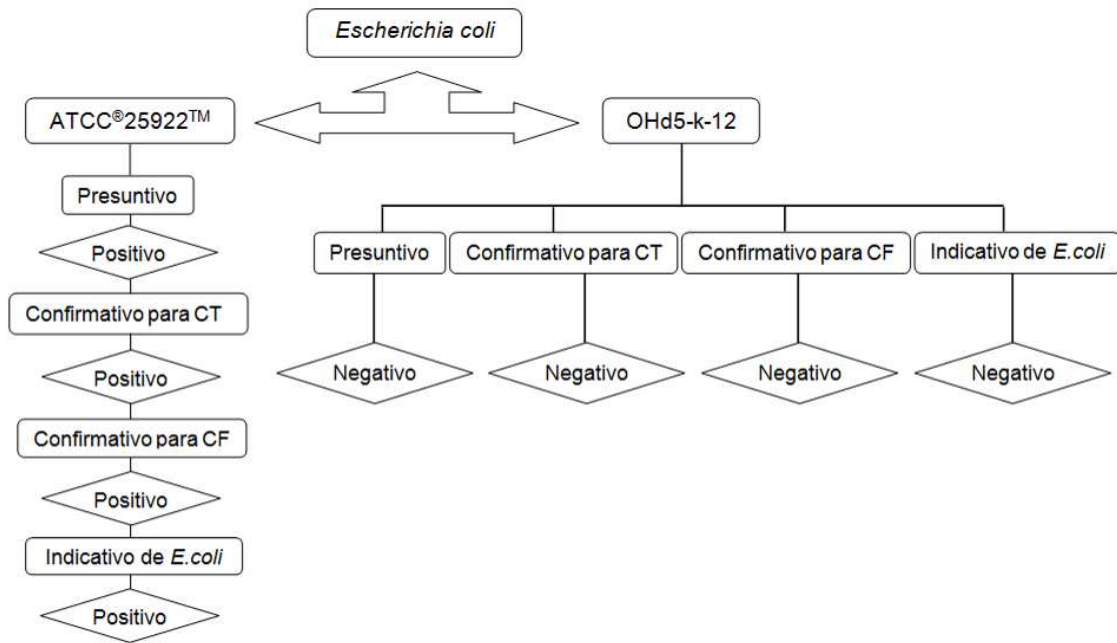


Figura 28: Esquema de resultados para confirmação da pureza das cepas.

Após os resultados dos ensaios foi possível concluir que a cepa OHd5-k-12 se tratava de bactéria não fermentadora de lactose, pois não houve produção de gás em nenhum dos testes e houve crescimento de colônias transparentes no teste indicativo de *E. coli*.

A Figura 29 mostra as duas estirpes de *E. coli* após incubação em Caldo Lauril Sulfato Triptose. A formação de bolhas no interior do tubo de Durham pela cepa ATCC®25922™ pode ser verificada.

A Figura 30 demonstra o crescimento bacteriano após plaqueamento em agar EMB Levine.

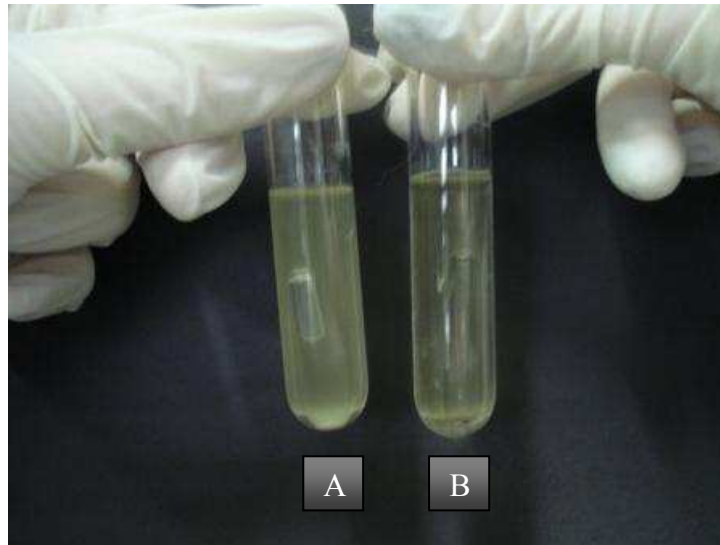


Figura 29: Formação de bolhas e turbidez acentuada pela ATCC<sup>®</sup>25922<sup>™</sup> (A), turbidez leve e não formação de bolhas pela OHd5-k-12 (B).

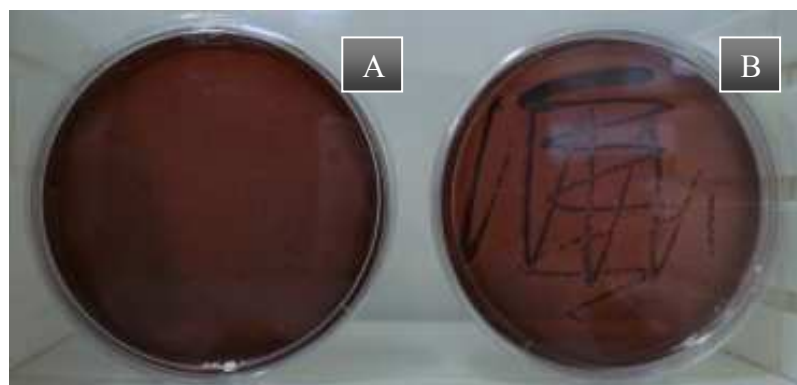


Figura 30: Formação de colônias transparentes pela OHd5-k-12 (A), formação de colônias pretas com brilho metálico pela ATCC<sup>®</sup>25922<sup>™</sup> (B).

Uma das hipóteses é uma possível contaminação da cepa por uma bactéria não fermentadora de lactose que se perpetuou através de repiques sucessivos e se sobrepôs à espécie bacteriana original. No entanto, a hipótese mais provável é que tenha havido uma mutação nos genes LAC da *Escherichia coli* OHd5-k-12 que passou de LAC<sup>+</sup> (fermentadora de lactose) a LAC<sup>-</sup> (não fermentadora de lactose). Este tipo de mutação pode ocorrer espontaneamente ou por indução física ou química (COOK e LEDERBERG, 1962; ATWOOD, SCHNEIDER e RYAN, 1951).

A cepa ATCC<sup>®</sup>25922<sup>™</sup> apresentou resultados positivos para todos os testes, demonstrando características de bactérias do tipo *E.coli*. Sendo assim, esta



linhagem foi escolhida para ser empregada na avaliação da atividade biocida dos compósitos contendo prata.

O ensaio para a escolha do meio de cultura a ser utilizado foi realizado a fim de se escolher um meio para enriquecimento e crescimento bacteriano que desfavoreça uma possível contaminação da cepa original de *Escherichia coli* e sua consequente perpetuação, assim como favorecer o crescimento, a detecção direta e a contagem de colônias. Os resultados de crescimento bacteriano foram analisados qualitativamente já que foram baseados na formação de bolhas no interior do tubo de Durham e na turbidez da solução bacteriana. Através da análise visual do crescimento bacteriano foi possível perceber que todos os meios empregados no teste foram eficazes e proporcionaram um crescimento bacteriano favorável, porém os parâmetros de turbidez e formação de bolhas permitiram que a extensão do crescimento bacteriano fosse resumida da seguinte forma: Caldo Lauril Sulfato Triptose > Caldo Lactose > Caldo Verde Brilhante Lactose Bile

Sendo assim, o caldo lauril sulfato triptose foi escolhido para o emprego nos testes biocidas já que além de ter apresentado crescimento bacteriano em maior extensão do que os demais meios testados, ele contém o lauril sulfato de sódio que inibe o crescimento de flora acompanhante e a lactose que estimula o crescimento da *E.Coli*.

Não foram necessários testes para a escolha do meio sólido para plaqueamento. O meio EMB Levine foi utilizado, pois apresentou resultados satisfatórios no Teste Indicativo de *E. coli*, além de facilitar a visualização em caso de contaminação ou mutações durante o período de manejo da cepa.

#### **4.4. Avaliação da atividade biocida**

As resinas comerciais e as respectivas resinas derivadas contendo prata foram submetidas à neutralização dos seus grupos ácidos para que os resultados bacteriológicos não tivessem interferência do pH. Para se avaliar em que extensão o pH influencia na atividade biocida, as resinas comerciais foram avaliadas também sem a neutralização dos seus grupos ácidos. Todas as resinas de partida, neutralizadas ou não, tiveram o seu pH medido em água destilada e deionizada conforme mostra a Tabela 11.

Sendo assim, três grupos de resinas foram avaliados quanto a sua atividade bactericida contra *Escherichia coli* ATCC®25922™: Resinas de partida, resinas de partida neutralizadas e compósitos contendo nanopartículas de prata.

A avaliação da atividade biocida foi realizada através do ensaio de eluição em coluna contendo pérolas de resina por onde foi percolada uma suspensão de concentração conhecida de *E.coli*. Foi mantido um fluxo médio de 21 gotas de percolado por minuto para que fosse garantida uma suficiente interação entre a solução bacteriana e as pérolas. Após o tempo de incubação das placas, foi realizada a contagem das células viáveis. Além da porcentagem de atividade bactericida para cada concentração de bactérias, as Tabelas 12 a 14 também mostram o potencial bactericida médio das resinas, calculado a partir da média aritmética de todas as concentrações e o resultado do ensaio de estabilidade dos copolímeros.

Tabela 11: pH das soluções contendo as resinas de partida antes e depois da neutralização.

Resinas	pH após 2 min	pH após 16 h
15WET	3	3
15WET neutralizada	5	5
GT73	3	3
GT73 neutralizada	5	5
VPOC	5	5
VPOC neutralizada	5	5

pH da água destilada e deionizada adicionada às resinas = 5

Não houve diferença no pH encontrado em 2 minutos e após 16 horas. O pH das soluções contendo as resinas macroreticuladas 15WET e GT73 foi aumentado após a neutralização de seus grupos ácidos. Apesar da resina VPOC, assim como a 15WET, ser fortemente ácida, pois contém grupos sulfônicos, seu pH foi igual ao da água mesmo antes do tratamento com bicarbonato de sódio. Este fato pode ser atribuído ao seu cátion trocador  $\text{Na}^+$ , diferentemente das demais resinas que possuem  $\text{H}^+$ . Todas as resinas neutralizadas apresentaram pH = 5, condição ideal para que o ensaio bactericida fosse realizado.

Tabela 12: Ação bactericida dos copolímeros de partida não neutralizados.

[ <i>E. coli</i> ] <sup>a</sup> (cél/ mL)	Atividade bactericida <sup>b</sup> (%)		
	15WET	VPOC	GT73
10 <sup>3</sup>	100	0	100
10 <sup>4</sup>	100	14	100
10 <sup>5</sup>	100	0	90
10 <sup>6</sup>	100	0	2
10 <sup>7</sup>	100	0	10
Média	100	2,8	60,4
Teste Estabilidade <sup>c</sup> Redução (%)	100	0	94

Desvio padrão relativo = 5 % UFC; Ação bactericida significativa > 14 %; a) concentração da suspensão de *E. coli*; b) média de triplicatas; c) concentração inicial da suspensão de *E. coli* = 2x10<sup>3</sup> células/mL.

Os resultados encontrados para a atividade bactericida das resinas de partida corroboram as medições de pH, pois somente as resinas que contém H<sup>+</sup> como íon trocador apresentaram atividade biocida considerável, indicando que o pH do meio foi responsável pela eficiência antimicrobiana.

Tabela 13: Ação bactericida dos copolímeros de partida neutralizados.

[ <i>E. coli</i> ] <sup>a</sup> (cél/ mL)	Atividade bactericida <sup>b</sup> (%)		
	15WET	VPOC	GT73
10 <sup>3</sup>	0	0	0
10 <sup>4</sup>	0	0	0
10 <sup>5</sup>	0	0	0
10 <sup>6</sup>	0	0	0
10 <sup>7</sup>	0	0	0
Média	0	0	0
Teste Estabilidade <sup>c</sup> Redução (%)	0	0	0

Desvio padrão relativo = 5 % UFC; Ação bactericida significativa > 14 %; a) concentração da suspensão de *E. coli*; b) média de triplicatas; c) concentração inicial da suspensão de *E. coli* = 2x10<sup>3</sup> células/mL.

Os copolímeros de partida não apresentaram atividade bactericida após a neutralização de seus grupos ácidos o que sugere que toda a atividade bactericida verificada pelo baixo pH do meio foi anulada.

Tabela 14: Ação bactericida dos compósitos contendo nanopartículas de prata neutralizados contra suspensão de *E.coli*.

[ <i>E.coli</i> ] <sup>a</sup> (cél/ mL)	Atividade bactericida <sup>b</sup> (%)							
	15WET1	15WET2	VPOC1	VPOC2	GT731	GT732	GT733	GT734
10 <sup>3</sup>	100	100	100	100	96	100	100	100
10 <sup>4</sup>	100	100	100	100	12	100	100	100
10 <sup>5</sup>	100	100	38	100	19	100	84	100
10 <sup>6</sup>	99	100	17	100	26	100	62	99
10 <sup>7</sup>	55	64	16	100	0	98	0	32
Média	90,8	92,8	54,2	100	30,6	99,6	69,2	86,2
Teste Estabilidade <sup>c</sup> Redução (%)	6	0	5	52	1	12	17	1

Desvio padrão relativo = 5 % UFC; Ação bactericida significativa > 14 %; a) concentração da suspensão de *E.coli*; b) média de triplicatas; c) concentração inicial da suspensão de *E.coli* = 2x10<sup>3</sup> células/mL.

O tratamento de todas as resinas contendo nanopartículas de prata com bicarbonato de sódio confirma que os resultados da atividade biocida das resinas modificadas se deve apenas a interação da prata com a bactéria, sem a interferência do pH do meio.

As atividades bactericidas de todos os compósitos contendo prata foram significativas indicando que a prata foi eficaz como agente antimicrobiano. De uma forma geral, a atividade biocida decai conforme a concentração de bactérias aumenta. Fato que se deve a saturação do copolímero, já que não há troca de coluna para uma mesma resina. Isto significa que após a eluição da concentração 10<sup>7</sup> células/mL de *E.coli*, mais de 10<sup>15</sup> células passam pela coluna e podem formar um biofilme ao redor das pérolas que prejudica a interação da prata com novas bactérias.

As resinas que tiveram o pH da reação controlados por  $\text{NH}_4\text{OH}$  durante a sua síntese apresentaram ação bactericida mais eficiente em relação às que tiveram a reação controlada por  $\text{NaOH}$ , pois como demonstrado anteriormente, o  $\text{NH}_4\text{OH}$  proporcionou partículas de prata substancialmente menores. Contudo, o copolímero GT73 2 foi uma exceção, já que sua atividade biocida foi maior do que a GT73 4. Provavelmente este comportamento se deve ao formato dos cristais de prata formados em forma de agulha. Apesar das partículas formadas em GT73 2 não terem dimensões tão diminutas como as formadas em GT73 4, o formato agulha pode ser aerodinamicamente mais destrutível à membrana bacteriana e conseqüentemente mais penetrável na célula. Partícula com diferentes aerodinâmicas são representadas na Figura 31.



Figura 31: Representação do contato entre partículas de diferentes formatos com a *E. coli*: esféricas e cilíndricas (A); formato agulha (B).

O alto teor de prata metálica e pouca quantidade de subprodutos constatados pelo DRX tiveram grande influência no efeito biocida, já que os compósitos que geraram picos bem definidos na região característica de  $\text{Ag}^0$  apresentaram maiores atividades biocidas.

Dentre todos os compósitos obtidos, o VPOC 2, derivado de resina sulfônica tipo gel e reação controlada por  $\text{NH}_4\text{OH}$  ofereceu a maior eficácia contra *E. coli*. Este resultado pode ser explicado pelo alto teor de prata metálica comparado aos demais óxidos presentes no copolímero e pela alta superfície de contato das partículas de prata já que esta resina foi a que ofereceu partículas de menores dimensões. O fato da resina de partida ser do tipo gel poder ter contribuído para a formação de partículas menores, pois o tamanho de poro reduzido em relação às resinas macroporosas colaboram servindo de *templates* e evitando assim, a coalescência das partículas. Ainda assim, o tamanho dos poros não foi decisivo para a geração de partículas pequenas já que a VPOC 1 apresentou partículas em torno de 100 % maiores. A aglomeração de prata neste caso deve a autocatálise favorecida pelo

NaOH na superfície da resina, dificultando a entrada de partículas em seus poros internos. A Figura 32 evidencia a aglomeração de prata na superfície do copolímero VPOC 1.

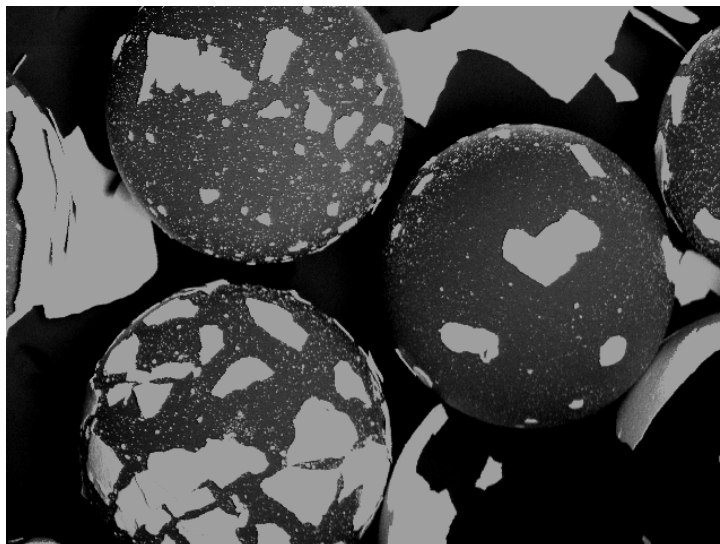


Figura 32: MEV do copolímero VPOC 1 com aumento de 120 X.

Apesar do VPOC 2 apresentar a melhor atividade biocida, este foi o compósito menos estável. A combinação de formação de partículas de dimensões mínimas com resina tipo gel levou a um copolímero cuja maleabilidade no estado inchado favoreceu a dispersão de algumas partículas que se encontravam nos poros da resina. Sendo assim, quando houve a eluição da solução de *E.coli* pela coluna, a resina inchou, abrindo portas de saída para as partículas.

As amostras com altos teores de prata contidos em sua estrutura não apresentaram melhor atividade bactericida. Pelo contrário, a tendência foi de haver maior ação biocida nos copolímeros que apresentaram menores teores de prata.

## 5. CONCLUSÕES

- Os parâmetros empregados para a modificação dos polímeros comerciais foram eficientes para a impregnação da prata.
- A utilização do  $\text{NH}_4\text{OH}$  durante a reação de redução levou à produção de partículas de 80 a 100 % menores e com melhor distribuição no suporte polimérico do que a reação que teve  $\text{NaOH}$  adicionado.
- Os compósitos obtidos pela reação conduzida na presença de  $\text{NaOH}$  apresentaram maiores quantidades de subprodutos da prata não reduzida do que aqueles que tiveram a adição do  $\text{NH}_4\text{OH}$ .
- As nanopartículas de prata obtidas na matriz VPOC apresentaram comportamento catalítico na termodecomposição do compósito em relação à resina comercial.
- Todos os compósitos contendo prata obtiveram ação bactericida significativa.
- A ação bactericida pôde ser atribuída somente à prata, pois a neutralização dos grupos ácidos dos copolímeros eliminou a possibilidade da ação biocida ter interferência do pH.
- A capacidade biocida foi proporcional ao tamanho das partículas de prata e sua distribuição no suporte polimérico.
- O teor de prata total contido nos copolímeros não influenciou a atividade biocida, porém a presença de prata metálica foi decisiva para a sua eficácia.

## 6. SUGESTÕES

- Estabelecer uma metodologia para a regeneração e verificar a vida útil dos copolímeros.
- Realizar os ensaios microbiológicos com bactérias variadas, inclusive gram-positivas.
- Realizar microscopia eletrônica de transmissão das bactérias antes e depois da eluição para estudo da interação entre a bactéria e a prata.
- Estudar o DNA bacteriano a fim de identificar possíveis mutações ocasionadas pela prata.
- Verificar metodologias que favoreçam a formação da prata em forma de agulha e comparar a capacidade biocida desta com partículas esféricas e cilíndricas.
- Realizar os ensaios biocidas em grande escala com colunas de tamanhos industriais e águas de rejeito hospitalar.



## 7. REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M.; KRUSE, H.; TAST, E.; HAMMERUM, A.M; JENSEN, L.B. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway. **Microbial Drug Resistance**, n. 6, p. 63–70, 2000.
- AHMAD, Z.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K.. Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. **Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences**, v. 48, p. 171-176, 2005.
- ALANIS, A.J. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 697–705, 2005.
- ALBUSCHIES, J.; BAUS, M.; WINKLER, O.; HADAM, B.; SPANGENBERG, B.; KURZ, H. High-density silicon nanowire growth from self-assembled Au nanoparticles. **Microelectronic Engineering**, v. 83, p.1530–1533, 2006.
- ALEXANDRATOS, S.D. Ion-exchange resins: a retrospective. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 388–398, 2009.
- AL-KUHAILI, M. F. Characterization of thin films produced by the thermal evaporation of silver oxide. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 40, p. 2847-2853, 2007.
- ALYA HEALTH. Fibra inteligente com ação antimicrobiana. **M&G**, Ano XI, n. 37, 2005.
- ANTIPOV, A. A.; SUKHORUKOV, G.B.; FEDUTIK, Y. A.; HARTMANN, J.; GIERSIG, M.; MÖHWALD, H. Fabrication of a novel type of metallized colloids and hollow capsules. **Langmuir**, v.18, p.6687-6693, 2002.
- ATKINS, P; PAULA, J. **Físico-Química**, 7ª ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000.
- ATWOOD, K.C.; SCHNEIDER, L.K.; RYAN, F.J. Periodic selection in *Escherichia coli*. **Genetics: Atwood, Schneider and Ryan**, Department of Zoology, Columbia University, 1951.
- AYALA-NÚÑEZ, N.V.; VILLEGAS, H.L.; TURRENT, L.C.I.T.; PADILLA, C.R. Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter. **Journal of Nanobiotechnology**, p. 1551-1286, 2009.
- AZEVEDO M. G.; SKURY A. L. D.; BORGES C. P.; SENA M. E. R. Estudo da inserção de grupos iônicos em polímeros termorresistentes através de planejamento de experimentos. **SciELO Matéria (Rio de Janeiro)** v.11 n. 4, 2006.

BASTOS, M.G.A. Polímeros Termorresistentes Modificados com a inserção de Grupos Iônicos para o Preparo de Membranas Seletivas de Íons, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, RJ, Brasil, 2005.

BECKER, C.M.; FORTE, M.M.C.; AMICO, S.C.; VARGAS, J.V.C. Síntese e caracterização de precursores sulfonados para membranas poliméricas à base de polímeros estirênicos, 17º CBECIMat – Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2006.

BEIGUELMAN, B. A. **Curso Prático de Bioestatística**, 5ª Ed, Ribeirão preto: FUNPEC, 2002.

BENN, T.M.; WESTERHOFF, P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 11, p. 4133–4139, 2008.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química. Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BONIFÁCIO, L.S. Processos de agregação e fusão de nanopartículas de ouro: Uma abordagem química, Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2006.

BORSCHIVER, S.; ANTUNES A.; WONGTSCHOWKI, P. O impacto das resinas na economia: principais indicadores econômicos. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v.12, n.1, p. 28-33, 2002.

BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. **Waste Management**, 2009 (*in press*).

BUKREEVA, T. V.; PARAKHONSKIY, B. V.; MARCHENKO, I. V.; KHLEBTSOV, B. N.; KHLEBTSOV, N. G.; DEMENTIEVA, O. V.; SAVVATEEV, M. N., FEIGIN, L. A.; KOVALCHUK, M. V. Polyelectrolyte microcapsules with a shell containing silver and gold nanoparticles, based on calcium carbonate and polystyrene. **Nanotechnologies in Russia**, v. 3, n.1–2, p. 85–93, 2008.

CAI, W.; ZHANG, L.; ZHONG, H.; HE, G. Annealing of mesoporous silica loaded with silver nanoparticles within its pores from isothermal sorption. **Academia Sinica**, v.13, n.10, p. 2888-2895, 1998.

CALDERONI, S. **Os Bilhões Perdidos no Lixo**. 4ª ed. São Paulo: Humanitas, p. 223-248, 2003.

CHAIRAM, S.; POOLPERM, C.; SOMSOOK, E. Starch vermicelli template-assisted synthesis of size/shape-controlled nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v.75, p. 694–704, 2009.

CHAWLA, K. K. **Composite Materials Science and Engineering**, N. J. Grant (eds.), N.Y: Springer-Verlag, 1987.

CHEN, Z.; CHEN, X.; ZHENG, L.; GANG, T.; CUI, T.; ZHANG, K.; YANG, B. A simple and controlled method of preparing uniform Ag nanoparticles on Tollens-soaked silica spheres. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.285, p.146–151, 2005.

CHOI, O.; DENG, K.K.; KIM, N.; JR, L.R.; SURAMPALLI, R.Y.; HU, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions and silver chloride colloids on microbial growth. **Water Research**, v. 42, p. 3066 – 3074, 2008.

CHOU, K.S.; REN, C.Y. Synthesis of nanosized silver particles by chemical reduction method. **Materials Chemistry and Physics**, v.64, p.241–246, 2000.

CLM - COUNCIL OF LOGISTICS MANAGEMENT. Reuse and Recycling Reverse Logistics Opportunities. Illinois: **Council of Logistics Management**, 1993.

COOK, A.; LEDERBERG, J. Recombination studies of lactose nonfermentin mutants of Escherichia coli K-12. Reimpressão de **Genetics**, v. 47, n. 10, 1962.

COSTA, H.; DANIEL, L. Estudo do comportamento do ozônio na desinfecção de águas residuárias domiciliares. Relatório Final PROSAB Edital 3 – Tema 2 – Desinfecção de Efluentes Sanitários, remoção de patógenos e Substâncias Nocivas – Vitória, ES, Dezembro de 2002.

COURTNEY, T.H. Mechanical Behavior of Material. N.Y: McGraw-Hill Series on **Materials Science and Engineering**, 1990.

COUTINHO, F.M.B.; CUNHA, L.; GOMES, A.S. Suportes Poliméricos para catalisadores sulfônicos: síntese e caracterização. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n.1, 2004.

COUTO, G.G. Nanopartículas de níquel: síntese, caracterização, propriedades e estudo de sua utilização como catalisadores na obtenção de nanotubos de carbono. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Paraná, 2006.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C.D. **Introduction to magnetic materials**. 2<sup>a</sup> ed. Massachusets: Addison-Wesley, 1972.

CUMSTON, C.G. History of Medicine. The British Medical Journal, v. 1, n. 3512, p. 734-735, 1928.

DASGUPTA, M.K. Silver-coated catheters in peritoneal dialysis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 17, n. 2, p.142-145, 1997.

DAVIDHIZAR, R.; DUNN, C.L.; HART, A.N. A review of the literature on how important water is to the world's elderly population. **International Nursing Review**, v.51, 159-166, 2004.

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

DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; AVOURIS, P.; **Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications Topics in Applied Physics**, v. 80, New York: Springer-Verlag, 2001.:

DRESSELHAUS, M.S.; DRESSELHAUS, G.; EKLUND, P. C. **Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes**, N.Y: Academic Press, 1996.

DROR-EHRE, A.; MAMANE, H.; BELENKOVA, T.; MARKOVICH, G.; ADIN, A. Silver nanoparticle–E. coli colloidal interaction in water and effect on E. coli survival. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 339, p. 521-526, 2009.

DUCOM, G.; CABASSUD, C. Interests and Limitations of Nanofiltration for the Removal of Volatile Organic Compounds in Drinking Water Production. **Desalination**, v.124, p. 115-123, 1999.

DURAN, N.; MARCATO, P.D.; ALVES, O.L.; SILVA, J.P.S.; SOUZA, G.I.H.; RODRIGUES, F.A.; ESPOSITO, E. Ecosystem protection by effluent bioremediation: silver nanoparticles impregnation in a textile fabrics process. **Journal of Nanoparticle Research**, p. 1388-0764, 2009.

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

EBY, D.M.; SCHAEUBLIN, N.; FARRINGTON, K.; HUSSAIN, S.M.; JOHNSON, G.R. Hybrid Antimicrobial Enzyme and Silver Nanoparticle Coatings for Medical Instruments. **ACS Applied Materials & Interfaces** v. 1 (7), 1553–1560, 2009.

ELABD, Y. A.; NAPADENSKY, E. Sulfonation and characterization of poly(styrene-isobutylene-styrene) triblock copolymers at high ion-exchange capacities. **Polymer**, n. 45, p. 3037-3043, 2004.

ELECHIGUERRA, J.L.; BURT, J.L.; MORONES, J.R.; BRAGADO, A.C.; GAO, X.; LARA, H.H.; YACAMAN, M.J.; Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v.3, n.6, 2005.

ELLIS, W. R. Bakelite: Material of a Thousand Uses. **The Ohio State Engineer**, v.XVII, n.4, 1934.

ESCWA - Economic and Social Commission for Western Asia. Waste-Water Treatment Technologies: A General Review. Disponível em: <http://www.escwa.un.org/information/publications/edit/upload/sdpd-03-6.pdf> Acesso em: 20 dez. 2009.

ESPINOSA-CRISTÓBAL, L.F.; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G.A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, R.E.; LOYOLA-RODRÍGUEZ, J.P.; PATIÑO-MARÍN, N.; REYES-MACÍAS, J.F.; RUIZ, F. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. **Materials Letters**, v. 63, p. 2603–2606, 2009.

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

FENDLER, J.H.. Self-Assembled Nanostructures Materials. **Chemistry of Materials**, n.8, p. 1616-1624, 1996.

FENG, Q.L.; WU, J.; CHEN, G.Q.; CUI, F.Z.; KIM, T.N.; KIM, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, n. 4, p. 662-668, 2000.

FLORES, K.O.V.; AGUIAR, A.P.; AGUIAR, M.R.M.P.; SANTA MARIA, L.C. Microwave assisted Friedel–Crafts acylation reactions of Amberlite XAD-4™ resin. **Materials Letters**, v.61, p. 1190–1196, 2007.

FREIRE, R.S; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; ZAMORA, P. P. Novas Tendências para o Tratamento de Resíduos Industriais Contendo Espécies Organocloradas. **Química Nova**, v.24, p.504, 2000.

FRESTA, M.; PUGLISI, G.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; MICALI, N.; FURNERI, P.M. Pefloxacin mesilate and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Characterization of the colloidal drug carrier formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 7, p. 895-902, 1995.

FUENTEFRIA, D.B.; FERREIRA, A.E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p.470-473, 2008.

FUNG, M.C.; BOWEN, D.L. Silver products for medical indications: risk-benefit assessment. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, v. 34, n.1, p. 119-126, 1996.

GAO, J.; YOUN, S.; HOVSEPYAN, A., LLANEZA, V.L.; WANG, Y.; BITTON, G.; BONZONGO, J.C.J. Dispersion and toxicity of selected manufactured nanomaterials in natural river water samples: effects of water chemical composition. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 3322-3328.

GAPONENKO, S. V. Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

GIESELMAN, M.B.; REYNOLDS, J.R. Water – Soluble Polybenzimidazole – Based Polyelectrolytes, **Macromolecules**, v. 25, p. 4832–4834, 1992.

GODDARD, P.A.; BULL, A.T. Accumulation of silver by growing and non-growing populations of *Citrobacter intermedius* B6. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 3, 1989.

GONG, P.; LI, H.; HE, X.; WANG, K.; HU, J.; TAN, W.; ET, A.L. Preparation and antibacterial activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Ag nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, n. 28, 2007.

GONI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteraceae and *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, n.66, p. 125–132, 2000.

GU, H.; HO, P.L.; TONG, E.; WANG, L.; XU, B. Presenting Vancomycin on Nanoparticles to Enhance Antimicrobial Activities. **Nano Letters**, v.3, n.9, p. 1261–1263, 2003.

GUIMARÃES, M.A.; TIBANA, A.; NUNES, M.P.; SANTOS, K.R.N. Disinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in brazilian hospital bacterial isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31-3, 2000.

GUO, Y.G.; HU, J.S.; LIANG, H.P.; WAN, L.W.; BAI, C.L. Highly dispersed metal nanoparticles in porous anodic alumina films prepared by a breathing process of polyacrylamide hydrogel. **Chemistry of Materials**, v.15, p. 4332-4336, 2003.

GUPTA, P.; BAJPAI, M.; BAJPAI, S.K. Investigation of Antibacterial Properties of Silver Nanoparticle-loaded Poly (acrylamide-co-itaconic acid)-Grafted Cotton Fabric. **The Journal of Cotton Science**; v.12, 280–286, 2008.

HANSEN, P.M.; BHATIA, V.K.; HARRIT, N.; ODDERSHEDE, L. Expanding the optical trapping range of gold nanoparticles, **Nano Letters**, v.5, n.10, p. 1937–1942, 2005.

HOWDLE, S.M.; JERABEK, K.; LEOCORBO, V.; MARR, P.C.; SHERRINGTON, D.C. Reversibly collapsible macroporous poly(styrene-divinylbenzene) resins. **Polymer**, v.41, p.7273–7277, 2000.

HU, J. Y.; WANG, Z. S.; NG, W. J.; ONG, S. L. Disinfection by-products in water produced by ozonation and chlorination, **Environmental monitoring and assessment**, v. 59-1, 81-93, 1999.

HUCK, C.W.; BONN, G.K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 51-72, 2000.

HUSSEINY, M.I.; AL-AZIZ, M.A.; BADR, Y.; MAHMOUD, M.A. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.67, n. 3-4, p. 1003–1006, 2007.

JIANG, X.; ZENG, Q.; YU, A. Thiol-Frozen Shape Evolution of Triangular Silver Nanoplates. **Langmuir**, v. 23, p. 2218-2223, 2007.

KAUFFMAN, C. A. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, iii23-iii30, 2003.

KENAWY, E.F.; WORLEY, S.D.; BROUGHTON, R. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review, **Biomacromolecules** v. 8-5 1359–1384, 2007.

KIM, K.J.; SUNG, W.S.; MOON, S.K.; CHOI, J.S.; KIM, J.G.; LEE, D.G. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1482-1484, 2008.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology**. 5<sup>a</sup> ed., N.Y: Lippincott, 1997.

KRISHNARAJ, C.; JAGAN, E.G.; RAJASEKAR, S.; SELVAKUMAR, P.; KALAICHELVAN, P.T.; MOHAN, N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2009 (*in press*).

L'VOV, B. V. The mechanism of solid-state decompositions in a retrospective. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, DOI 10.1007/s10973-009-0579-1, 2009.

LAUBUSCH, E. J., Water Quality and Treatment: A Handbook of Public Water Supplies. **American Water Works Association**, Nova York: McGraw-Hill Book Company, 1971.

LEE, G.J.; SHIN, S.I.; KIM, Y.C.; OH, S.G. **Materials Chemistry and Physics**, n.84, p. 197–204, 2004.

LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D.Y.; BRUNET, L.; LIGA, M.V.; LI, D.; ALVAREZ, P.J.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, p. 4591-4602, 2008.

LI, Z.; GU, A.; ZHOU, Q. Growth of spindle-shaped silver nanoparticles in SDS solutions. **Crystal Research and Technology**, v. 44, n. 8, p. 841-844, 2009.

LIN, C.W.Y.; ZAINAL, Z.; WILLIAMS, N.E.; ZHU, K.; KRUZIC, A.P.; SMITH, R.L.; RAJESHWAR, K. Bactericidal Activity of TiO<sub>2</sub> Photocatalyst in Aqueous Media: Toward a Solar-Assisted Water Disinfection System. **Environmental Science Technology**, V.28(5), 934-938, 1994.

LIU, M.; YAN, X.; LIU, H.; YU, W. An investigation of the interaction between polyvinylpyrrolidone and metal cations. **Reactive & Functional Polymers**, v.44, p.55-64, 2000.

LIUA, F. K.; HUANG, P.W.; CHANG, Y.C.; KOA, C.J.; KOA, F.H.; CHUC, T.C. Formation of silver nanorods by microwave heating in the presence of gold seeds. **Journal of Crystal Growth**, v. 273, p. 439–445, 2005.

LIUA, F. K.; HUANG, P.W.; CHANG, Y.C.; KOA, C.J.; KOA, F.H.; CHUC, T.C. Formation of silver nanorods by microwave heating in the presence of gold seeds. **Journal of Crystal Growth**, v. 273, p. 439–445, 2005.

LIVSHIN, S.; SILVERSTEIN, M.S.; Crystallinity and cross-linking in porous polymers synthesized from long side chain monomers through emulsion templating. **Macromolecules**, v.41, p.3930-3938, 2008.

LU, Y.C.; CHOU, K.S. A simple and effective route for the synthesis of nano-silver colloidal dispersions. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 39, p. 673–678, 2008.

MACIEL, A.P.; LEITE, E. R.; LUCENA, P. R.; LONGO, E.; FAJARDO, H. V.; VALENTINI, A.; PROBST, L. F. D.; CARREÑO, N. L. V. Processing Effects of Nanometric Rare Earth-Doped Tin Oxides on the Synthesis of Methyl Vinyl Ketone, **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 81, p. 211-217, 2004.

MANSOURI, S. S.; GHADER, S. Experimental study on effect of different parameters on size and shape of triangular silver nanoparticles prepared by a simple and rapid method in aqueous solution. **Arabian Journal of Chemistry**, v.2, p. 47– 53, 2009.

MARTIN, C.; CUELLAR, J. Synthesis of a novel magnetic resin and the study of equilibrium in cation exchange with amino acids. **Industrial Engineering Chemical Research**, n.2, v.43, p.475-485, 2004.

MARTINEZ, J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2893–2902, 2009.

MATIJEVIC, E. **Medical Applications of Colloids**. 1 ed. New York: Springer, 2008.

MATSUMOTO, A.; ISHIKAWA, T.; ODANI, T.; OIKAWA, H.; OKADA, S.; NAKANISHI, H. An organic/inorganic nanocomposite consisting of polyuconate and silver nanoparticles. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 207, n. 4, p. 361-369, 2006.

MERCK. **Microbiology Manual Cultura Media**. Dormstadt, Germany, 405 p., 1996.

MEYER, S. T. O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas, a Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde Pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, 99-110, 1994.

MIJATOVIC, D.; EIJKEL J. C. T.; BERG A. V. D. Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up - a review. **The Royal Society of Chemistry Journal**, v. 5, p. 492-500, 2005.



MILTNER, R.J.; SHUKAIRY, H.M.; SUMMERS, R.S. Disinfection By-product Formation and Control by Ozonation and Biotreatment, **Journal American Water Works Association**. V. 84, n.11, p. 53-62, 1992.

MOCIOI, M.; ALBU, A.M.; MATEESCU, C.; VOICU, G.; RUSEN, E.; MARCULESCU, B.; MUTIHAC, L. New polymeric structures designed for the removal of Cu(II) ions from aqueous solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 103, n.3, p. 1397–1405, 2007.

MODAK, S.M.; FOX JR, C.L. Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 19, p. 2391-2404, 1973.

MOHANTY, A.K.; MISRA, M.; HINRICHSEN, G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 276, p. 1-24, 2000.

MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J.L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.B.; RAMIREZ, J.T.; YACAMAN, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005.

MUHLING, M.; BRADFORD, A.; READMAN, J.W.; SOMERFIELD, P.J.; HANDY, R.D. An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. **Marine Environmental Research**, v. 68, p. 278–283, 2009.

OLIVEIRA, P.C.; ALVES, G.M.; CASTRO, H.F. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 23, n.5, 2000.

PAL, S.; TAK, Y.K.; SONG, J.M. Does antibacterial activity of silver 1 nanoparticle depend on shape of nanoparticle? A study on Gram-negative *E. coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712-1720, 2007.

PANACEK, A.; KOLAR, M.; VECCEROVA, R.; PRUCEK, R.; SOUKUPOVA, J.; KRYSTOF, V.; HAMAL, P.; ZBORIL, R.; KVITEK, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials**, v.30, p.6333–6340, 2009.

PANACEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECCEROVA, R.; PIZUROVA, N.; SHARMA, V.K.; NEVECNA, T.; ZBORIL, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **Journal of Physical Chemistry**, v. 110, p. 16248–16253, 2006.

PAUWELS, B.; VERSTRAETE, W. The treatment of hospital wastewater: an appraisal. **Journal of Water and Health**, v. 4, p. 405–416, 2006.

POOLE, C. P. Jr.; OWENS, F. J. **Introduction to nanotechnology**, N.Y.: Willey Interscience, 2003.

POZZA, G.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

PUMERA, M. Carbon nanotubes contain residual metal catalyst nanoparticles even after washing with nitric acid at elevated temperature because these metal nanoparticles are sheathed by several graphene sheets. **Langmuir**, v. 23, p. 6453-6458, 2007.

PURCAR, V.; DONESCU, D.; PETCU, C.; LUQUE, R.; MACQUARRIE, D.J. Efficient preparation of silver nanoparticles supported on hybrid films and their activity in the oxidation of styrene under microwave irradiation. **Applied Catalysis A: General**, v.363, p. 122–128, 2009.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v.27, n. 1, p. 76-83, 2009.

REITZ, J. R.; MILFORD, F. J.; CHRISTY, R. W. **Fundamentos da Teoria Eletromagnética**, Rio de Janeiro: Campus, 1991.

RETKHIMAN-SCHABES, P.S; CANIZAL, G.; BECERRA-HERRERA, R.; ZORRILLA, C.; LIU, H.B.; ASCENCIO, J.A. Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles. **Optical Materials**, v. 29, n.1, p. 96-99, 2006.

RIPPEL, M.M.; GALEMBECK, F. Nanostructures and Adhesion in Natural Rubber: New Era for a Classic. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n.6, p.1024-1030, 2009.

ROHLF, J.W. **Modern Physics from  $\alpha$  to  $Z^0$** . N.Y.: John Wiley & Sons, 1994.

RUPARELIA, J.P.; CHATTERJEE, A.K.; DUTTAGUPTA, S.P.; MUKHERJI, S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 707-716, 2008.

RUSSELL, A.D.; HUGO, W.B. Antimicrobial activity and action of silver. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 351–370, 1994.

SAMBHY, V.; MACBRIDE, M.M.; PETERSON, B.R.; SEN, A. Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, n.30, p.9798–808, 2006.

SAMPATH, L.A.; CHOWDHURY, N.; CARAOS, L.; MODAK, S.M. Infection resistance of surface modified catheters with either shortlived or prolonged activity. **The Journal of Hospital Infection**, v. 30, p. 201-210, 1995.

SANTA MARIA, L.C. ; COSTA, M. A. S.; SCARES, J. G. M.; WANG, S. H.; SILVA, M. R. Preparation and characterization of manganese, nickel and cobalt ferrites submicron particles in sulfonated crosslinked networks. **Polymer**, v.46, p. 1188 – 1293, 2005.

SANTA MARIA, L.C.; AGUIAR, M.R.M.P.; COSTA, M.A.S.; VALLE, A.S.S.; SOARES, J.G.M.; SOUZA, J. D.C.; WANG, S.H.; Synthesis of composite based on submicron sized silver particles hosted on microspheres of surface-functional porous crosslinked copolymer networks. **Materials Letters**, v.61 p. 2993–2999, 2007.

SANTA MARIA, L.C; COSTA, M. A. S.; SANTOS, F. A. M.; WANG, S. H.; SILVA, M. R. Preparation and characterization of polymer metal composite microspheres. **Material Letters**, v. 60, p. 270 – 273, 2006.

SANTOS, A.C. Síntese, caracterização e avaliação de materiais poliméricos com propriedades bactericidas. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2009.

SARATHY, K. V.; KULKARNI, G. U.; RAO, C. N. R. A novel method of preparing thiol-derivatised nanoparticles of gold, platinum and silver forming superstructures. **Chemical Communications**, p. 537-538, 1997.

SASTRY, M.; AHMAD, A.; ISLAM, K.M.; KUMAR, R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete **Current Science**, v. 85, p.162–170, 2003.

SCHULZE, D. **Flow Properties of Powders and Bulk Solids**, University of Applied Sciences, Braunschweig/Wolfenbuttel, Germany, p.01, 2006.

SHAHVERDI, A.; FAKHIMI, A.; SHAHVERDI, H.; MINAIAN, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 168-171, 2007.

SHARMA, N.C.; SAHI, S.V.; NATH, S.; PARSONS, J.G.; TORRESDEY, J.G.; PAL, T. Synthesis of Plant-Mediated Gold Nanoparticles and Catalytic Role of Biomatrix-Embedded Nanomaterials. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 14, p. 5137–5142, 2007.

SHUTT, W.; HAFELI, U.; TELLER, J.; ZBOROWSKI, M. **Scientific and clinical applications of magnetic carriers**: an overview, p. 171, N.Y.: Plenum, 1997.

SIDDIQUI, M.S.; AMY G.L.; MURPHY, B.D. Ozone enhanced removal of natural organic matter from drinking water sources. **Water Research**, v. 31, n. 12, p. 3098-1997.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2ª Ed. São Paulo : Varela, 2001.

SMITHA, B.; SRIDHAR, S.; KHAN, A.A. Solid Polymer electrolyte membranes for fuel cell applications – a review, **Journal of Membrane Science**, n. 295, p. 10-26, 2005.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n.1, p.177-82, 2004.

SOUZA, M.A.; PESSAN, L.A.; JR, A.R. **Polímeros: Ciência e Tecnologia Nanocompósitos de poli(cloreto de vinila) (PVC) / argilas organofílicas**, v. 16-4, 2006.

STOIMENOV, P.K.; KLINGER, R.L.; MARCHIN, G.L.; KLABUNDE, K.J.; Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. **Langmuir**, v.18, n.17, p. 6679–6686, 2002.

SU, H.L.; CHOU, C.; HUNG, D.; LIN, S.; PAO, I.; LIN, J.H.; HUANG, F.; DONG, R.; LIN, J.J. The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. **Biomaterials**, v.30, p. 5979–5987, 2009.

SUTTON, S. A Conversation with FDA about "Counting Colonies". **Pharmaceutical Microbiology Forum**, v. 12, n. 10, 2006.

TAVARES, N.F. Síntese de nanopartículas de ferrita de manganês em matriz de copolímero estireno – divinilbenzeno sulfonado. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.

TEIXEIRA, V.G., COUTINHO, F.M.B., GOMES, A.S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, 2001.

TIMMS, S.; COLQUHOUN, Q.O.; FRICKER C.R. Detection of *Escherichia coli* in potable water using indirect impedance technology. **Journal of Microbiological Methods**, v.26, 125-132, 1996.

TREVORS, J.T. Silver resistance and accumulation in bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 331–333, 1987.

TYRRELL, S.; RIPPEY, S.R.; WATKINS, W.D. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. **Water Research**, v. 29, n. 11, p. 2483-2490, 1995.

VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**, 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1976.

WATSON, P.E.; WATSON I.D.; BATT, R.D. Total body water volumes for adult males and females estimated from simple anthropometric measurements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 33, 27-39, 1980.

WATSON, R. T.; DIXON, J.A.; HAMBURG, S.P.; JANETOS, A.C.; MOSS, R.H. Protecting our Planet, Securing Our Future: Linkages among global environmental issues and human needs. **United Nations Environment Programme**, Washington: The World Bank /Nasa, 1998.

WESTBROOKS, R. Invasive plants: changing the landscape of America: fact book. **Federal Interagency Committee for the Management of Noxious and Exotics Weeds**, Washington D. C., 1998.

WOJCIECHOWSKI, S., New trends in the development of mechanical engineering materials. **Journal of Materials Processing Technology**, n. 106, p. 230-235, 2000.

XU, X.H.; BROWNLOW, W.J.; KYRIACOU, S.V.; WAN, Q.; VIOLA, J.J. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. **Biochemistry**, v. 43, p.10400–10413, 2004.

YIN, Y.; ALIVISATOS, A. P. Colloidal nanocrystal synthesis and the organic-inorganic interface. **Nature**, v.437, n. 7059, p.664-670, 2005.

YIN, Y.; LI, Z.Y.; ZHONG, Z.; GATES, B.; XIA, Y.; VENKATESWARAN, S. Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. **Journal of Materials Chemistry**, n.12, p. 522 – 527, 2002.

YOON, K.Y.;BYEON, J.H.; PARK, J; HWANG, J. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v.373, p. 572–575, 2007.

ZALLOUM, R.; MUBARAK, S. Chelation properties of poly(2-hydroxy-4-acryloyloxybenzophenone) resins toward some divalent metal ions. **Journal of Applied Polymer Science**, v.109, n.5, p. 3180-3184, 2008.

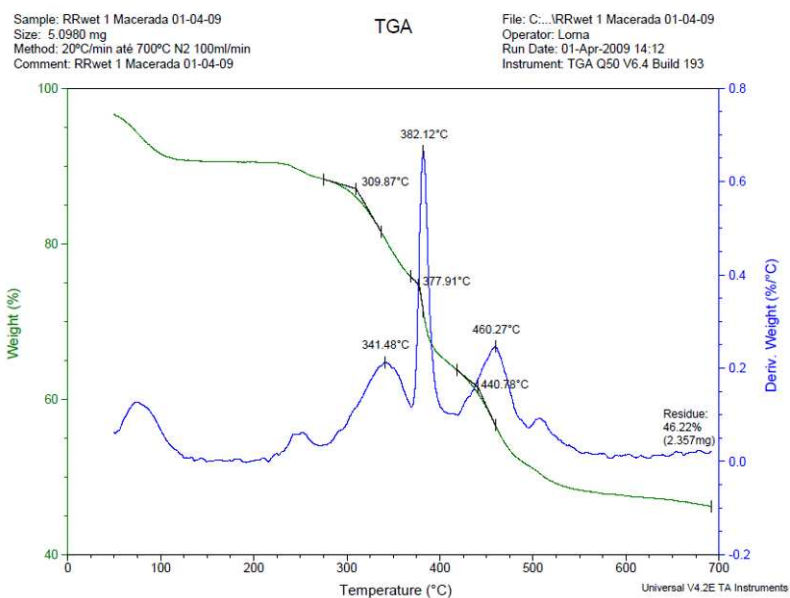
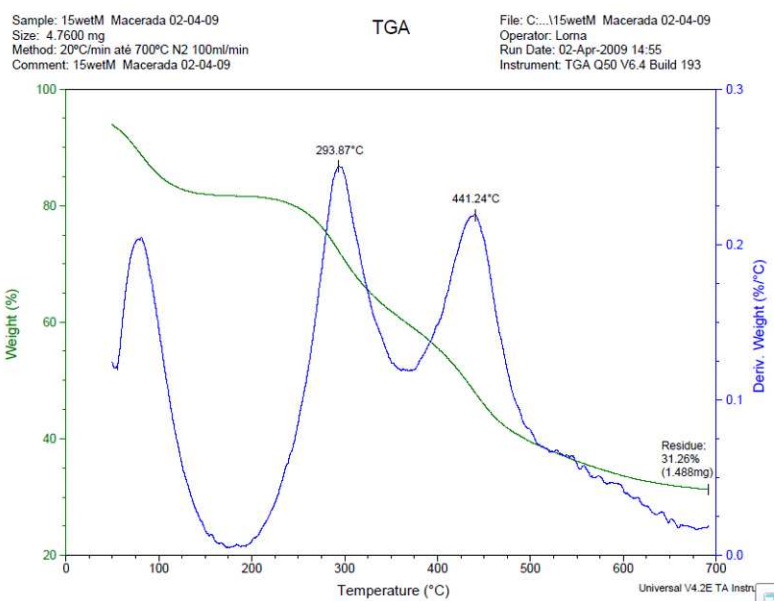
ZANCHET, D., MORENO, M. S., UGARTE, D. Anomalous packing in thin nanoparticle supercrystals, **Physical Review Letters**, v. 82, n. 26, 5277-5280, 1999.

ZARBIN, A. J. G. Novos nanocompósitos obtidos pelas interações, de compostos organometálicos e polímeros condutores com vidros porosos, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1997.

ZHANG, L.; YU, J.C.; YIP, H.Y.; LI, Q.; KWONG, K.W.; XU, A.W.; WONG, P.K. Ambient light reduction strategy to synthesize silver nanoparticles and silver-coated tio<sub>2</sub> with enhanced photocatalytic and bactericidal activities. **Langmuir**, v.19, p.10372-10380, 2003.

ZODROW, K.; BRUNET, L.; MAHENDRA, S.; LI, D.; ZHANG, A.; LI, Q.; ALVAREZ, P.J.J. Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. **Water Research**, n. 43, p.715-723, 2009.

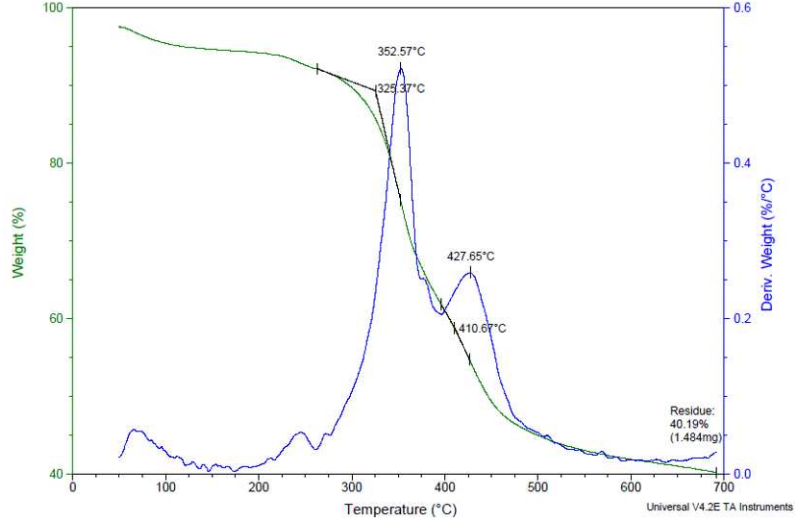
## ANEXO 1 – Curvas de TGA e DTG



Sample: RRWET 2 29-06-09  
Size: 3.6920 mg  
Method: 20°C/min até 700°C N2 100ml/min  
Comment: RRWET 2 29-06-09

TGA

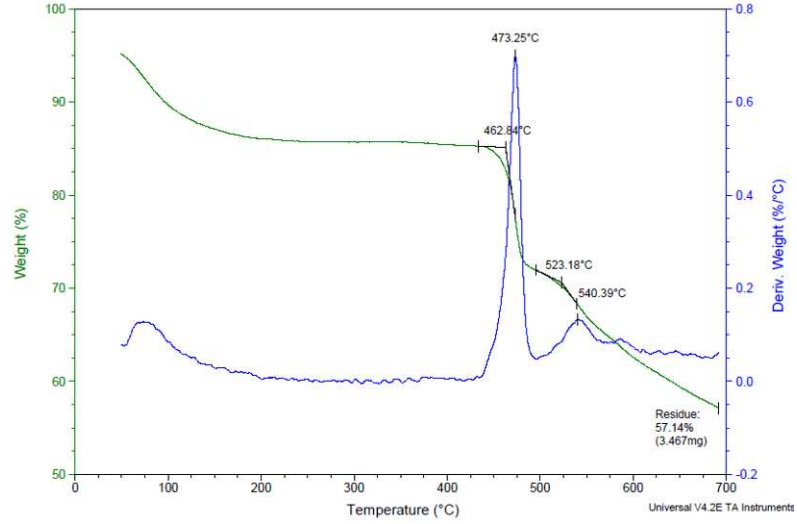
File: C:\Lorna\Luz C. S. MRRWET 2 29-06-09  
Operator: Lorna  
Run Date: 29-Jun-2009 15:12  
Instrument: TGA Q50 V6.4 Build 193

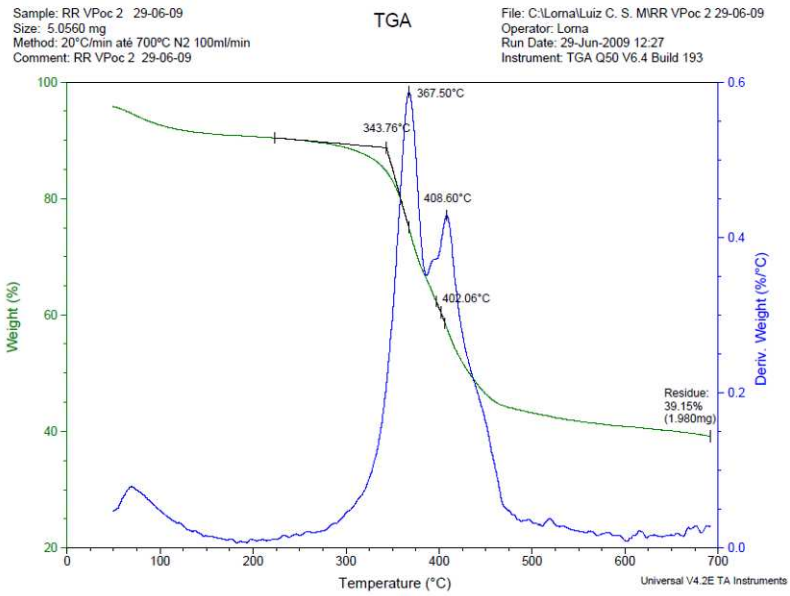
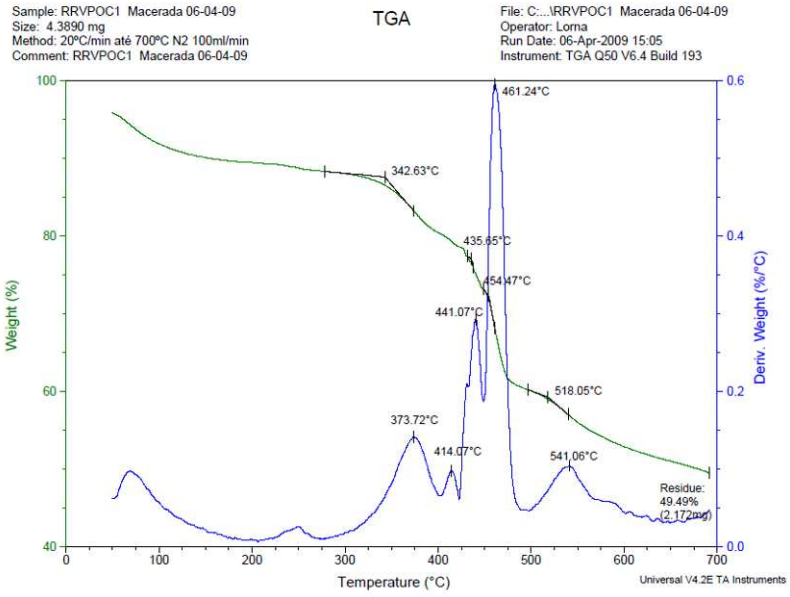


Sample: VFOCM Macerada 01-04-09  
Size: 6.0670 mg  
Method: 20°C/min até 700°C N2 100ml/min  
Comment: VFOCM Macerada 01-04-09

TGA

File: C:\VPOCM Macerada 01-04-09  
Operator: Lorna  
Run Date: 01-Apr-2009 12:36  
Instrument: TGA Q50 V6.4 Build 193



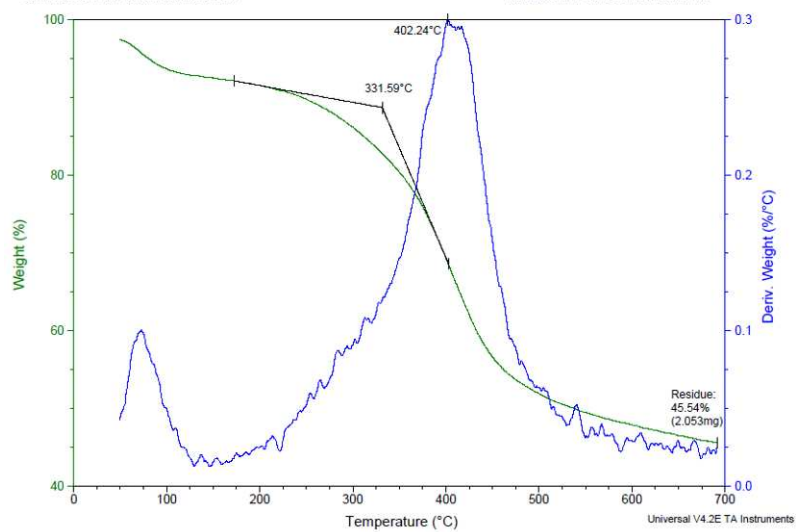




Sample: GT73M Macerada 06-04-09  
Size: 4.5070 mg  
Method: 20°C/min até 700°C N2 100ml/min  
Comment: GT73M Macerada 06-04-09

TGA

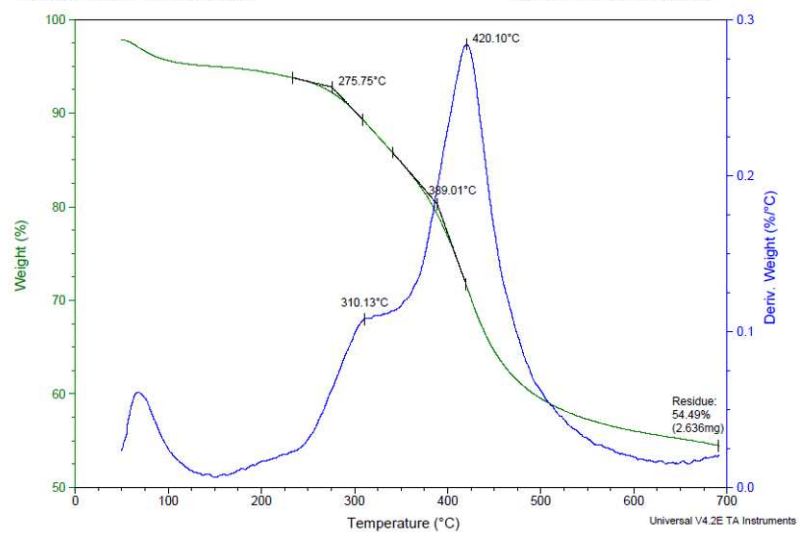
File: C:\...GT73M Macerada 06-04-09  
Operator: Loma  
Run Date: 06-Apr-2009 13:33  
Instrument: TGA Q50 V6.4 Build 193

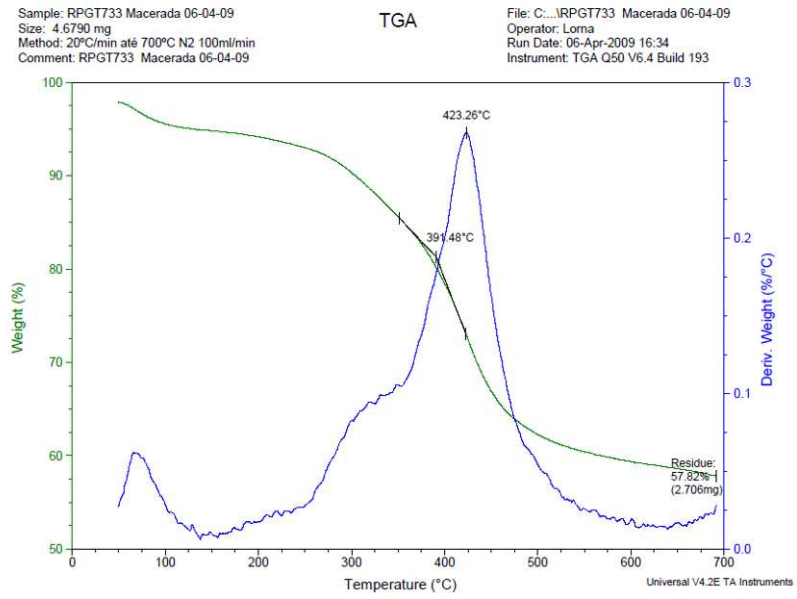
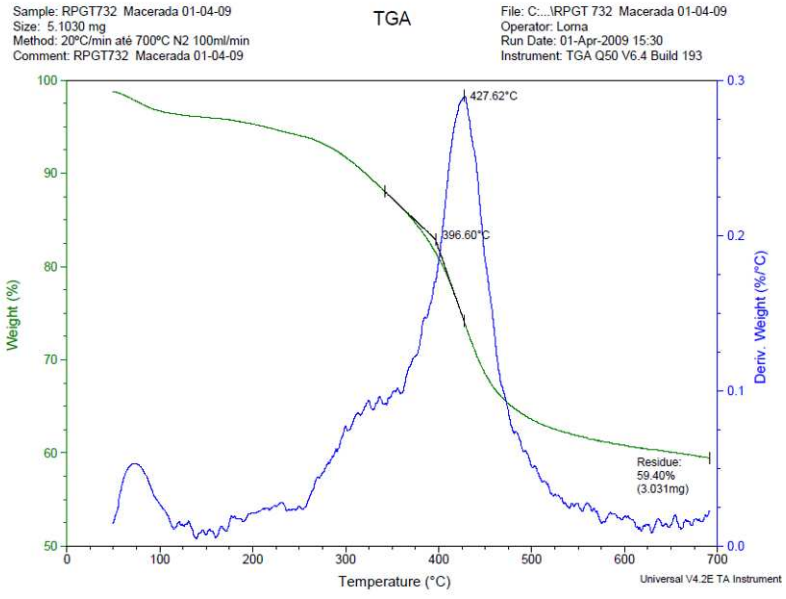


Sample: RPGT731 Macerada 02-04-09  
Size: 4.8380 mg  
Method: 20°C/min até 700°C N2 100ml/min  
Comment: RPGT731 Macerada 02-04-09

TGA

File: C:\...RPGT 731 Macerada 02-04-09  
Operator: Loma  
Run Date: 02-Apr-2009 13:24  
Instrument: TGA Q50 V6.4 Build 193

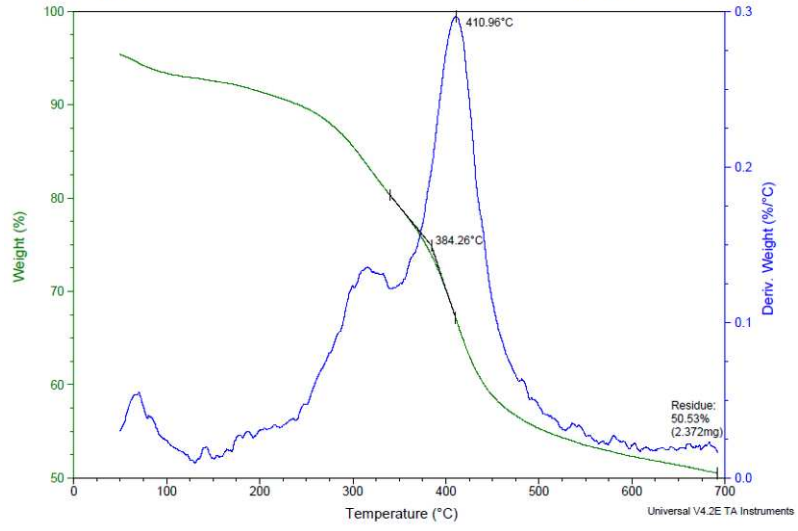




Sample: RRGT 734 29-06-09  
Size: 4.6950 mg  
Method: 20°C/min at 700°C N2 100ml/min  
Comment: RRGT 734 29-06-09

TGA

File: C:\Loma\Luz C. S. MRRGT 734 29-06-09  
Operator: Loma  
Run Date: 29-Jun-2009 13:53  
Instrument: TGA Q50 V6.4 Build 193



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)