

DO CURSO DE ENGENHARIA MECÂNICA DA UNIVERSIDADE
TECNOLOGICA FEDERAL DO PARANÁ
DAMEC - DEPARTAMENTO ACADEMICO DE MECÂNICA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

YURI BILK MATOS

**SÍNTESE DE NANOADITIVOS BASEADOS EM PRATA E
HALOISITA**

MONOGRAFIA DO PROJETO DE PESQUISA

CURITIBA
2017

YURI BILK MATOS

**SÍNTESE DE NANOADITIVOS BASEADOS EM PRATA E
HALOISITA**

Monografia do Projeto de Pesquisa apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso da do curso de Engenharia Mecânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Rodrigo Lupinacci Villanova

CURITIBA
2017

TERMO DE APROVAÇÃO

Por meio deste termo, aprovamos a monografia do Projeto de Pesquisa "SÍNTESE DE NANOADITIVOS ANTIMICROBIANOS BASEADOS EM PRATA E HALOISITA", realizado pelo aluno YURI BILK MATOS, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso - Tcc2, do curso de Engenharia Mecânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Prof. Dr. Rodrigo Villanova

DAMEC, UTFPR

Orientador

Prof. Dra. Marlene Soares

DAQBI, UTFPR

Avaliador

Prof. Dr. Emilson Viana Junior

Departamento, SIGLA da instituição

Avaliador

Curitiba, 04 de julho de 2017.

Dedico este trabalho a meus pais. Seu apoio me propiciou chance de estudar, e sem seu suporte eu não seria nada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Academic Working Capital e toda sua equipe, sua ajuda foi essencial no empenho de tentar transformar este trabalho em algo útil.

Agradeço ao Instituto Carlos Chagas pela cessão do microscópio de transmissão, sem o qual este trabalho não seria possível. E agradeço, especialmente a Bruna, pela imensa prestatividade em realizar as análises.

Agradeço a professora Marlene pela imensa ajuda e auxílio nos testes antimicrobianos. Sem sua indispensável assistência este trabalho não teria sido realizado.

Agradeço aos meus sócios Gustavo e Leonardo pela parceria, nos momentos tranquilos e nos momentos dramáticos.

Não basta adquirir sabedoria; é preciso, além disso, saber utilizá-la. (CÍCERO, Marco Túlio).

RESUMO

MATOS, Yuri Bilk. Síntese de nanoaditivos baseados em prata e haloisita. 2017. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso – BACHARELADO EM ENGENHARIA MECÂNICA, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

Um dos campos mais promissores da nanotecnologia é a síntese e utilização de nanomateriais. Em escala nanométrica materiais apresentam propriedades peculiares, distintas daquelas observadas em escala macrométrica. Um exemplo é o efeito bactericida de nanopartículas de prata. Este trabalho pretende estudar a síntese e o efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata, formadas a partir de redução térmica em um substrato nano-argiloso de haloisita. A caracterização morfológica do material foi feita através de microscopia de transmissão e difratometria de raio-x. A caracterização do efeito antimicrobiano foi feita seguindo os protocolos adequados da revista Nature e da ISO.

Palavras-chave: Nano-partícula. Prata. Antimicrobiano.

ABSTRACT

MATOS, Yuri Bilk. Synthesis of nanoadditives based in silver and halloysite. 2017. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso – BACHARELADO EM ENGENHARIA MECÂNICA, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

One of the most promising fields of nanotechnology is the synthesis and application of nanomaterials. On nano-scale, materials may present unusual properties. One example is the bactericidal effect of silver nanoparticles. This work intends to study the synthesis and antimicrobial effect of silver nanoparticles, synthesized on a nano-clay substrate made of halloysite. The morphological characterization was made by transmission microscopy and diffractometry, and the antimicrobial characterization was made following the convenient protocol developed by the Nature publications and ISO.

Keywords: Silver. Nanoparticle. Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Potenciais focos de infecção hospitalar. Os símbolos indicam superfícies suscetíveis à proliferação de agentes infecciosos.	2
Figura 2 – (Esquerda) Esquema da distribuição do material genético de uma bactéria, (Direita) microscopia de um plasmídeo	5
Figura 3 – Microscopia de <i>E. Coli</i> antes do tratamento com nanopartículas de prata.	6
Figura 4 – <i>E. Coli</i> depois de tratamento com nanopartícula de prata.	7
Figura 5 – <i>S. Aureus</i> . antes do tratamento com nanopartículas de prata, (c, d) depois do tratamento.	8
Figura 6 – Grupo Thiol, com a sulfridila destacada em azul	9
Figura 7 – <i>E. Coli</i> no fim da vida após tratamento com nanopartícula de prata.	10
Figura 8 – Microscopia de Transmissão de nanopartícula compósita HNT/Prata. A flecha vermelha indica prata formada fora do nanotubo. A flecha verde indica prata formada dentro do nanotubo.	12
Figura 9 – carregamento do HNT - a) HNT é colocada em meio aquoso rico em reagente, b) solução é misturada, c) Após ser submetida a vácuo e subsequente aumento de pressão, o interior do nanotubo é carregado com o reagente.	13
Figura 10 – Ilustração do processo de formação de nanotubos de prata em haloisita	13
Figura 11 – Haloisita com prata formada dentro (a, b, c) e fora (d, e)	14
Figura 12 – Estrutura da haloisita.	15
Figura 13 – Estrutura cristalina do aluminossilicato que compõe a haloisita	16
Figura 14 – estrutura de células unitárias com alumínio em haloisita	17
Figura 15 – estrutura do plano de silicato.	18
Figura 16 – Estrutura química do aluminossilicato que compõe a haloisita.	18
Figura 17 – estrutura cristalina e morfologia de HNT.	19
Figura 18 – Esquema de morfologias de polímeros nanoaditivos com argila.	20
Figura 19 – Esquema de agente silano	22
Figura 20 – Esquema de como funciona o tratamento com solução básica no HNT	23
Figura 21 – Curva de análise termogravimétrica da decomposição do acetato de prata. A Curva TG (Termogravimetric) indica a perda absoluta de massa em relação a temperatura. A curva DTG (Differential Thermogravimetric) indica a perda de massa por grau de temperatura aumentado.	26
Figura 22 – Curva de varredura diferencial de calorimetria	27
Figura 23 – Placa de Petri inoculada em <i>E. coli</i> em meio diferencial	32
Figura 24 – Fluxograma da preparação das bactérias	32
Figura 25 – Esquema da Microplaca	35
Figura 26 – Especificações dos corpos de prova	38

Figura 27 – Microscopias de nanopartículas sintetizadas segundo o processo 1.0 descrito na metodologia.	39
Figura 28 – Nanopartículas sintetizadas de seguindo o método de síntese 2.0	40
Figura 29 – Microscopia de nanopartículas sintetizadas segundo o processo 2.0	41
Figura 30 – Microscopia de nanopartículas sintetizadas segundo o processo 3.0	42
Figura 31 – Microscopia de nanopartículas sintetizadas segundo o processo 3.0, indicando formação interior e exterior de prata.	43
Figura 32 – Curva de difração de raios-x da amostra versus padrão e difração da prata metálica	43
Figura 33 – Curva de difração de raios-x da amostra versus padrão e difração do óxido de prata	44
Figura 34 – Halosita antes do tratamento químico de NaOH	45
Figura 35 – Halosita no segundo dia de tratamento com NaOH	46
Figura 36 – Halosita no quarto dia de tratamento com NaOH	46
Figura 37 – Halosita no quarto dia de tratamento com NaOH	47
Figura 38 – Halosita no sexto dia de tratamento com NaOH	47
Figura 39 – Halosita no sexto dia de tratamento com NaOH	48
Figura 40 – Halosita no oitavo dia de tratamento com NaOH	48
Figura 41 – Halosita no oitavo dia de tratamento com NaOH	49
Figura 42 – Nanopartículas de prata sintetizadas em halosita tratada por três dias	50
Figura 43 – Nanopartículas de prata sintetizadas em halosita tratada por três dias	50
Figura 44 – Nanopartículas de prata sintetizadas em halosita tratada por três dias	51
Figura 45 – Nanopartículas de prata sintetizadas em halosita tratada por três dias	51
Figura 46 – Detalhamento nas nanopartículas na superfície da halosita tratada por três dias antes do processo de síntese.	52
Figura 47 – Microscopia síntese de prata em halosita tratada por 8 dias	53
Figura 48 – Microscopia síntese de prata em halosita tratada por 8 dias	53
Figura 49 – Microscopia síntese de prata em halosita tratada por 8 dias	54
Figura 50 – Microscopia síntese de prata em halosita tratada por 8 dias	54
Figura 51 – Esquema da placa de poços. Os círculos rpetos indicam poços onde houve crescimento	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HNT	Haloisita
DAMEC	Departamento Acadêmico de Mecânica
CFU	Unidades formadoras de Colônias

1 INTRODUÇÃO

Materiais antimicrobianos vêm ganhando cada vez mais atenção no meio acadêmico e na indústria. Materiais deste tipo podem ser utilizados para criar atmosferas e superfícies inertes à proliferação de germes, o que é de grande valia em inúmeras aplicações.

Este trabalho apresenta uma técnica para síntese de nanopartículas antimicrobianas baseadas em prata, e um estudo sobre a eficiência antimicrobiana destas nanopartículas. A importância deste tipo de partícula advém do fato de que podem ser utilizadas como aditivos para imbuir matrizes de outros materiais, como polímeros, de poder germicida. Esses polímeros antimicrobianos, por sua vez, podem ser diretamente aplicados à diversas situação-problemas.

Uma delas é a decomposição de alimentos perecíveis. É de conhecimento geral que a indústria de alimentos é um dos setores mais prósperos da economia brasileira. Segundo relatório da ONU, a agricultura contribui diretamente com 14% do PIB do Brasil, e toda a cadeia produtiva de alimentos com 27% (FOOD; UN, 2014). Este setor, entretanto, tem um problema: o fato de que alimentos estragam. E, um alimento que estraga é um recurso morto, pois não pode mais nem ser comercializado nem consumido. Um estudo realizado na Universidade de São Paulo (VILELA et al., 2003) estimou que as perdas com alimentos estragados no país cheguem a um valor de 1,8% do PIB brasileiro, anualmente.

Estudos empíricos mostram que a utilização de polímeros com nanoaditivos antimicrobianos podem adiar consideravelmente a deterioração de alimentos (AZLIN-HASIM et al., 2015) Em alguns casos, os primeiros sinais microscópicos de decomposição foram adiados do primeiro dia de ensaio, para o décimo.(METAK, 2015).

Outra situação onde a aplicação de materias bactericidas possui grande potencial é a utilização destes no setor hospitalar. Um estudo do Centro Para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos estimou que anualmente naquele país 99000 pessoas morram de infecções adquiridas dentro dos próprios hospitais. (RM; JR; CL, 2007) Particularmente perigosas são as infecções hospitalares por superbactérias.

Superbactérias são bactérias que, através de mecanismos de seleção natural, desenvolvem alta resistência à ação de antibióticos. Por este motivo, infecções por estes micro-organismos são especialmente mortais, uma vez que os tratamentos usuais são poucos eficazes. O problema é ainda mais exacerbado pelo fato de hospitais serem justamente o ambiente mais propenso à evolução, surgimento e proliferação de superbactérias (LEVY, 2002).

Entre os métodos utilizados para prevenir a disseminação de infecções hospitalares estão: higienização constante de mãos, utilização de luvas, esterilização de equipamentos e isolamento de pacientes. Entretanto, estes métodos estão suscetíveis a falhas, pois agentes infecciosos podem aderir a superfícies, onde podem ficar incubados por longos períodos de tempo. Estas superfícies acabam atuando como foco de transmissão de doenças.(WILKS; MICHELS; KEEVIL, 2005)

Superfícies comuns em salas de hospitais como camas, grades, telefones, pratos, maçanetas e interruptores são conhecidas na literatura científica por serem disseminadoras de cepas de superbactérias, como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e penicilina (uma das cepas mais virulentas de bactérias resistentes a antibióticos), e *Enterococcus* (resistente à vancomicina). (DEFENSE, 2008) A figura 1 mostra potenciais locais de contaminação de superfícies por agentes infecciosos em um leito hospitalar. Em outras palavras, não apenas hospitais são ambientes propensos a proliferação de agentes infecciosos, eles são suscetíveis a proliferação de bactérias altamente resistentes e letais.

Figura 1 – Potenciais focos de infecção hospitalar. Os símbolos indicam superfícies suscetíveis à proliferação de agentes infecciosos.



Fonte: (WILKS; MICHELS; KEEVIL, 2005)

A utilização de nanomateriais bactericidas se apresenta como uma promissora solução para lidar com este problema.

Ao manufaturar ou revestir utensílios hospitalares como maçanetas, interruptores ou lençóis com materiais bactericidas, é possível criar na superfície destes objetos um meio inerte ao acúmulo de bactérias. Isso reduziria a atuação destas superfícies como vetor de transmissão de doenças. O resultado direto seria uma potencial redução no número de infecções hospitalares. (EDWARDS-JONES, 2006)

Além disso, nanopartículas de prata são eficientes contra superbactérias. Como este tipo de bactéria é altamente resistente a tratamentos médicos tradicionais, é importante tentar eliminá-las antes que ocorra uma infecção. (EDWARDS-JONES, 2006) A aplicação de materiais

bactericidas no controle destes agentes infecciosos é uma forma bastante eficaz de combater superbactérias de maneira profilática.(MORONES-RAMIREZ; WINKLER; SPINA C.; COLLINS, 2013)

Existe uma alta gama de materiais que, quando em forma de nanopartícula, apresentam algum tipo de ação bactericida. Exemplos são: nanopartículas de prata metálica, óxido de titânio, óxido de zinco, zinco metálico, ouro, óxido de cobre, óxido de magnésio, óxido de ferro, óxido nítrico e óxido de alumínio. Dentre todos estes, a prata metálica é o que possui o efeito antimicrobiano mais intenso, e por isso foi a substância escolhida para o desenvolvimento desta pesquisa.(BEYTH et al., 2015)

As nanopartículas foram sintetizadas a partir da redução química de um composto base contendo prata. O grande problema de técnicas como essa, entretanto, é garantir que ao serem formados, os grãos de prata vão se manter em escala nanométrica, ao invés de coalescer em partículas maiores. É possível controlar esse crescimento utilizando algum substrato para "ancorar" a formação das partículas e limitar seu crescimento. Nessa pesquisa, foi utilizado um substrato argiloso, chamado haloisíta.

A haloisíta (HNT) possui uma estrutura cristalina com forma natural de nanotubo. A maior vantagem do HNT em relação a nanotubos artificiais, como o de carbono, é o custo. HNT é um material de baixo custo, a aproximadamente 4\$/kg, e com suprimento global excedendo milhares de toneladas anualmente, o que significa que utilização em escala industrial deste material pode ser prontamente atingida. Em comparação, nanotubos de carbono custam na ordem de 500\$/kg e são sintetizados em lotes de poucas gramas.(YUAN; SOUTHON; LIU, 2008)

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa foi estudar a utilização de nanopartículas de prata como aditivos antimicrobianos

Os objetivos específicos foram:

- Desenvolver uma técnica de síntese viável para as nanopartículas de prata;
- Quantificar seu efeito antimicrobiano;
- Testar a intensidade de seu efeito antimicrobiano dentro de uma matriz polimérica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Historicamente, a prata é um material com amplo uso como agente anti-microbiano. Exploradores europeus do século XVI já conheciam essa propriedade, e evitavam a contaminação dos tonéis de água de seus barcos colocando algumas moedas de prata dentro de seus barris. A prata nano-métrica possui diversos mecanismos de ação anti-microbiana que são potencializados em relação às suas contrapartes macroscópicas, por isso sua utilização é uma evolução natural no uso deste material.

Já foi demonstrado na literatura científica que nanopartículas de prata com diâmetro de 21nm inibem o crescimento de certas bactérias (*E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, and *P. aeruginosa*). Concentrações de 10 µg/ml foram capazes de reduzir a proliferação de *E. coli* em até 70%, e concentrações acima de 50 µg/ml foram capazes de inibir completamente a reprodução da bactéria. (MORONES-RAMIREZ; WINKLER; SPINA C.; COLLINS, 2013)

Esse capítulo vai fundamentar quatro áreas de informação associadas ao desenvolvimento deste trabalho:

- Efeito antimicrobiano da prata
- O nanoaditivo
- Propriedades químicas da haloisita
- Dispersão de nanopartícula em polímero

2.1 MECANISMOS ANTIMICROBIANOS DA PRATA

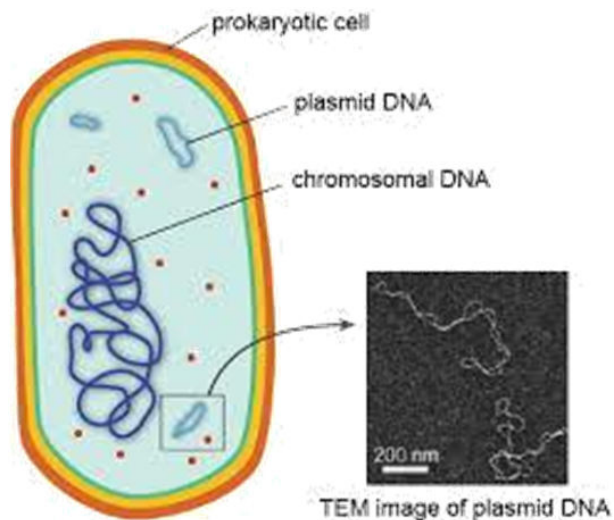
Para compreender de forma precisa as origens do efeito antimicrobiano da prata, é preciso entender os mecanismos através dos quais ela elimina os germes. A ciência, entretanto, ainda tem muito a descobrir a respeito destes processos. Três mecanismos já foram descritos de forma satisfatória na literatura científica: A inibição da replicação das moléculas de DNA da bactéria, interferência no funcionamento das proteínas celulares e catalização de Espécies Reativas de Oxigênio. (CHEN et al., 2008)

2.1.1 Inibição da Replicação de DNA

Moléculas de DNA armazenam toda a informação necessária para bactérias replicarem-se. São, portanto, uma das partes mais importantes destes seres. Por isso, é natural que estes microorganismos tenham evoluído mecanismos para proteger a integridade de suas cadeias de material genético.

É sabido que várias bactérias vivas, quando expostas a estímulos com potencial para danificar cadeias de DNA (como calor, por exemplo), respondem “contraíndo” a molécula de DNA, o que faz com que esta ocupe um volume menor, diminuindo sua vulnerabilidade. Além

Figura 2 – (Esquerda) Esquema da distribuição do material genético de uma bactéria, (Direita) microscopia de um plasmídeo



Fonte: (NOVER; SCHARF; NEUMANN, 1983)

disso, elas geram uma pequena membrana protéica envolvendo o material genético, o que aumenta seu grau de proteção contra danos externos. (NOVER; SCHARF; NEUMANN, 1983)

Curiosamente, foi documentado um efeito similar ao expor-se bactérias a íons de prata, como os que são liberados por nanopartículas de prata. (FENG et al., 2000)

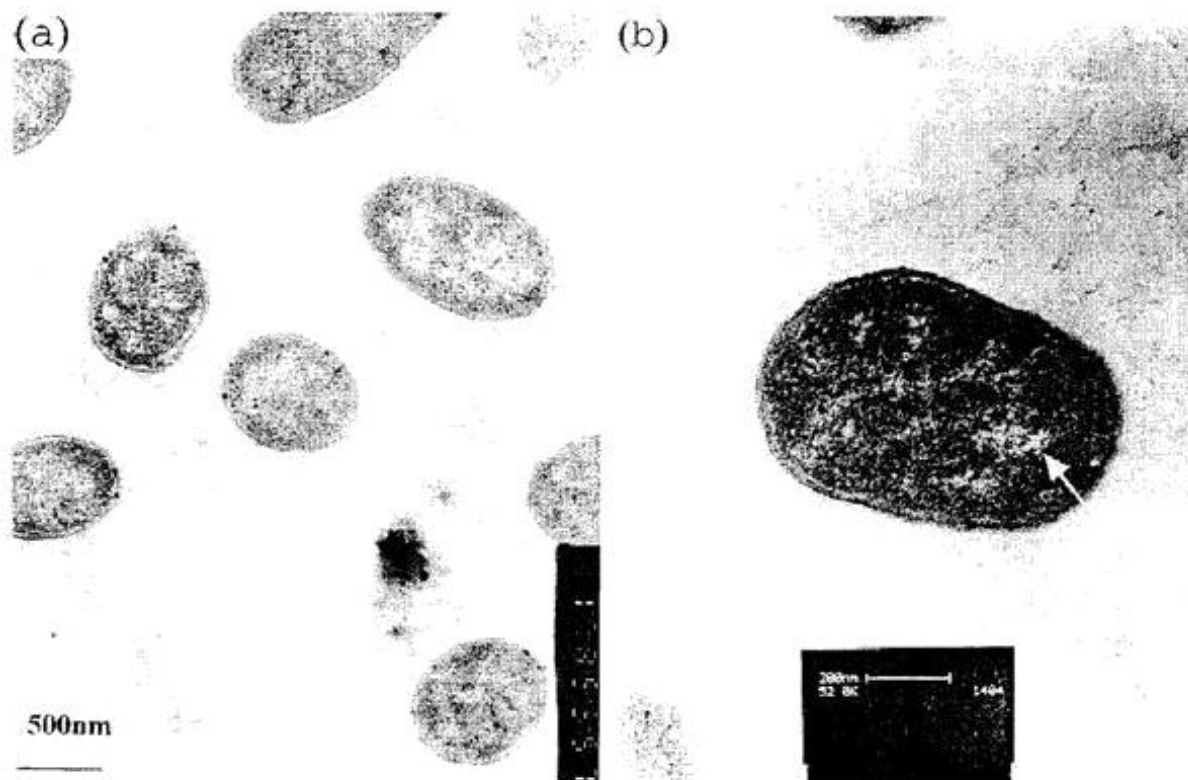
Em seu experimento, Feng expos uma cepa de bactérias gram-negativas (*Escherichia Coli*) e uma de gram-positivas (*Staphylococcus Aureus*) a um meio rico em íons Ag^+ . A figura 3 mostra micrografias de transmissão (MET) de uma cepa de controle de *E. Coli*. A região clara, indicada por uma flecha representa o DNA da célula. Como pode ser observado, e como era esperado, ele está espalhado por toda a região interna da bactéria.

Na figura 4 é possível ver os *E. Coli* depois de expostos a uma solução rica em íons de prata. É possível observar o surgimento de uma região clara no interior da célula, contendo uma substância densa e altamente compactada. Uma análise de composição elementar química forneceu evidências de que a região preta densificada no centro da célula são as moléculas de DNA. O escurecimento delas em comparação com a figura 3 implica que a cadeia molecular se organizou de forma bem mais densa.

Em outras palavras, ao colocar a célula de bactéria em contato com íons de prata, é desencadeado um processo onde a molécula de DNA se reorganiza de forma altamente condensada no interior da bactéria.

Além disso, é interessante observar como a exposição das bactérias a solução rica em prata fez com que surgissem pequenos grânulos no interior das células. A natureza destes grânulos será discutida na próxima seção, mas o que importa observar neste momento é que estes grânulos são encontrados na superfície externa da região clara que contém o DNA, mas não na região interna. Segundo o autor da pesquisa, isso é evidência de que essa região clara

Figura 3 – Microscopia de E. Coli antes do tratamento com nanopartículas de prata.



Fonte: (FENG et al., 2000)

sirva ao propósito de atuar como barreira, protegendo a cadeia de DNA de agentes destrutivos.

Ou seja, a exposição das bactérias a um meio rico em prata faz com que a célula produza uma espécie de membrana, que além de comprimir a molécula de DNA, atua como barreira protetora.

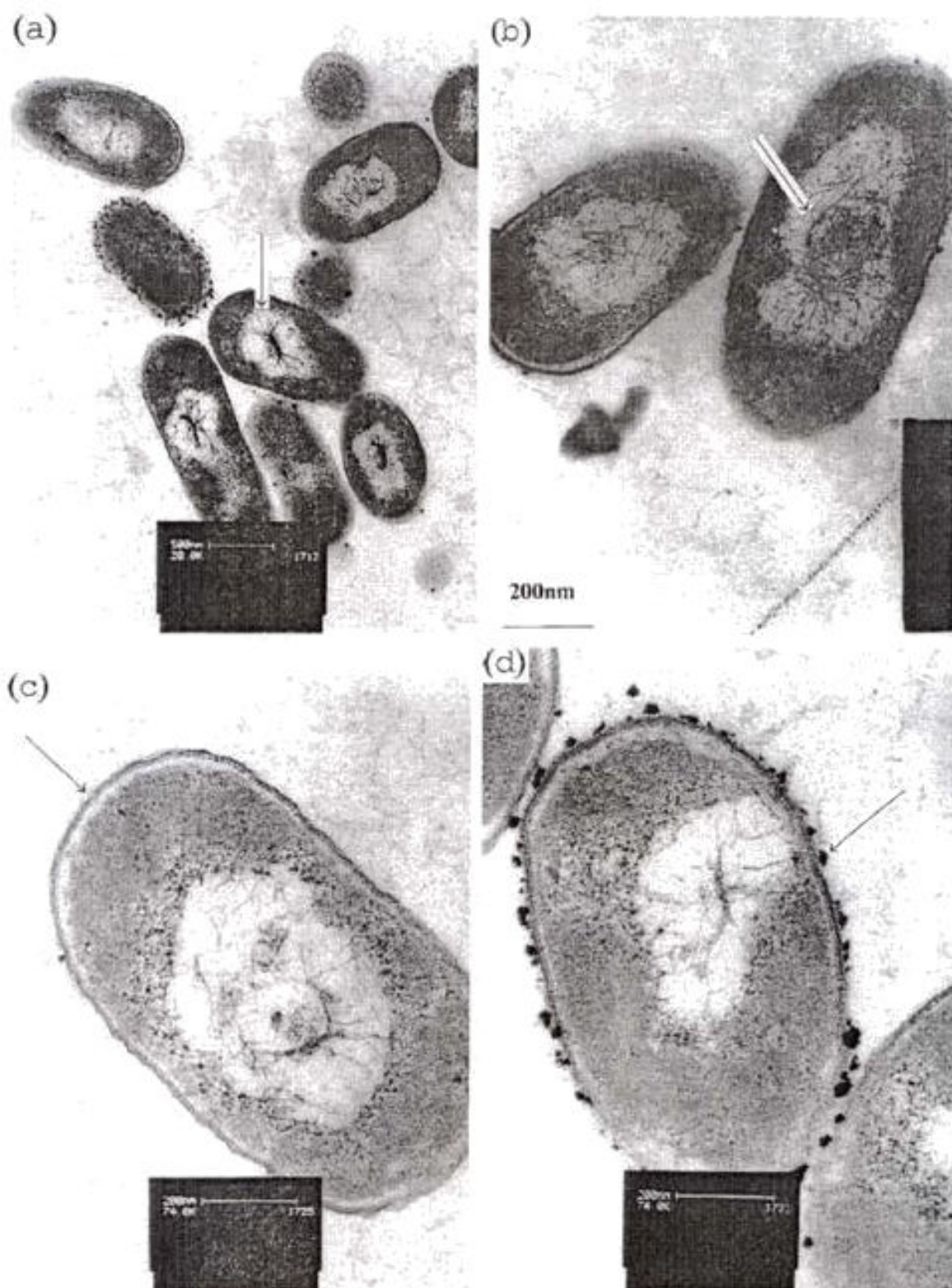
As pesquisas realizadas por Nover (NOVER; SCHARF; NEUMANN, 1983) identificaram esses mecanismos atuando quando bactérias eram expostas ao calor. Nesse caso, após a remoção do calor, estes mecanismos de defesa eram desativados e as bactérias voltavam ao seu estado normal. Feng, entretanto, descobriu que a exposição das bactérias a meios ricos em prata "trava" as células permanentemente neste "modo de defesa" (FENG et al., 2000).

A utilidade deste processo fisiológico no controle de bactérias advém do fato de que moléculas de DNA não conseguem se replicar quando contraídas. Logo, quando a prata "trava" a bactéria em um estado em que suas cadeias genéticas estão comprimidas, a bactéria não consegue mais replicar-se, e torna-se estéril.

Além disso, é possível observar nas figuras 3 e 4 que a membrana citoplasmática se desgrudou da parede celular. Embora isso não necessariamente implique em morte ou esterilidade do micro-organismo, provavelmente afeta de alguma maneira o metabolismo da bactéria.

A figura 5 mostra a microscopia pré e pós-tratamento com ions de Ag⁻ na bactéria

Figura 4 – *E. Coli* depois de tratamento com nanopartícula de prata.

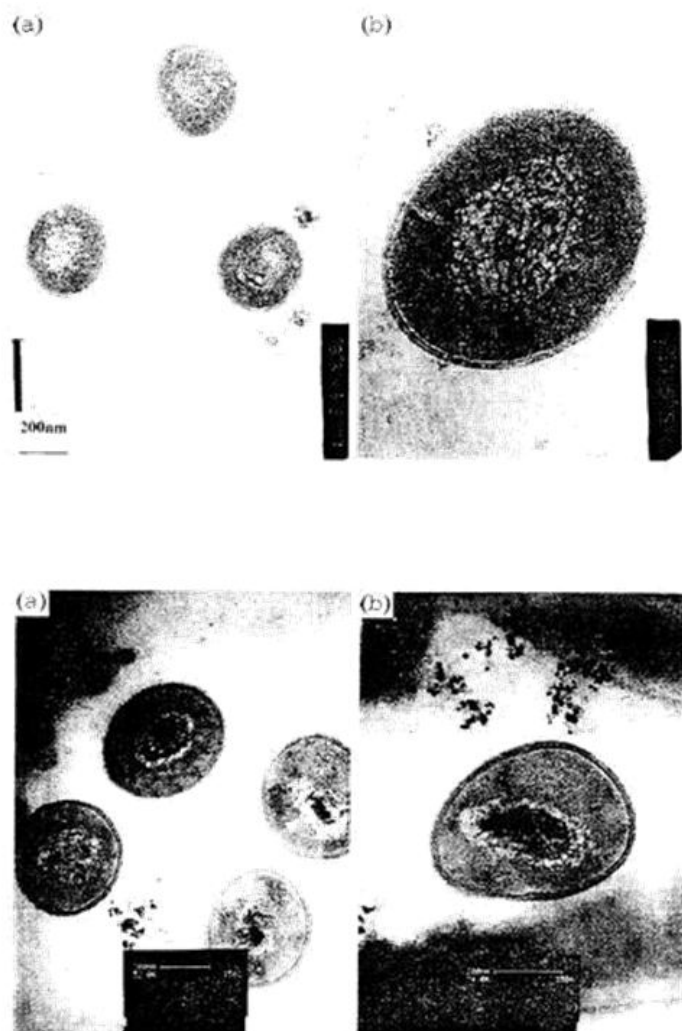


Fonte: (FENG et al., 2000)

de *S. Aureus*. Apesar da parede celular ser mais grossa na *S. Aureus* (afinal, é uma bactéria gram-positiva) é possível observar que as mudanças morfológicas são semelhantes. Isso é

evidência de que este mecanismo de esterilização de bactérias atua de forma análoga em bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Figura 5 – *S. Aureus*. antes do tratamento com nanopartículas de prata, (c, d) depois do tratamento.



Fonte: (FENG et al., 2000)

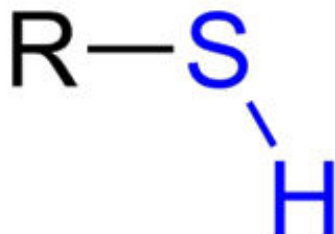
2.1.2 Mecanismo II: Interferência química em proteínas celulares

Como discutido na seção anterior, a nanoprata ativa certos mecanismos de defesa celular. Também vimos que alguns granulos pretos aparecem no interior da bactéria. Entretanto, qual a natureza destes grânulos?

Uma análise espectroscópica dos grânulos presentes no interior e superfície das bactérias pós-tratamento com íons de prata revelou a presença de enxofre. A presença de enxofre suporta uma hipótese: A de que os íons de prata interagem com certos grupos químicos existentes em proteínas no interior da bactéria, os grupos Thiol, inativando atividades enzimáticas, e “sabotando” o metabolismo da bactéria.(FENG et al., 2000)

Thiols são organosulfetos, presentes em algumas cadeias proteicas. São caracterizados pela presença de um grupo funcional –SH, conhecido como sulfidríla, ligada a um átomo de carbono (–C–SH ou R–SH, onde R representa um alceno, alceno, ou outro grupo de átomos contendo carbono). (PATAI, 1974)

Figura 6 – Grupo Thiol, com a sulfidríla destacada em azul



Fonte: (AFONSO; FILHO; SANT'ANA, 2010)

Evidências científicas apontam que metais pesados, como a prata, reagem com proteínas interagindo com os grupos thiols. Isso acontece com a prata "trocando" de lugar com átomos de enxofre destes grupos químicos. Ao fazê-lo, a prata altera a geometria da proteína, aumentando sua densidade, e potencialmente causando a precipitação da cadeia molecular. (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013)

De fato, a prata é conhecida como um metal capaz de causar deposição de proteínas *in vitro*.

Esses dois fenômenos, aliados ao fato de que os grânulos que surgem no interior da célula são ricos em enxofre e prata permitem a formulação de uma teoria: Ao interagir com os grupos Thiols os íons de prata colapsam algumas proteínas celulares, fazendo com que as cadeias proteicas se precipitem na forma de densos grânulos, que são vistos na microscopia como aqueles pontos escuros. (FENG et al., 2000)

É possível observar outro fenômeno interessante. A microscopia da figura 7 mostra uma bactéria no fim de sua vida após tratamento com íons de prata. Enquanto nas células da figura 4 existia uma membrana que "continha" os grânulos escuros no exterior, na figura 7 essa membrana colapsou, e estes grânulos permearam o interior da bactéria. Isso é evidência de que além das falhas metabólicas decorrentes da precipitação de proteínas, a difusão destes precipitados dentro da bactéria também pode estar associada a alguma letalidade.

2.1.3 Mecanismo III: Catalisação de Espécies Reativas de Oxigênio

Jingyu Lio (LIU; HURT, 2010) estudou a reação química de coloides de nanopartículas de prata em meio rico em oxigênio, analisando como a reação ocorria e os seus subprodutos. A partir da análise desta reação poderemos obter algumas informações interessantes.

Segundo Lio a reação de oxidação da prata em meio aquoso rico em oxigênio gera uma alta quantidade de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).

Figura 7 – E. Coli no fim da vida após tratamento com nanopartícula de prata.



Fonte: (FENG et al., 2000)

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas altamente reativas que contêm átomos de oxigênio. Alguns exemplos são peróxidos, superóxidos e hidroxilas.

Em um contexto biológico, EROs são formadas como um subproduto natural da metabolização do oxigênio, e até mesmo desempenham algumas funções importantes como transmissão de sinais químicos entre células.(AFONSO; FILHO; SANT'ANA, 2010)

Entretanto, se a concentração deste tipo de molécula for alto demais, pode causar dano a células, o que é conhecido como “stress oxidativo”. Nesse contexto, substâncias que desempenham funções biológicas importantes para a bactéria são oxidadas.

Entre os efeitos já observados na literatura estão(AFONSO; FILHO; SANT'ANA, 2010):

- Oxidação de moléculas de DNA;
- Oxidação de lipídeos e ácidos graxos polissaturados;
- Oxidação e aminoácidos em proteínas.

Esses danos causam mutações e inibem a ação de algumas enzimas que são fundamentais para o crescimento e replicação de bactérias. Ou seja, ao serem expostas a quantidades relativamente altas destas moléculas, o metabolismo e a fisiologia de bactérias entra em pane, especialmente porque os EROs tem potencial para oxidar várias moléculas que desempenham

funções metabólicas da bactéria.(AFONSO; FILHO; SANT'ANA, 2010)

Logo, uma boa estratégia para matar bactérias, seria coloca-las em meios ricos nestas espécies químicas. Vários estudos associaram a toxicidade de materiais a bactérias a sua capacidade de catalisar EROs.(AFONSO; FILHO; SANT'ANA, 2010)

Existem evidências empíricas bastante relevantes sobre o papel dos EROs no efeito bactericida da prata. Xu et. Al expos bactérias de E. Coli a um coloide de água e nanopartículas de prata em várias condições de temperatura diferentes, e mensurou o efeito bactericida e a produção de ERO. Ao confrontar os dois dados, ele foi capaz de correlacionar a produção de EROs com a taxa de mortalidade de bactérias. (XU et al., 2012)

2.2 O NANOADITIVO

Um dos problemas na síntese de prata nanométrica é garantir que os grãos de prata estabilizem-se em escala de tamanho nanométrica, ao invés de coalescerem formando grãos maiores. A solução utilizada nesta pesquisa foi utilizar um substrato para "ancorar" a síntese dos grãos de prata, impedindo que estes aglutinem-se em partículas maiores.

A morfologia básica do nanoaditivo pode ser observada na figura 11:

Os objetos pretos na imagem são nanopartículas de prata, e o substrato no qual elas estão formadas é um nanotubo de material argiloso, chamado haloisita (HNT). A síntese da prata segue um processo de três etapas:

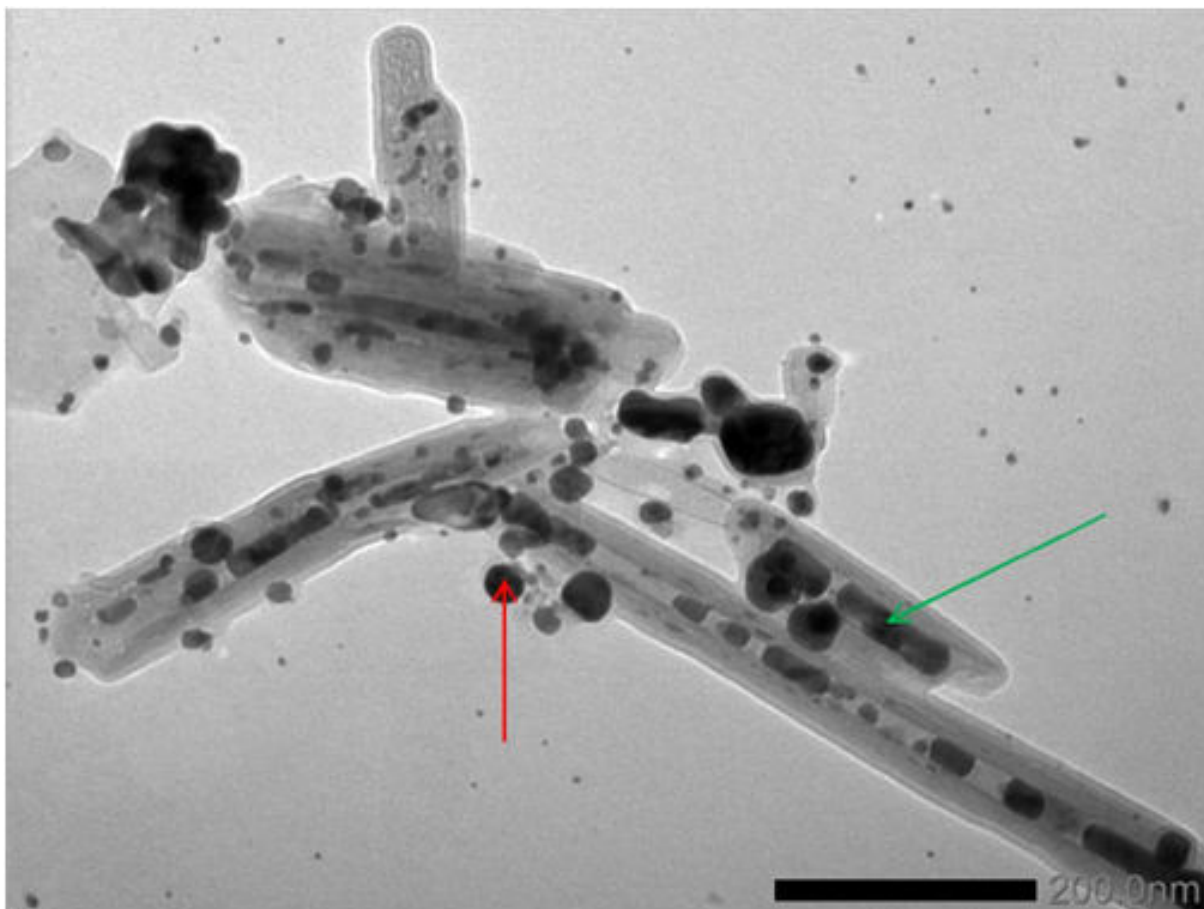
1. Carrega-se o nanotubo com um reagente, que é a fonte de prata para as nanopartículas. Esse reagente pode ser, por exemplo, nitrato de prata ou acetato de prata.
2. O nanotubo carregado é exposto a uma temperatura elevada, que dará início a uma reação de redução térmica na molécula portadora de prata. Essa reação de redução forma prata metálica. Nanocristais de prata metálica começam a nucleolar na superfície do HNT.
3. A prata nucleada cresce formando nanogrãos, como os observados na figura 09

Uma das grandes vantagens do HNT é o seu formato nanotubular. O furo central do HNT possui espessura variando tipicamente entre 10 e 15 nm. Isso permite que HNTs sejam utilizados para encapsular uma grande variedade de substâncias, desde metais, até proteínas. (CHURCHMAN et al., 1995)

É justamente essa capacidade de encapsular substâncias que permite que o nanotubo de haloisita seja utilizado como invólucro para a síntese de agente bactericida.(ABDULLAYEV et al., 2012)

Para que isso seja possível, é necessário carregar os nanotubos com os reagentes convenientes. A figura 10 mostra de forma esquemática como isso é feito. A primeira etapa do carregamento é colocar a haloisita em um meio líquido, rico em reagente. A segunda etapa é misturar a solução para homogeneizar o líquido. A terceira, e mais importante etapa, consiste em submeter a mistura a variação intensa de pressão. (LVOV et al., 2016)

Figura 8 – Microscopia de Transmissão de nanopartícula compósita HNT/Prata. A flecha vermelha indica prata formada fora do nanotubo. A flecha verde indica prata formada dentro do nanotubo.



Fonte: Aatoria Própria

Inicialmente, a solução é submetida a um intenso vácuo, que retira o ar de dentro do furo central do nanotubo. Em seguida, a mistura é submetida a uma variação de pressão positiva, que "empurra" os reagentes para dentro da haloisita, carregando-a. (LVOV et al., 2016)

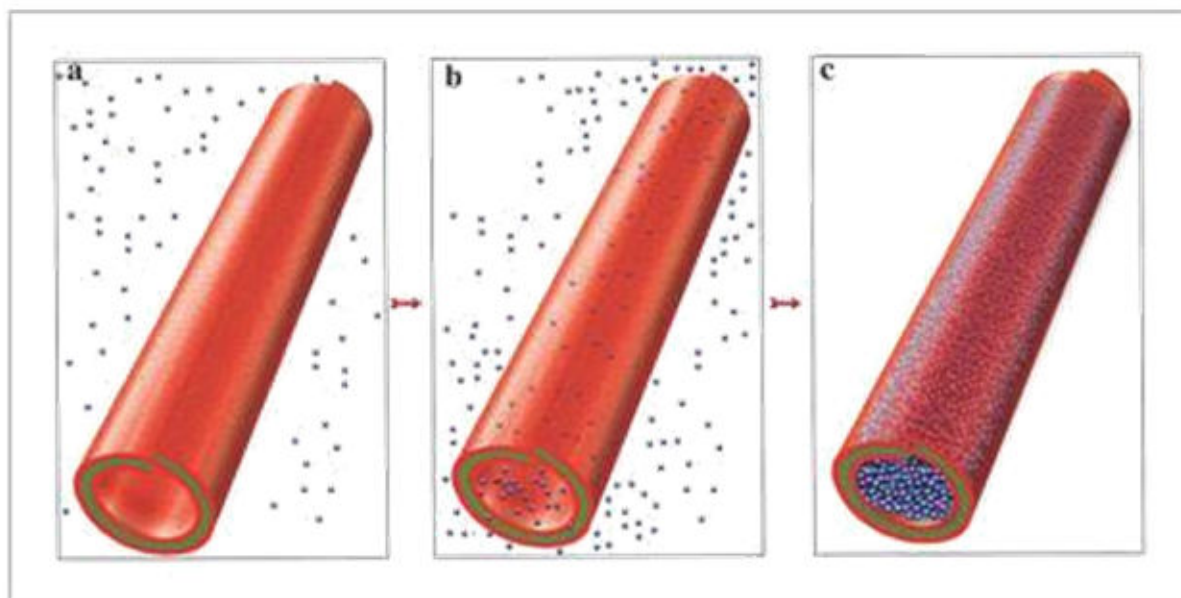
Depois de carregados os HNT, a mistura é submetida a um tratamento térmico para quebrar as moléculas de reagente dentro da haloisita. A figura 11 mostra esquematicamente este processo.

A formação de prata se dá em duas etapas, decomposição de prata em minúsculos nanocristais de prata na superfície do HNT, seguido por um subsequente crescimento desses cristais em nanogrãos. (ABDULLAYEV et al., 2011)

Os nanocristais de prata podem ser formados tanto na superfície interna quanto externa do HNT. Os nanocristais formados na superfície interna, ao crescerem, tendem a coalescer e formar um nanobastão de prata dentro do HNT. Os nanocristais que se formam na superfície externa formam pequenos grãos de formato tendendo ao esférico. (ABDULLAYEV et al., 2011).

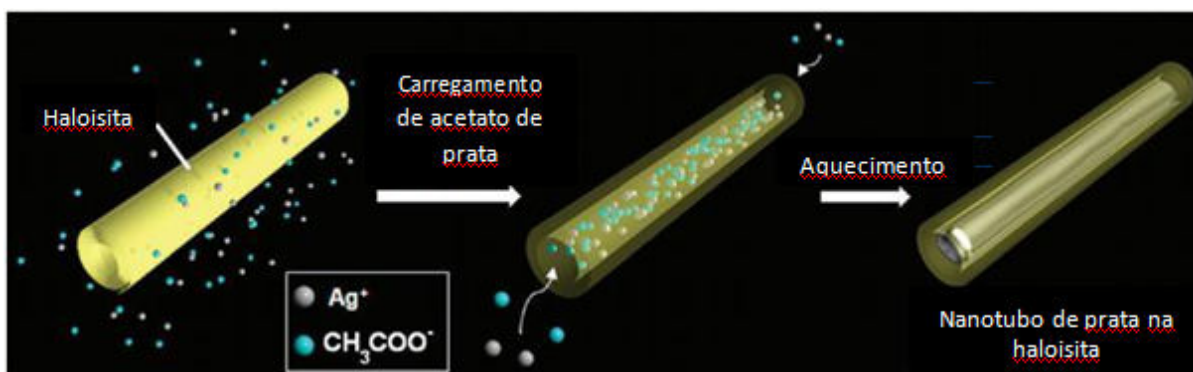
A figura 12 mostra partículas compósitas de HNT com formação interna de nanogrãos

Figura 9 – carregamento do HNT - a) HNT é colocada em meio aquoso rico em reagente, b) solução é misturada, c) Após ser submetida a vácuo e subsequente aumento de pressão, o interior do nanotubo é carregado com o reagente.



Fonte: (LVOV et al., 2016)

Figura 10 – Ilustração do processo de formação de nanotubos de prata em haloisita

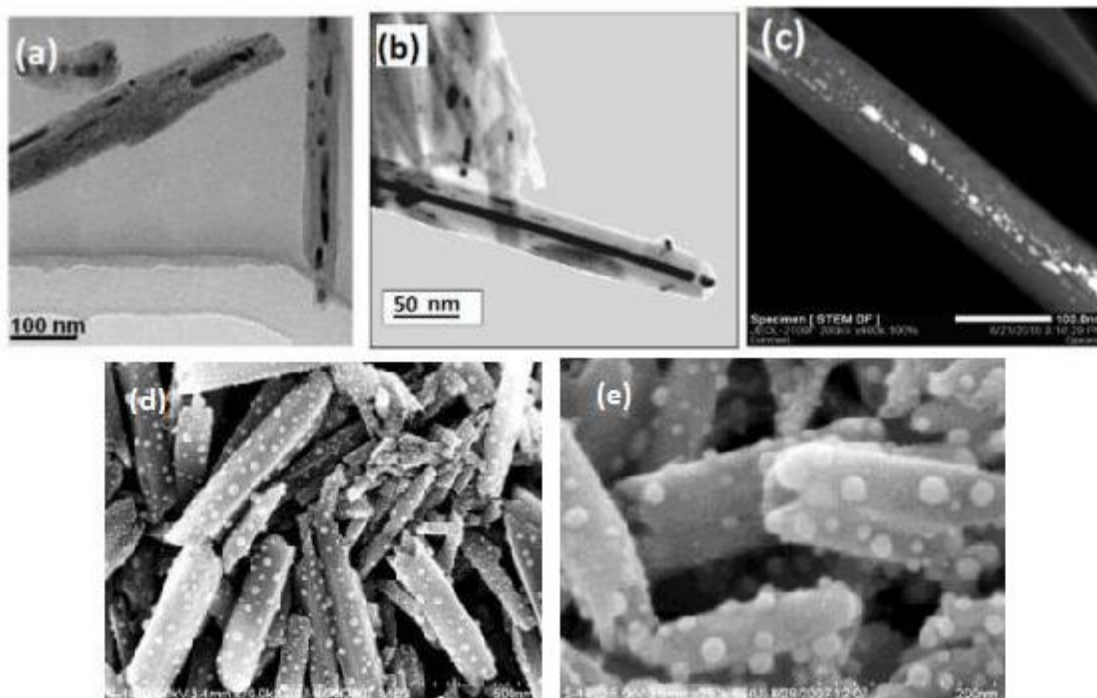


Fonte: (ABDULLAYEV et al., 2011)

de prata, e outras com formação externa.

A literatura científica aponta que quanto maior o nanogrão de prata, pior o efeito bactericida do material, por isso é interessante tentar manter os grãos tão pequenos quanto possível. (MORONES et al., 2005). Isso acontece pois quanto menores forem os grãos, maior será a relação área superficial/volume de prata, e portanto maior vai ser a energia de superfície da prata, o que aumenta a reatividade do seu volume metálico. Portanto, uma quantidade **X** de prata distribuída em vários cristais menores vai ter um efeito antimicrobiano mais intenso do que a mesma quantidade **X** distribuída em menos cristais maiores. Logo, é possível aumentar a intensidade do efeito bactericida do aditivo diminuindo o tamanho dos cristais formados.

Figura 11 – Haloisita com prata formada dentro (a, b, c) e fora (d, e)



Fonte: ([ABDULLAYEV et al., 2011](#))

Uma boa abordagem para reduzir o tamanho de grão de prata é aumentar a quantidade de pontos de nucleação para a prata, o que eventualmente resultaria em uma quantidade maior de grãos pequenos do metal. Na próxima secção estudaremos a estrutura da haloisita, para compreender como aumentar possíveis pontos de nucleação para a prata em sua superfície.

2.3 ESTRUTURA DA HALOISITA

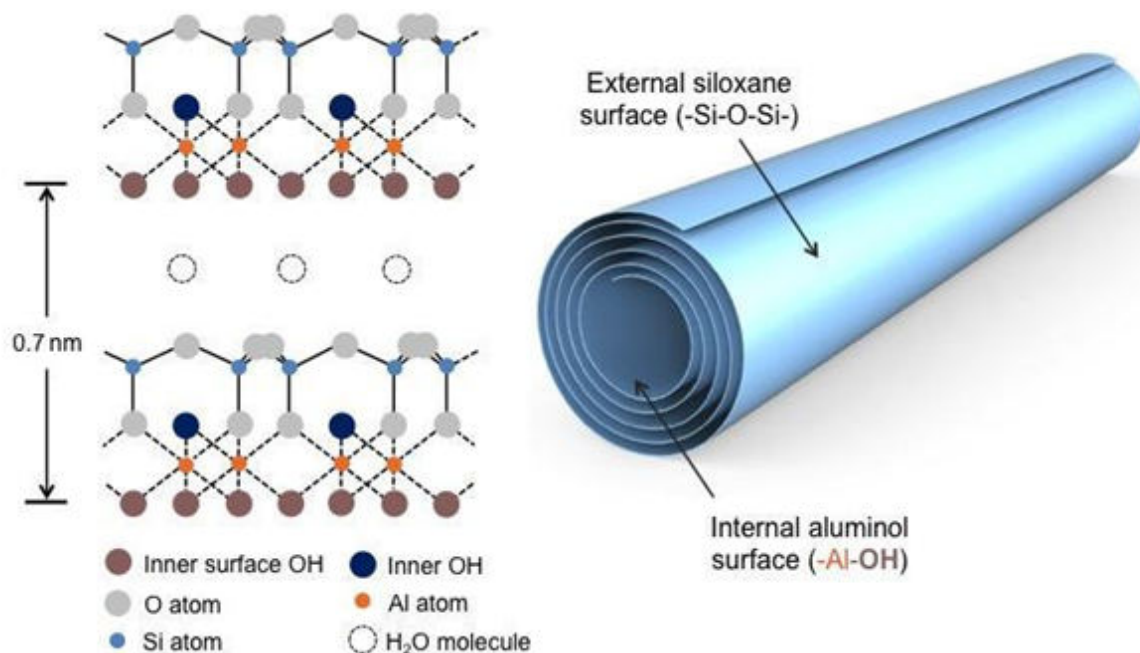
Como explicado, é possível controlar o crescimento de grão de prata "ancorando" sua formação em algum substrato. O substrato utilizado neste trabalho, foi a Haloisita. Nesta secção, vamos estudar as propriedades químicas deste material.

A haloisita é um material argiloso, que ocorre espontaneamente na natureza, podendo ser minerado em largas quantidades a custos baixos. A fórmula química desta substância é $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, ([LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013](#)) onde o " $n\text{H}_2\text{O}$ " expressa a presença ($n=2$) ou ausência ($n=0$) de água na estrutura do material. ([YUAN; TAN; ANNABI-BERGAYA, 2015](#))

A figura 13 mostra um esquema de um nanotubo de haloisita.

Pode-se observar pelo esquema que o nanotubo de haloisita (HNT) possui estrutura de uma "folha" de material cristalino enrolada em torno de um eixo, formando um tubo. Essas "folhas" que compõe a haloisita são constituídas de um aluminossilicato. ([RAWTANI; AGRAWAL, 2012](#)). No caso da haloisita hidratada ($n=2$), o espaço entre camadas de alumínio silicato é

Figura 12 – Estrutura da haloisita.



Fonte: (YUAN; TAN; ANNABI-BERGAYA, 2015)

preenchido de água.

As dimensões físicas da haloisita variam de tubo para tubo, e de depósito para depósito. O diâmetro externo dos nanotubos costuma variar de 40 até 60 nm, o diâmetro interno costuma variar de 10 nm até 15 nm. (LVOV et al., 2016) em casos extremos, entretanto, esses valores podem chegar a são de 30-190 nm para diâmetro externo, e 10-100 nm para diâmetro interno. (REICH; THOMSEN; MAULTZSCH, 2008)

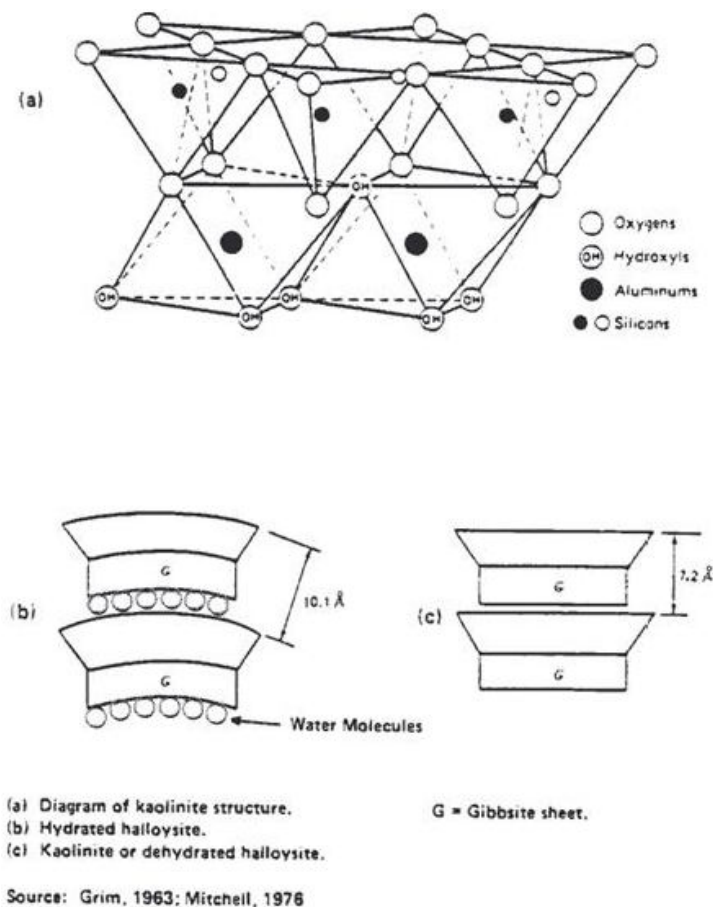
O comprimento do tubo varia bastante, desde tamanhos submicrométricos até micrométricos. Em alguns casos já foram identificados tubos de até 30 micrometros de comprimento. (JOUSSEIN et al., 2005) Os valores mais comuns de comprimento, entretanto, se encontram na ordem de 700 – 1000 nm (LVOV et al., 2016). O espaço entre camadas é de 10 Angstroms no caso da haloisita hidratada, e 7 angstroms no caso da haloisita desidratada. (YUAN; TAN; ANNABI-BERGAYA, 2015)

O aluminossilicado que compõe o HNT é formado, essencialmente, por duas camadas distintas. A camada “superior”, ou externa, é formada por um silicato, com célula unitária de Si-O. A camada “inferior”, ou interna, é formada de um aluminol com células unitárias OH-Al. [27], como pode ser observado pela figura 14.

É interessante analisar separadamente a morfologia de cada uma destas camadas. A camada do aluminol é organizada em um arranjo de células unitárias octaédricas, com o átomo de alumínio no meio, cercado por átomos de oxigênio e hidroxilas nos vértices. (BROWN, 1982) Um esquema é mostrado na figura 15.

A estrutura da figura 15 é genérica para argilas da família das caulinitas. Dependendo

Figura 13 – Estrutura cristalina do aluminossilicato que compõe a haloisita



Fonte: (BROWN, 1982)

da argila, haverá um oxigênio ou uma hidroxila no vértice do octaedro.

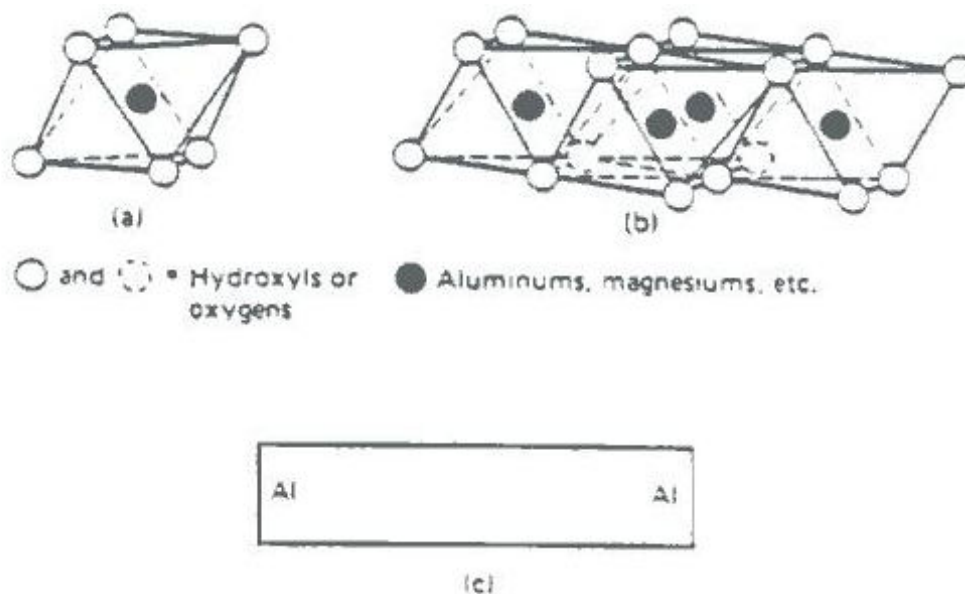
No caso da haloisita, o lado “inferior” da estrutura (que vai ficar virado para dentro do tubo) é ocupado por 3 hidroxilas. O superior, que vai se ligar com o plano de silicato, é ocupado por dois oxigênios, e uma hidroxila. Na haloisita, uma em cada 3 células unitária possui uma vacância central, de modo a equilibrar eletronicamente a estrutura.

Os dois oxigênios do plano superior de aluminol são compartilhados com o plano de silicato. A estrutura do silicato segue a tradicional morfologia tetraédrica, esquematizada na figura 16.

Os dois planos se unem através do compartilhamento de átomos de oxigênio. Ou seja, os mesmos átomos de oxigênio ocupam as posições do octaedro de alumínio, e do vértice superior de silicato. Um esquema transversal da “folha” de aluminossilicato pode ser visto na figura 17.

Algo interessante é ocasionado por esse compartilhamento de oxigênios entre as duas camadas. A distância entre os oxigênios apicais na estrutura tetragonal de silicato ($a = 5,02$ Angstroms, $b = 9,164$ Angstroms) é maior do que a distância entre oxigênios na estrutura octaédrica do aluminol ($a = 5,066$ Angstroms, $b = 8,655$ Angstroms) (NIU, 2016). Como as duas

Figura 14 – estrutura de células unitárias com alumínio em haloisita



- (a) Octahedron.
 (b) Octahedral sheet.
 (c) Schematic of gibbsite octahedral sheet.

Fonte: (BROWN, 1982)

camadas são unidas compartilhando justamente o oxigênio apical dos tetraedros de silicato, há um desalinhamento na estrutura cristalina. Assim, a célula unitária de aluminol, por ser menor, “aperta”, ou aproxima os oxigênios apicais da camada de silicato, que por sua vez “estica” a célula unitária do alumínio.

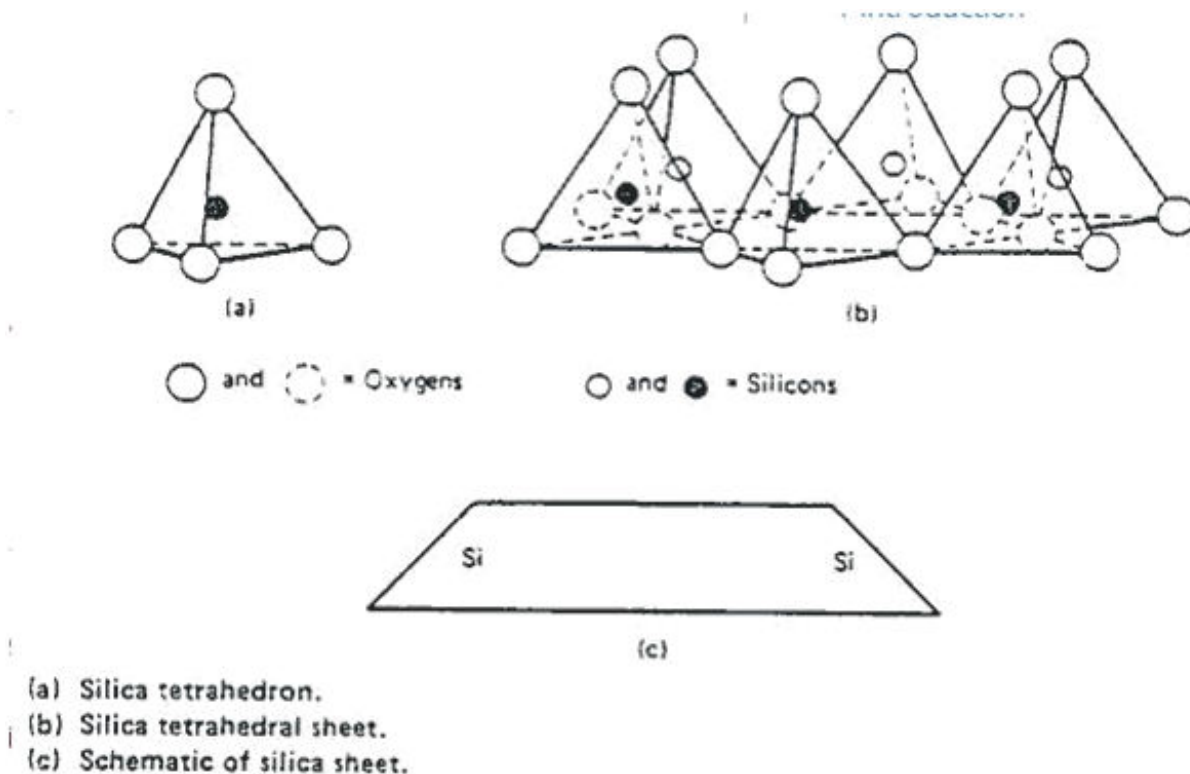
Ou seja, a distância entre os oxigênios é menor do que deveria ser para um plano de silicato isolado, e maior do que deveria ser para um plano de aluminol isolado. Isso gera uma tensão, que é transmitida através da rede cristalina, providencialmente fazendo com que surja um torque na estrutura do material, fazendo a “folha” de aluminosilicato enrolar. (SINGH, 1996)

Uma consequência interessante da forma como o HNT se enrola é que o plano de silicato vai estar sempre na parte externa, e o aluminol sempre vai estar na parte interna. Isso significa que a reatividade da superfície externa e interna do tubo serão diferentes. A figura 18 associa a estrutura cristalina do material com a diferença de morfologia interna e externa.

Em síntese, a superfície interna do nanotubo é forrada por Al-OH, e a superfície externa por Si-O. As diferenças químicas entre o interior e o exterior do HNT permitem que sejam feitas modificações ou tratamentos seletivos nas diferentes superfícies do material. (LVOV et al., 2016)(YUAN; TAN; ANNABI-BERGAYA, 2015)

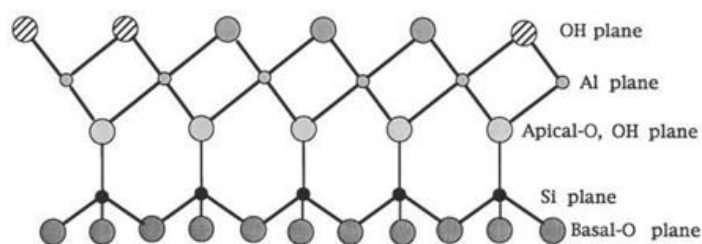
A diferença entre a composição química das superfícies interna e externa da haloisita

Figura 15 – estrutura do plano de silicato.



Fonte: (BROWN, 1982)

Figura 16 – Estrutura química do aluminossilicato que compõe a haloisita.

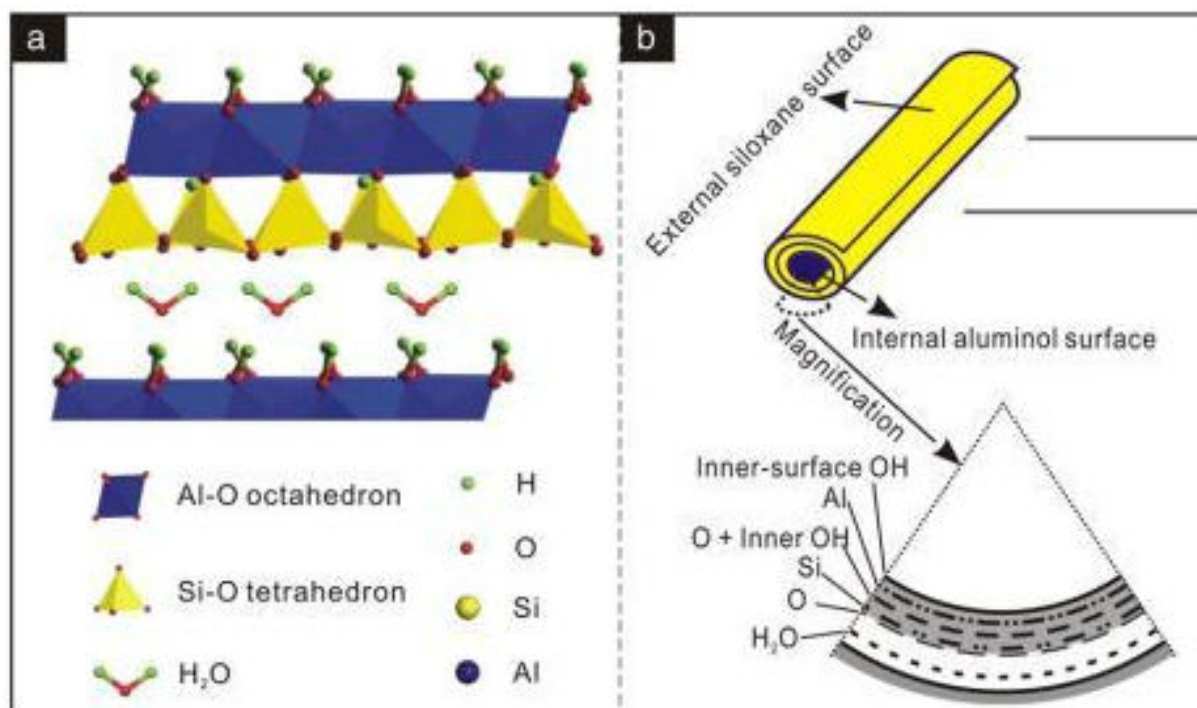


Fonte: (NIU, 2016)

também influencia na nucleação da prata. Por ser um ion positivo, o Ag^+ tende a nuclear-se na superfície revestida por OH^- da haloisita (ou seja, a interna). De fato, quando formam-se na superfície externa, os nanogrãos de prata tendem a nuclear-se nos defeitos superficiais do HNT, pelo fato de nestes defeitos estarem expostas fases de OH^- . (ABDULLAYEV et al., 2011)

Uma das possíveis alternativas para favorecer o surgimento de um número maior de pontos de nucleação para a prata (e por conseguinte de um número maior de cristais de prata, resultando em grãos menores) é a geração de defeitos cristalinos na superfície externa do nanotubo. Isso pode ser feito através de uma corrosão controlada desta superfície, o que segundo a literatura científica pode ser atingido através de tratamentos ácidos ou básicos no

Figura 17 – estrutura cristalina e morfologia de HNT.



Fonte: (YUAN; TAN; ANNABI-BERGAYA, 2015)

nanotubo de HNT. (WHITE; BAVYKIN; WALSH, 2012)

2.4 DISPERSÃO DE ADITIVOS EM POLÍMERO

A dispersão de nanoaditivos argilosos, como a haloisita, em matrizes poliméricas pode ser classificada em três categorias, de acordo com o grau de dispersão obtido (TANG et al., 2012)

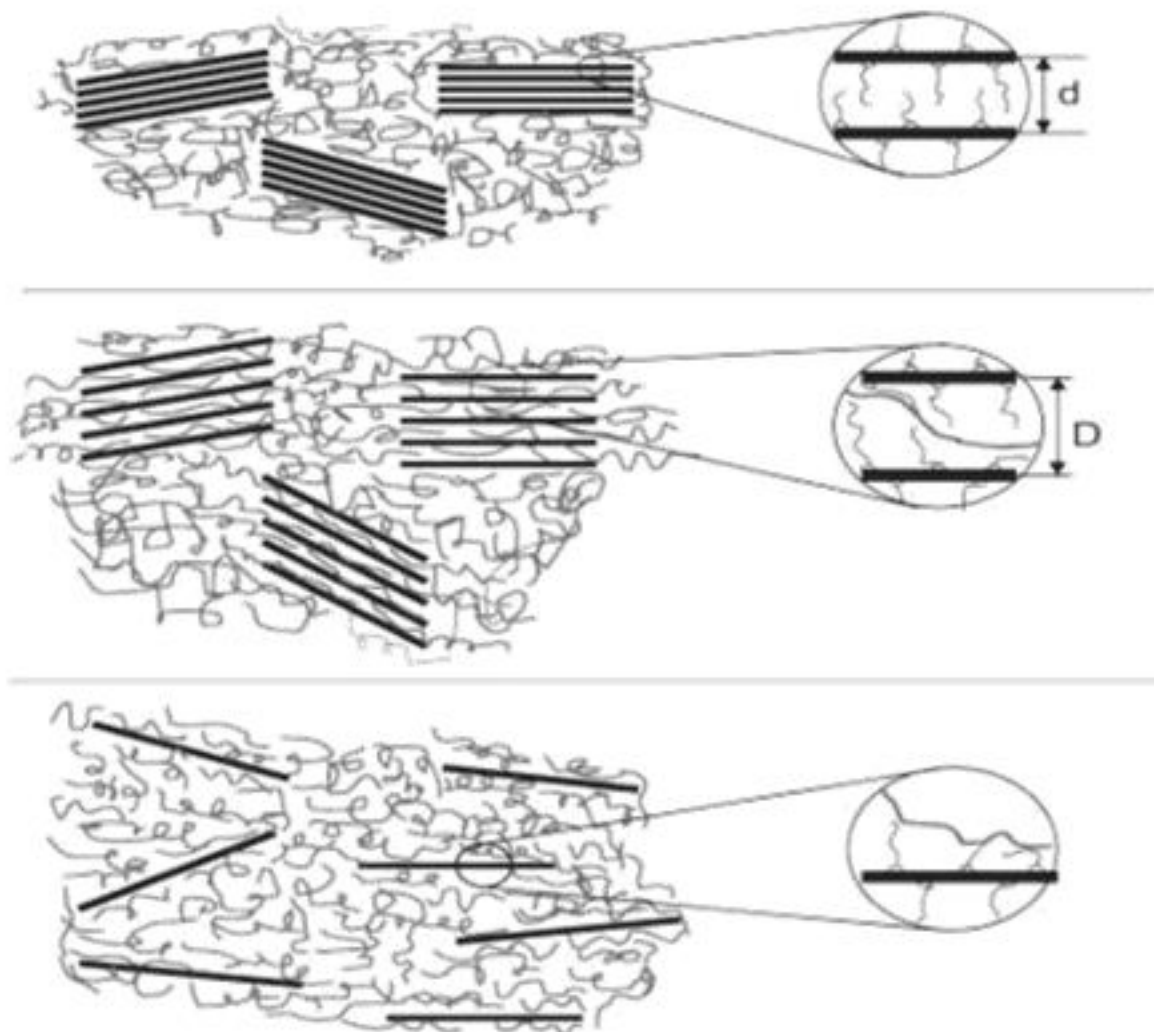
- Não misturada, partículas não dispersas na matriz de forma apropriada. Geralmente nesse contexto podem ser observados grandes aglomerados de partículas na matriz. Pequeno espaço entre partículas, o que dificulta substancialmente o “emaranhamento” do aditivo nas cadeias poliméricas da matriz.
- Camadas de argila ordenadas ou organizadas em agrupamentos dentro da matriz polimérica. O espaço entre os aditivos é maior, grande o suficiente para que algumas cadeias poliméricas passem entre as partículas.
- Disperso, aditivos relativamente isolados um dos outros, e altamente integrados na cadeia polimérica. Alta quantidade de cadeias poliméricas na “galeria” entre os nanoaditivos.

A figura 18 mostra de forma esquemática a diferença entre as três morfologias.

O estado morfológico mais desejável é o de dispersão alta, com partículas bem afastadas umas das outras. Esse é o estado onde os aditivos estão distribuídos de forma mais homogênea na matriz e melhor integrados nas cadeias poliméricas do material. (TANG et al., 2012)

Existem diversos métodos possíveis para se fazer a dispersão de nanoaditivos em

Figura 18 – Esquema de morfologias de polímeros nanoaditivos com argila.



Fonte: (TANG et al., 2012)

matriz polimérica. A técnica a ser utilizada neste trabalho é a dispersão em polímero derretido. (TANG et al., 2012) O principal motivo desta escolha é que este método de aditivação pode ser facilmente integrado a infraestrutura industrial já existente, sem necessidade de grandes investimentos em ferramental pois ela é executada nas próprias injetoras e extrusora que já são utilizadas na indústria de polímeros.

A técnica mistura em fusão consiste em misturar o nanoaditivo com a matriz polimérica derretida. Nessas condições, se a superfície do aditivo é suficientemente compatível com o polímero selecionado, haverá dispersão das partículas de material. Essa técnica é altamente recomendável para uso em polímeros termoplásticos.

A descrição da dispersão de aditivos pode ser dividida em 4 etapas (ALIG et al., 2012):

1. Molhamento inicial dos aglomerados de aditivo pelo polímero.
2. Infiltração de cadeias poliméricas nos aglomerados, enfraquecendo a atração entre eles.
3. Dispersão dos aglomerados.

4. IV) Separação dos aglomerados e dispersão dos nanotubos isolados pela matriz.

Parâmetros de processo, modificações superficiais nos aditivos e compatibilidade química entre aditivo e polímero são fatores que influenciam em quão boa pode ser a dispersão. (LUAN et al., 2012) Dois parâmetros desempenham papel crucial na performance de polímeros com aditivos de haloisita: uma boa dispersão na matriz polimérica, e uma boa afinidade interfacial entre a superfície externa do HNT e o polímero. (BART, 2005)(DU; GUO; JIA, 2010)

Como explicado na seção anterior, a haloisita possui sua superfície externa composta de um plano Si-O. Isso torna a superfície externa bastante hidrofílica (chegando a atingir ângulos de molhamento na ordem de 13 graus). Entretanto, a afinidade química entre a superfície externa do nanotubo e matrizes polimérica não é tão boa quanto a afinidade deste material com água. A baixa compatibilidade química entre a camada de (Si-O) e polímeros faz com que HNTs tendam a rapidamente formar agregados quando inseridos em matrizes poliméricas. (ABDULLAYEV et al., 2009)

Isso faz com que seja necessário aplicar tratamentos de funcionalização superficial que melhorem a afinidade química entre a superfície externa do HNT e polímeros.

Funcionalização superficial de HNT significa, em termos mais simples, alterar quimicamente a superfície do nanotubo, para incorporar ao material alguma propriedade que ele não possui espontaneamente.

A ideia deste tipo de modificação é incorporar na superfície do nanotubo alguma função química que tenha boa compatibilidade com polímeros. Ou, “revestir” o nanotubo com alguma substância que possua essa boa afinidade (YUAN et al., 2008).

Dessa forma, o que vai determinar a dispersão do HNT na matriz não é a compatibilidade do plano Si-O com a matriz, e sim a compatibilidade da função introduzida.

A seguir serão discutidas algumas formas de se introduzir funções químicas compatíveis com polímeros na superfície da haloisita.

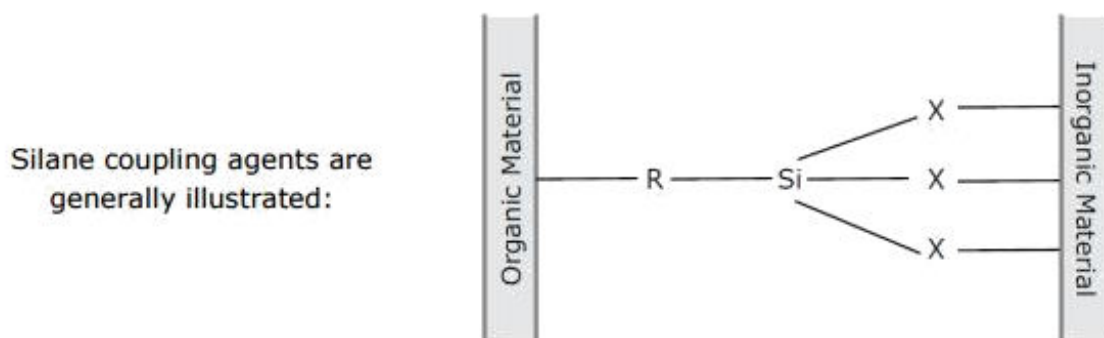
Alguns tipos de moléculas orgânicas baseadas em silano podem ser utilizadas para alterar as propriedades da interface de contato entre substâncias orgânicas e inorgânicas.

Essas moléculas podem ser divididas em duas regiões, como pode ser observado na figura 19. A primeira região é composta por um grupo funcional com afinidade com substâncias orgânicas (vinyl, chloro, epoxy, mercapto) representado na imagem por “R”. A segunda região, com grupos funcionais representados pelo “X” é composta por grupos funcionais com alta afinidade com substâncias inorgânicas (methoxy, ethoxy). O átomo de silício fica localizado entre os dois grupos funcionais. (YUAN et al., 2008)

De maneira grosseira, o que a molécula faz é atuar como “mediadora” entre a superfície orgânica e inorgânica.

O problema da utilização de agentes de acoplamento em HNT é que os grupos funcionais “X”, responsáveis por aderir a superfície inorgânica, fazem isso se ligando com hidroxilas. E, como já explicado, as hidroxilas da haloisita estão majoritariamente na superfície interna do

Figura 19 – Esquema de agente silano



Fonte: (YUAN et al., 2008)

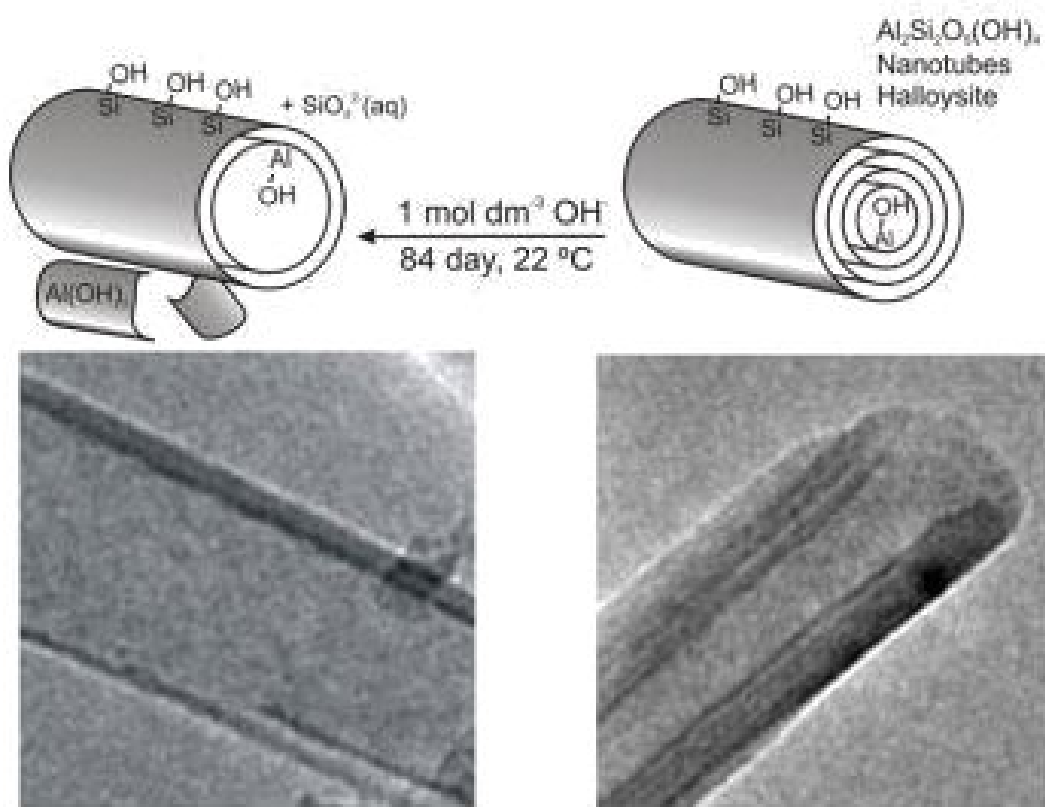
material. Na região externa só são encontradas hidroxilas em baixa quantidade na superfície lateral do tubo, e em defeitos da superfície externa, como poros (ROUQUEROL et al., 1994).

Isso significa que existem poucos locais na superfície externa do HNT adequados para formação de ligações químicas entre o nanotubo e o agente de acoplagem, o que resulta em um tratamento de qualidade insatisfatória.

Uma alternativa explorada de forma breve na literatura científica é atacar quimicamente a superfície externa do material para forçar o surgimento de defeitos na parede do HNT, aumentando a quantidade de pontos apropriados para ligação entre as duas espécies químicas. Estudos empíricos mostram que submeter a haloisita a um processo de calcinação em temperaturas de 600 °C até 900 °C é capaz de substituir parte dos silicatos na superfície externa do material por hidroxilas, o que melhora a compatibilidade da haloisita com agentes de acoplagem. (LIU et al., 2008)

Uma outra alternativa promissora, é atacar o HNT com uma solução ácida. Além de aumentar a densidade de poros na superfície, esse tipo de tratamento cria uma camada de hidroxilas na superfície externa do tubo (figura 20), o que poderia viabilizar a utilização de agentes de acoplagem. (WHITE; BAVYKIN; WALSH, 2012)

Figura 20 – Esquema de como funciona o tratamento com solução básica no HNT



Fonte: (YUAN; TAN; ANNABI-BERGAYA, 2015)

3 METODOLOGIA

Neste capítulo será discutida a metodologia utilizada para execução desta pesquisa. Os experimentos foram divididos em quatro categorias:

1. Síntese da Prata em haloísita;
2. Tratamento químico da haloísita;
3. Estudo do efeito antimicrobiano das nanopartículas;
4. Estudo do efeito antimicrobiano do aditivo em matriz polimérica.

3.1 EXPERIMENTO I: SÍNTESE DE PRATA EM HALOISITA

Esse experimento teve como intento validar as técnicas de síntese de prata em matriz de haloísita utilizadas na literatura científica. Foi tomado um cuidado especial no sentido de identificar possíveis empecilhos para a utilização destas técnicas.

A técnica utilizada como base foi a descrita em ([ABDULLAYEV et al., 2011](#)).

3.1.1 Materiais

Os seguintes materiais foram utilizados nessa fase:

- Haloísita desidratada (com espaçamento intralamelar de 7 angstroms), adquirida pela Sigma Aldrich;
- Acetato de Prata, adquirido através da Sigma Aldrich;
- Água Destilada;
- Uma centrífuga de baixa rotação (até 4000 rpm);
- Um forno elétrico, com aquecimento por resistência, capaz de operar em temperaturas de até 1000 graus celsius;
- Uma bomba de vácuo, com intensidade de vácuo de 69kPa.

3.1.2 Caracterização

A caracterização de amostras foi feita utilizando difração de raios X e microscopias de transmissão. Os equipamentos utilizados foram:

- Microscópio de Transmissão, Jeol, modelo JEM-1400 Plus;
- Difratorômetro de Raios X.

3.1.3 Procedimento

O procedimento base, conforme descrito em ([ABDULLAYEV et al., 2011](#)), consiste dos seguintes passos:

1. Adição de 1250mg de Haloisita e 250mg de Acetato de Prata em 250ml água destilada;
Explicação: Essa etapa serve para colocar o substrato (haloisita) em um meio rico em reagente fonte de prata (Acetato de Prata);
2. Suspensão é imersa em vácuo, por 30 minutos;
Explicação: O vácuo serve para retirar o ar presente no furo central da haloisita, liberando espaço para o reagente;
3. Retirada do vácuo, e exposição da amostra à pressão atmosférica;
Explicação: Nessa fase, a pressão atmosférica é utilizada para "empurrar" a solução rica em reagentes de prata para dentro do nanotubo;
4. Repetição dos passos 2 e 3, mais duas vezes;
5. Separação das partículas suspensas através de centrifugação, a 4000 rpm;
6. Secagem das partículas em forno, a 80 °C, por duas horas;
Explicação: A temperatura de secagem foi escolhida de modo a evitar a ebulição da água. De acordo com a referência supracitada, a ebulição da água pode descarregar o nanotubo de parte dos reagentes adsorvidos na haloisita;
7. Redução térmica do acetato de prata em temperatura de 350 °C, por 30 minutos.

Um problema foi identificado durante este processo. A adição simultânea da haloisita e do Acetato de Prata na suspensão torna difícil a analisar se o reagente está totalmente dissolvido ou não. Como será descrito na análise de resultados, isso gerou uma amostra com acetato não dissolvido, precipitando-se junto com a haloisita na etapa de separação. Para contornar os problemas gerados por esse fenômeno, foi gerada uma versão 2.0 do processo de síntese:

Síntese, versão 2.0

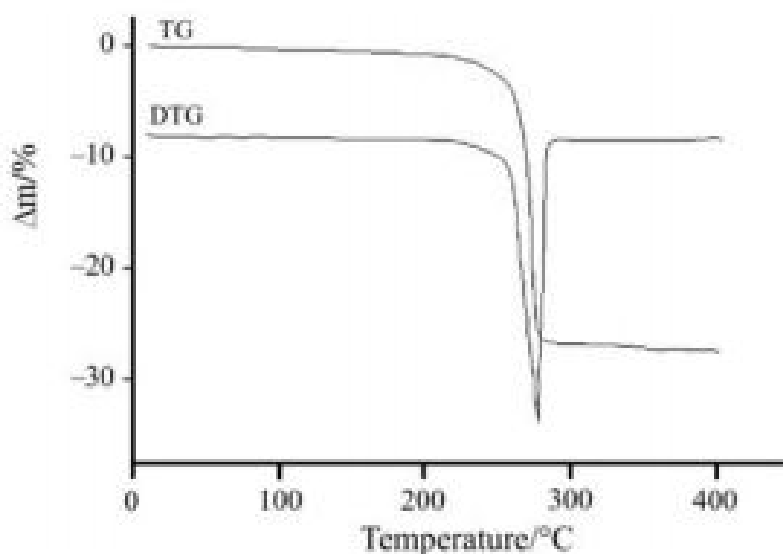
1. 250mg de Acetato de Prata em 250ml água destilada e subsequente homogeneização até completa dissolução do reagente;
2. Adição de 125mg de haloisita à suspensão;
Explicação: Ao primeiro garantir a completa dissolução do acetato de prata no solvente, para só depois adicionar a haloisita, garantimos que não haverá Acetato de Prata precipitando-se junto com a argila na etapa de separação;
3. Suspensão é imersa em vácuo, por 30 minutos;
4. Retirada da suspensão do vácuo, e exposição da amostra à pressão atmosférica;
5. Repetição dos passos 2 e 3, mais duas vezes;
6. Separação das partículas suspensas através de centrifugação, em 4000 rpm;
7. Secagem das partículas em forno, a 80 °C, por duas horas;
8. Redução térmica do acetato de prata em temperatura de 350 °C, por 30 minutos.

Finalmente, Em uma tentativa de melhorar o procedimento de síntese, foi feita uma última alteração no processo. Nessa fase, os parâmetros termodinâmicos da redução térmica foram alterados para tentar obter nano-grãos de prata de tamanho mais reduzido (o que por sua vez aumentaria a intensidade do efeito antimicrobiano das partículas).

Para isso, os estudos de decomposição térmica do acetato de prata de (LOGVINENKO et al., 2007) foram utilizados. Este pesquisador analisou a redução térmica de acetato de prata através de uma curva de varredura diferencial de calorimetria, e de uma análise termogravimétrica.

A análise da curva termogravimétrica pode ser encontrada na figura 21. Esse procedimento consiste em aquecer lentamente o acetato de prata, enquanto monitora-se a massa da amostra. visto que a redução térmica do acetato de prata gera subprodutos gasosos (LOGVINENKO et al., 2007), uma perda de massa indica que a reação de redução está ocorrendo naquela temperatura, visto que durante a reação de redução parte da massa do acetato é convertida em gases. A Curva TG (Termogravimetric) indica a perda absoluta de massa em relação a temperatura. A curva DTG (Differential Thermogravimetric) indica a perda de massa por grau de temperatura aumentado.

Figura 21 – Curva de análise termogravimétrica da decomposição do acetato de prata. A Curva TG (Termogravimetric) indica a perda absoluta de massa em relação a temperatura. A curva DTG (Differential Thermogravimetric) indica a perda de massa por grau de temperatura aumentado.



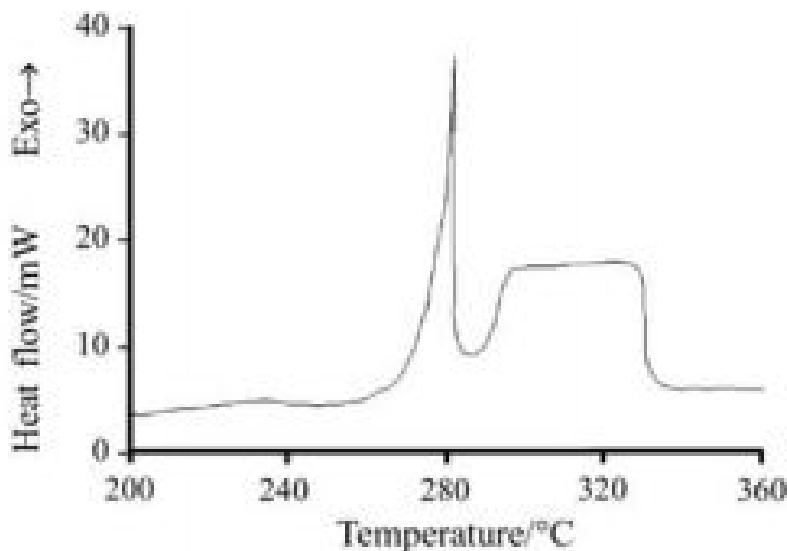
Fonte: (LOGVINENKO et al., 2007)

É possível observar, pelo gráfico, que existe uma perda de massa entre 260 °C e 286 °C. Essa perda de massa indica a faixa de temperatura da reação química de redução.

A varredura diferencial de calorimetria, por sua vez, mensura a quantidade de calor que é necessário fornecer para uma amostra de acetato de prata para aumentar cada 1 °C de temperatura. Se a quantidade de calor necessária para aumentar 1 °C da amostra aumenta, significa que algum processo **endotérmico** está consumindo energia e por isso está mais difícil elevar a temperatura da amostra. Se a quantidade de calor necessário para aumentar 1 grau celsius da amostra diminui, significa que algum processo **exotérmico** está liberando energia, o que facilita o aumento de temperatura.

A figura 22 contém a curva de análise diferencial de calorimetria do acetato de prata.

Figura 22 – Curva de varredura diferencial de calorimetria



Fonte: (LOGVINENKO et al., 2007)

Pela curva da figura 23, podemos observar que existem dois processos endotérmicos no aquecimento do acetato de prata. O primeiro deles, entre 270 °C e 286 °C, pode, segundo o autor, ser correlacionado à redução do acetato de prata (através da perda de massa na curva DTG). Essa redução é associada a nucleação de pequenos nanocristais de prata. Existe um segundo processo endotérmico, entre 290 °C e 330 °C, que está associado não a alguma reação química, mas sim ao crescimento de grão das partículas de prata.

Portanto, talvez seja possível controlar o tamanho dos grãos de prata sintetizados na haloisita escolhendo uma temperatura de processo que seja *maior* do que a temperatura de redução do acetato de prata, mas *menor* do que a temperatura de crescimento de grão da prata. Dessa forma, os grãos de prata não se nuclear, mas não terão energia suficiente para crescer.

Para testar essa hipótese, foi feito um processo de síntese 3.0:

Síntese, versão 3.0

1. 250mg de Acetato de Prata em 250ml água destilada e subsequente homogeneização até completa dissolução do reagente;
2. adição de 125mg de haloisita à suspensão;
3. Suspensão é imersa em vácuo, por 30 minutos;
4. Retirada da suspensão do vácuo, e exposição da amostra à pressão atmosférica;
5. Repetição dos passos 2 e 3, mais duas vezes;
6. Separação das partículas suspensas através de centrifugação, em 4000 rpm;
7. Secagem das partículas em forno, a 80 °C, por duas horas;
8. Redução térmica do acetato de prata em temperatura de 279 °C, por 15 minutos.

Explicação: A temperatura de 279 °C foi escolhida por ser o suficiente para reduzir o acetato, sem entretanto ativar o processo de crescimento de grãos. O tempo de redução foi diminuído por cautela, com intenção de evitar crescimentos de grãos desnecessários.

3.2 EXPERIMENTO II: TRATAMENTO QUÍMICO NO SUBSTRATO DE HALOISÍTA

Esse experimento teve como objetivo tentar melhorar as propriedades da haloisita como substrato para nucleação da prata.

Como explicado na fundamentação teórica, a haloisita possui duas fases cristalinas distintas, uma composta de aluminol, outra de silicato. Por ser revestida de hidroxilas, a fase de aluminol é mais adequada para a nucleação de prata.

Também foi explicado que a superfície externa da haloisita é revestida de silicato, enquanto a superfície interna é revestida de aluminol. Uma boa estratégia para aumentar a quantidade destes pontos de nucleação é gerar defeitos na superfície externa do nanotubo, de modo a expor a fase de aluminol ao meio carregado de prata.

Este efeito pode ser obtido através de processos corrosivos que afetem de forma mais intensa a fase de silicato, e de forma mais branda a fase de aluminol. Uma substância capaz de gerar essa corrosão diferencial da haloisita é o NaOH (LANGSTON; JENNE, 1964). ideia é que conforme a fase de silicato seja consumida, a de aluminol seja progressivamente exposta.

Com base nestes princípios, e através do experimento aqui descrito, foi desenvolvido um tratamento químico na haloisita, a fim de melhorar suas qualidades como substrato de nanopartículas de prata.

3.2.1 Materiais

Os seguintes materiais foram utilizados neste estudo:

- Haloisita desidratada (com espaçamento intralamelar de 7 angstroms), adquirida pela Sigma Aldrich;
- Nitrato de Prata, adquirido através da Sigma Aldrich;
- Hidróxido de Sódio, adquirido através da Sigma Aldrich
- Água Destilada;
- Uma centrifuga de baixa rotação (até 4000 rpm);
- Um forno elétrico;
- Uma bomba de vácuo, com capacidade de vácuo de 69kPa.

É importante notar que por razões logísticas o reagente de prata foi modificado em relação ao experimento I. Ao invés de utilizar Acetato de Prata, este experimento utilizou Nitrato de Prata.

O Nitrato de Prata decompõe-se termicamente de forma análoga ao Acetato de Prata, sendo necessário apenas ajustar os parâmetros térmicos do processo.

3.2.2 Caracterização

A caracterização de amostras foi feita utilizando microscopias de transmissão. O equipamento utilizados foi:

- Microscópio de Transmissão, Jeol, modelo JEM-1400 Plus;

3.2.3 Procedimento

O tratamento químico consistiu nas seguintes etapas:

- Dissolução de 1kg de NaOH em 3l de água;
- Adição de 30g de Haloisita na solução, seguido por agitação mecânica;
- Suspensão mantida por 8 dias;
- De 12 em 12 horas, a suspensão era misturada novamente;

Foram coletadas amostras para análise microscópica nos dias 2, 4 6 e 8. Coletadas amostras para a síntese de prata nos dias 3 e 8.

A síntese de prata foi feita segundo o seguinte procedimento:

1. 5g de Acetato de Prata em 250ml água destilada e subsequente homogeneização até completa dissolução do reagente;
2. adição de 1g de haloisita à suspensão;
3. Suspensão é imersa em vácuo, por 30 minutos;
4. Retirada da suspensão do vácuo, e exposição da amostra à pressão atmosférica;
5. Repetição dos passos 2 e 3, mais duas vezes;
6. Separação das partículas suspensas através de centrifugação, em 4000 rpm;
7. Secagem das partículas em forno, a 80 °C, por duas horas;
8. Redução térmica do acetato de prata em temperatura de 279 °C, por 15 minutos.

3.3 EXPERIMENTO III: ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

Concentração mínima inibitória (MIC) é uma medida quantitativa da intensidade do efeito antimicrobiano de algum material. Ela indica a concentração de material antimicrobiano que deve ser utilizada para gerar um efeito de inibição na proliferação das bactérias. Um material altamente antimicrobiano, portanto, possuiria um MIC baixo (seria preciso utilizar uma baixa quantidade para eliminar os germes), um material pouco eficaz, por sua vez, requer uma concentração alta de agente antimicrobiano e por isso teria um MIC alto.

3.3.1 Materiais

Foram utilizados os seguintes materiais na execução deste experimento:

- Haloisita desidratada (com espaçamento intralamelar de 7 angstroms), adquirida pela Sigma Aldrich;
- Nitrato de Prata, adquirido através da Sigma Aldrich;

- Água Destilada;
- Uma centrífuga de baixa rotação (até 4000 rpm);
- Um forno elétrico;
- Uma bomba de vácuo, com capacidade de vácuo de 69kPa;
- Placas de Petri;
- microplaca de 12 x 8 poços;
- Autoclave;
- Câmara de luz ultravioleta;
- Meio de cultivo Muller Hinton;
- Meio de Cultivo Plate Count Agar (PCA);
- Meio de Cultivo Manitol Salgado;
- Meio de Cultivo Rapid Coliform;
- Cloreto de Sódio;

3.3.2 Preparação das Nanopartículas

O material testado neste teste de concentração inibitória são nanopartículas sintetizadas de acordo com o seguinte método:

O MIC foi quantificado seguindo o protocolo recomendado pela revista Nature (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008). As etapas do procedimento são descritas a seguir:

1. 5g de Nitrato de Prata em 250ml água destilada e subsequente homogeneização até completa dissolução do reagente;

Explicação: Pelo fato de o coeficiente de solubilidade em água do nitrato de prata ser muito maior que o do acetato de prata, é possível fazer a solução de reagente em concentração maior.

2. adição de 1g de haloisita (**tratada por três dias, no experimento II**) à suspensão;
3. Suspensão é imersa em vácuo, por 30 minutos;
4. Retirada da suspensão do vácuo, e exposição da amostra à pressão atmosférica;
5. Repetição dos passos 2 e 3, mais duas vezes;
6. Separação das partículas suspensas através de centrifugação, em 4000 rpm;
7. Secagem das partículas em forno, a 80 °C, por duas horas;
8. Redução térmica do acetato de prata em temperatura de 400 °C, por 15 minutos.

3.3.3 Preparação das Bactérias

O ensaio foi realizado utilizando-se duas espécies de bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, nível de biossegurança 1 e representando a família das bactérias gram-negativas, e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, nível de biossegurança 2 e representando a família das bactérias gram-positivas. Inicialmente foi necessário obter culturas puras de ambas as espécies, através do processo descrito abaixo.

É importante atentar que todos os materiais utilizados no procedimento abaixo (com exceção das próprias bactérias) foram esterelizados em autoclave tanto antes do ensaio, quanto depois, para descarte e limpeza de resíduos. Os parâmetros de esterelização foram 121 graus celsius, 1.1 atm e 30 min.

Todo o procedimento foi realizado seguindo as normas de biossegurança para micro-organismos de nível 2. Foram utilizados os seguintes equipamentos de proteção individual: Jalecos, óculos de segurança, luvas descartáveis, calças compridas e sapatos fechados. Todas as operações com micro-organismos foram realizadas em um raio de 10cm da chama do bico de bunsen, Foi utilizado álcool 70 para esterelização de todos os materiais utilizados na bancada de experimento.

1. Foram selecionados duas suspensões de bactérias, uma para *E. coli* e outra para *S. aureus*. Ambas as suspensões foram oriundas do banco de cepas de bactérias do Laboratório de Microbiologia da UTFPR;
2. A partir das suspensões líquidas, ambas as cepas de bactérias foram inoculadas em placa de Petri com meio de cultivo diferencial.

Meio de cultivo *S. Aureus*: Manitol Salgado + ágar

Meio de cultivo *E. Coli*: Rapid Coliform Broth + ágar

Explicação: Os meios de cultivo utilizados nessa etapa são seletivos. Ou seja, permitem apenas a reprodução de certas espécies de bactérias. Ao inocular o *S. aureus* e o *E. coli* nestes meios, garantimos que as culturas obtidas contenham apenas as espécies desejadas;

3. As placas de petri contendo as bactérias inoculadas em meio diferencial foram incubadas por 24h em 37 °C

Explicação: A figura 23 mostra uma imagem de uma placa de Petri com *E. coli* em meio diferencial, para ilustrar o aspecto visual desta etapa.

4. Foram coletadas 5 colônias isoladas de bactérias em cada placa de meio diferencial. Essas colônias foram utilizadas para preparar duas suspensões de microorganismos em tubo de ensaio, que por sua vez foram inoculadas em meio de cultivo Muller Hinton.

Explicação: Nesta etapa, estamos replicando as bactérias de um meio de cultivo diferencial para um meio de cultivo padrão;

Explicação: A escolha de cinco colônias isoladas de cada bactéria tem como intento reduzir a variabilidade entre as bactérias obtidas na próxima etapa do cultivo

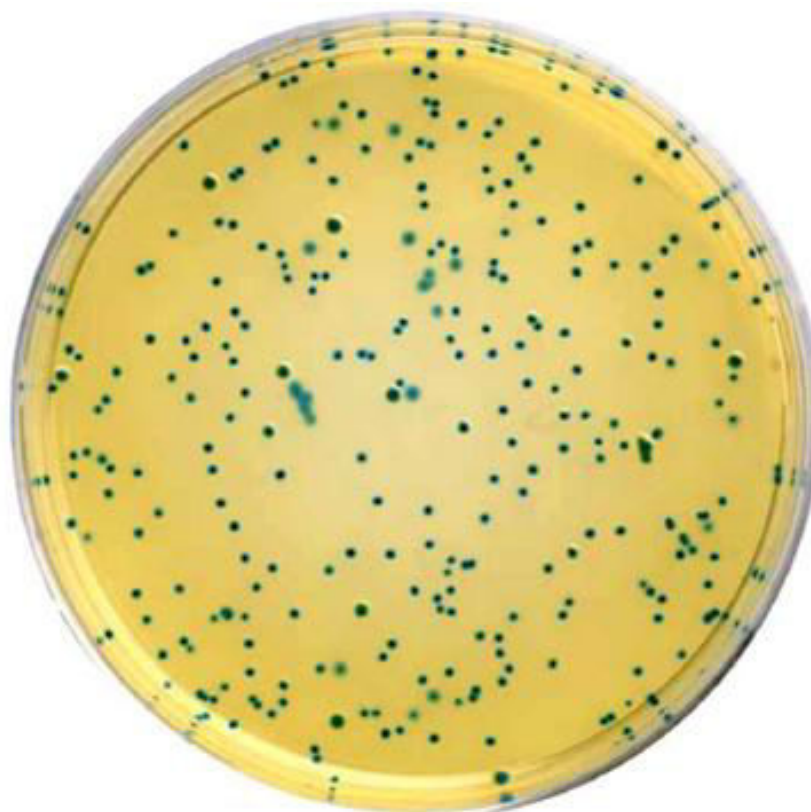
5. Placas de Muller Hinton inoculadas foram incubadas por 24h em 37 °C.

O fluxograma da figura 24 ilustra esse procedimento de forma gráfica.

3.3.4 Preparação do Inóculo

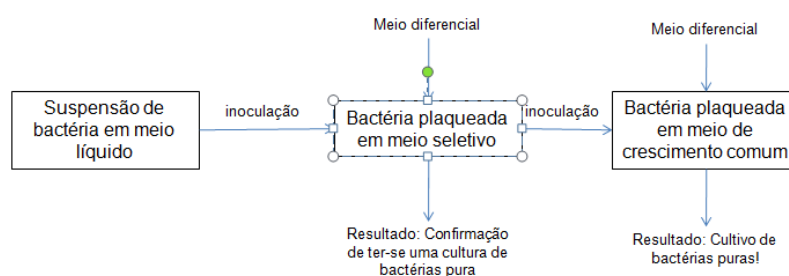
Nessa etapa, o cultivo puro de bactérias obtido na fase anterior é utilizado para produzir uma suspensão de microorganismos, que será utilizada na quantificação do MIC

A concentração de bactérias nesta suspensão é crítica para a reproductibilidade e

Figura 23 – Placa de Petri inoculada em *E. coli* em meio diferencial

Fonte: Wikipédia

Figura 24 – Fluxograma da preparação das bactérias



Fonte: Autoria Própria

padronização do ensaio. O protocolo utilizado como referência recomenda uma concentração de 5×10^5 cfu/ml. Para obter uma suspensão com a concentração correta, o seguinte procedimento foi executado:

1. Assim como na fase anterior, todos os materiais utilizados aqui (com exceção das bactérias) foi previamente esterilizado em autoclave;
2. Para cada uma das duas placas incubadas na fase anterior, foram escolhidas 5 colônias isoladas de *E. Coli* e *S. Aureus*;

3. As cinco colônias de cada bactérias foram transferidas, respectivamente, para dois tubos de ensaio (um para a *E. coli*, outro para a *S. Aureus*) contendo 9ml de solução salina (concentração: 8.5 g/l de NaCl);
4. as suspensões foram homogeneizadas utilizando um misturador de vortex;
5. A concentração de bactérias foi ajustada para a ordem de 10^8 cfu/ml.

Explicação: Esse ajuste foi feito utilizando a turbidez da amostra como parâmetro. Utilizando um espectrôfotometro, feixes de luz com comprimento de onda de 625 nm foram emitidos em ambas as suspensões.

O espectrôfotometro, então, mensura a absorvância da amostra. A partir dessa opacidade, é possível inferir a concentração das suspensões. O protocolo utilizado determina que a absorvância da amostra deve estar entre 0,08 - 0,13. Caso a absorvância esteja fora desta faixa, a amostra está na concentração errada. Isso pode ser ajustado inserindo mais colônias de bactéria na suspensão, ou mais solução salina no tubo de ensaio.

Foram obtidas absorvâncias finais de 0,097 para o *E. coli* e 0,078 para o *S. aureus*.

6. O resultado são duas suspensões de *E. coli* e *S. aureus*, com concentração na ordem de 10^8 cfu/ml, que serão utilizadas para aferição da concentração inibitória do material.

3.3.5 Obtenção do MIC

A fase final de aferição inicia-se com a suspensão obtida na etapa anterior (em concentração de 10^8 cfu/ml), e segue os seguintes passos:

1. Dilui-se 200 ul da suspensão de bactérias da etapa anterior em 19,8ml de meio de cultivo líquido Muller Hinton;

Explicação: A diluição serve para ajustar a concentração de bactérias aos valores recomendados pelo protocolo (10^5). A diluição é feita em meio de cultivo Muller Hinton para que as bactérias tenham os nutrientes necessários para proliferarem-se;

2. Em seguida, foram preparados dez tubos de ensaios com suspensões de nanopartículas nas concentrações expressas na tabela 1;

Explicação: As nanopartículas foram preparadas de acordo com o método descrito no Experimento II (com tempo de tratamento de substrato de 3 dias). A suspensões foram preparadas em Muller Hinton, através de sucessões de diluições. As diluições foram preparadas a partir de uma "suspensão mãe" com concentração de 16000 ppm;

3. 50ul de cada suspensão de nanopartícula foi inoculado em cada uma das 10 primeiras colunas de uma microplaca de 12 x 10 poços, conforme ilustrado pela figura 25;
4. na coluna 11 foi inoculado 1ml do meio de cultivo puro;
5. 50ul das suspensões de bactérias preparadas no passo (1) foi inoculado na microplaca. Nas três primeiras linhas foram inoculadas as *E. coli*, e nas três últimas foram inoculadas as *S. Aureus*. A exceção foram os poços da coluna 11, que foram mantidos vazios;
6. Na coluna 12 foi inserido 1ml de meio de cultivo Muller Hinton puro, para servir de controle negativo;

Explicação: Esta etapa serve para garantir que a microplaca estava estéril. Caso crescesse algo nestes poços, a placa estava contaminada;

7. Na última coluna 11 foi inserido 1ml de meio de cultivo Muller Hinton puro, para servir de controle negativo.
8. Na coluna 12 foi inserido 1ml de Muller Hinton puro;
9. A coluna 12 ficou como controle positivo. Nela estavam presentes apenas bactérias e meio de cultivo, sem agente antimicrobiano. Se não houvesse crescimento nesta placa o teste teria sido comprometido;
10. Foram retirados 10ul de cada poço de controle positivo. Estes volumes foram inseridos em 990 ul de solução salina neutra, resultando em uma suspensão de concentração 10^3 cfu/ml. Foi preparada ainda uma outra diluição, colentando 100ul desta e inserindo em 900ul de solução salina neutra, resultando em uma suspensão de concentração 10^2 ;
11. as duas suspensões do passo anterior foram inoculadas em placas de petri com meio de cultivo para contagem (PCA); **Explicação:** O objetivo é utilizar estas placas para contar o número de colônias formadas, garantindo que o teste foi realizado com a quantidade apropriada de bactérias;
12. Tanto as placas de petri para contagem quanto as microplacas foram incubadas por 24h a 37°C ;
13. Foi feita a contagem de colônias nas placas de petri, conforme indicado pela tabela 2 (na secção 4.3). Os números foram consistentes com a concentração de bactérias requeridas pelo protocolo.

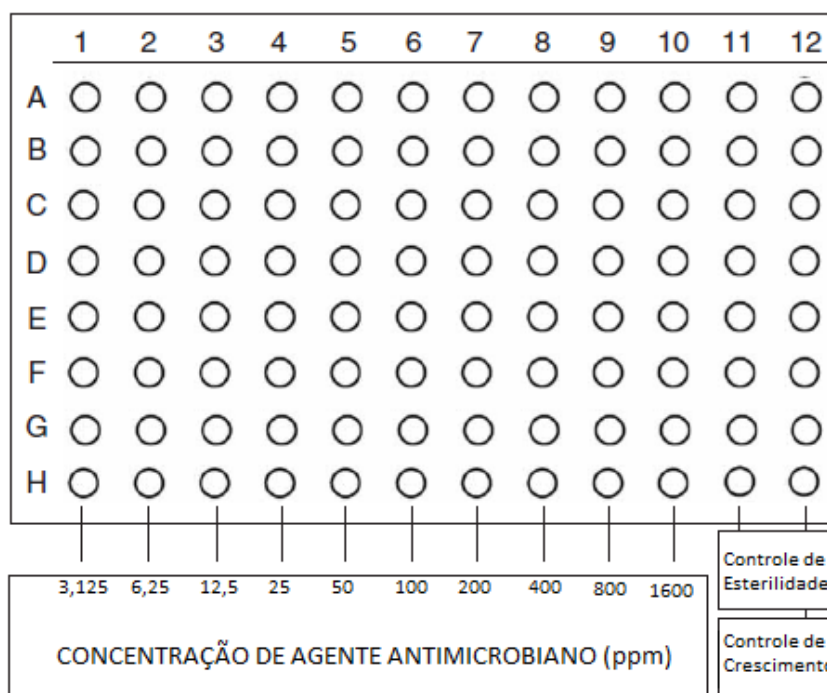
Após o período de incubação foi feita a leitura dos resultados. A leitura é feita por análise visual. Nos poços onde a concentração de antimicrobiano não foi alta o suficiente, as bactérias se proliferam, e o líquido dentro do poço torna-se opaco. Nos poços onde o efeito antimicrobiano foi satisfatório, a solução continua translúcida. A partir disso é possível observar a partir de que concentração houve inibição, e obter a concentração mínima inibitória do material.

3.4 EXPERIMENTO IV: ANÁLISE DE EFEITO ANTIMICROBIANO EM POLÍMERO

A última etapa deste estudo consistiu na análise de efeito antimicrobiano do nanopó dentro de uma matriz polimérica. Para isso, foi feita uma síntese de nanopó segundo as seguintes especificações:

1. 5g de Nitrato de Prata em 250ml água destilada e subsequente homogeneização até completa dissolução do reagente;
2. adição de 1g de haloisita (tratada por 8 dias) na suspensão;
3. Suspensão é imersa em vácuo, por 30 minutos;
4. Retirada da suspensão do vácuo, e exposição da amostra à pressão atmosférica;
5. Repetição dos passos 2 e 3, mais duas vezes;

Figura 25 – Esquema da Microplaca



Fonte: Autoria Própria

Tabela 1 – Concentrações de suspensões de nanopartículas

Estágio	Concentração(ppm)	Origem	ml origem	ml de meio de cultivo	coluna
Suspensão Mãe	16000	-	-	-	
suspensão 1	1600	suspensão mãe	1	10	1
suspensão 2	800	suspensão 1	1	1	2
suspensão 3	400	suspensão 1	1	3	3
suspensão 4	200	suspensão 1	1	7	4
suspensão 5	100	suspensão 4	1	1	5
suspensão 6	50	suspensão 4	1	3	6
suspensão 7	25	suspensão 4	1	7	7
suspensão 8	12,5	suspensão 7	1	1	8
suspensão 9	6,13	suspensão 7	1	3	9
suspensão 10	3,13	suspensão 7	1	7	10

6. Separação das partículas suspensas através de centrifugação, em 4000 rpm;
7. Secagem das partículas em forno, a 80 °C, por duas horas;
8. Redução térmica do acetato de prata em temperatura de 400 °C, por 15 minutos.

Em seguida, foi realizado um teste de avaliação de atividade antimicrobiana em superfícies poliméricas, seguindo as diretrizes do protocolo ISO 221961. Em síntese este protocolo avalia a atividade antimicrobiana de um corpo de prova plástico.

Este protocolo é dividido em três etapas.

A primeira etapa consiste na preparação das bactérias utilizadas no ensaio, e é feita de forma análoga a preparação de bactérias do experimento III, mudando apenas as cepas

utilizadas, que são: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e *Escherichia coli* ATCC 8739:

1. Todos os materiais utilizados, com exceção das próprias bactérias, foram esterelizados em autoclave;
2. Plaqueamento das duas cepas de bactérias em meio diferencial, a partir de meio líquido obtivo do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia da UTFPR; **Meio de cultivo *S. Aureus***: Manitol Salgado + ágar
Meio de cultivo *E. Coli*: Rapid Coliform Broth + ágar
3. incubação durante 24h a 37 °C;
4. Coleta de 5 colônias de bactéria de cada espécie, seguido de repique para placa de petri com meio de cultivo constituído de: 5g/l de extrato de carne, 10g/l de peptona, 5g/l de cloreto de sódio e 15g/l de agar;
5. Incubação durante 24h a 37 °C;
6. Após a incubação, as bactérias cultivadas foram utilizadas para uma suspensão, com concentração de 10⁵ em meio líquido composto de: 499 partes água, 1 parte com 3g/l de extrato de carne, 10g/l de peptona e 5g/l de cloreto de sódio. **Explicação**: Esse meio de cultivo segue as especificações do protocolo;
7. Essas suspensões serão, posteriormente, utilizadas para inocular os corpos de prova;

A segunda etapa diz respeito a fabricação dos corpos de prova. Estes foram feitos em matriz de polipropileno, em uma rosca de injeção comum. A injeção foi realizada sem a presença deste pesquisador, como cortesia da empresa HT Polímeros. Foram utilizadas concentrações de 40ppm e 160 ppm de aditivo, além de um corpo de prova sem aditivo pra servir de referência. Foi utilizada uma concentração equivalente a de aditivo de Dimetil polissiloxano como surfactante (a conselho do responsável pela injeção na HT polímeros). Os ingredientes foram inseridos na rosca, e processados por 15 min, resultando em uma massa polimérica completamente derretida, que foi então, moldada em um corpo de prova retangular.

Em seguida, o seguinte procedimento foi executado para realização do teste:

1. Os corpos de prova foram recortados nas dimensões corretas (50x50 mm), conforme especificado pela norma, e mostrado pela imagem 30;
2. Para ser possível realizar os testes em triplicata, os corpos de prova aditivados com antimicrobianos tiveram que ser cortados pela metade, resultando em amostras com 25 x 50 mm;

Explicação: Na totalidade, foram obtidos 6 corpos de prova de polipropileno puro para controle, com 50x50mm (três para execução do teste com *E. Coli* e três para *S. Aureus*), 6 corpos de prova de de polipropileno com 40 ppm de aditivo em 25x50mm, 18 corpos de prova de de polipropileno com 160ppm de aditivo em 25x50mm;

3. A inoculação foi feita colocando os corpos de prova em placas de petri e inserindo-se 0.2ml da suspensão de bactérias na superfície destes corpos de prova;

Explicação: A inoculação foi dividida da seguinte forma: 3 corpos de prova de controle,

3 corpos de prova de 40ppm e 3 corpos de prova de 160ppm foram inoculados com *E. coli* e 3 corpos de prova de controle, 3 corpos de prova de 40ppm e 3 corpos de prova de 160ppm foram inoculados com *S. aureus*;

4. Os corpos de prova inoculados foram cobertos por um filme plástico, de 40x40mm no caso dos corpos de controle 40x20mm no caso dos corpos aditivados (que haviam sido cortados pela metade!). A figura 26 indica este esquema;

Explicação: O protocolo da ISO especifica que deve-se tomar cuidado para que, ao cobrir o inóculo com o filme plástico, não deixe-se vaziar suspensão de bactéria para fora do filme;

5. Um dos corpos de controle de *E. coli* e um de *S. aureus* foram separados dos outros;
6. Em seguida, as bactérias foram recuperadas destes dois corpos de prova retirando-se o filme e "lavando-se" a superfície do plástico com 10ml de uma solução composta de: 17g/l de peptona de caseína, 3g/l de peptona de soja, 5g/l de cloreto de sódio, 2,5g/l de disódio hydrogen phosphate, 2,5g/l de lícitina, 2,5g/l de glicose e 7g/l de um surfactante não iônico;

Explicação: A intenção, é recuperar as bactérias que foram inoculadas **imediatamente** para posteriormente fazer uma contagem. Dessa forma, é possível saber a quantidade de bactérias presente nas superfícies dos corpos de prova **no início** do ensaio e comparar com as que serão expostas ao polímero por um período prolongado de tempo;

7. Em seguida, 1ml dessa solução de lavagem foi removido de cada placa de petri e diluída em 9ml de solução salina, duas vezes seguidas;

Explicação: A intenção é obter inóculos de bactérias em três concentrações distintas (10^4 cfu/ml (suspensão de lavagem inicial), 10^3 cfu/ml e 10^2 cfu/ml);

8. 1ml de cada uma destas suspensões (nas três diluições feitas acima) foi plaqueado em uma placa de Petri contendo PCA, através da técnica "pour plate";

Explicação: O objetivo é contar quantas bactérias haviam no início do teste;

9. Estas placas foram incubadas por 24h em 37 °C, e o número de colônias formadas foi contado.

Explicação: Esse número representa a quantidade de bactérias no início do teste, e será utilizado como comparativo ao final do ensaio.

10. Os outros corpos de prova foram incubados, por 24 horas em 37 °C;

11. Em seguida, as bactérias foram recuperadas retirando-se o filme dos corpos de prova e "lavando-se" a superfície do plástico com 10ml de uma solução composta de: 17g/l de peptona de caseína, 3g/l de peptona de soja, 5g/l de cloreto de sódio, 2,5g/l de disódio hydrogen phosphate, 2,5g/l de lícitina, 2,5g/l de glicose e 7g/l de um surfactante não iônico;

Explicação: Após a incubação dos corpos de prova, a suspensão de bactérias "seca" na superfície do plástico. Durante a incubação, estas bactérias não se proliferaram tão pouco quanto o material for antimicrobiano, e tão muito quanto ele não for. O intento é

usar essa "solução de lavagem" para remover as bactérias da superfície do plástico testado, para posteriormente analisar o efeito que este teve nos micro-organismos;

- Em seguida, 1ml da solução de lavagem foi removido de cada placa de petri contendo o corpo de prova e as bactérias e diluída em 9ml de solução salina, duas vezes seguidas;

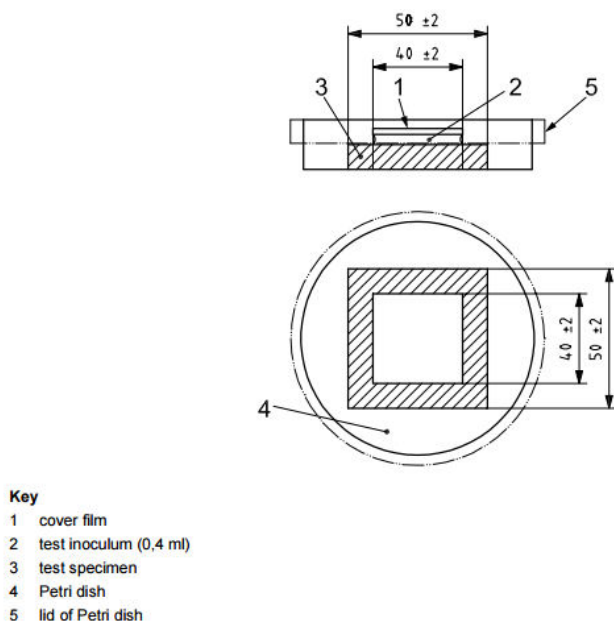
Explicação: A intenção é obter inóculos de bactérias em três concentrações distintas (10^4 cfu/ml (suspensão de lavagem inicial), 10^3 cfu/ml e 10^2 cfu/ml);

- 1ml de cada um destes inóculos (nas três diluições feitas acima) foi plaqueado em uma placa de Petri, através da técnica "pour plate";
- Estas placas foram incubadas por 24h em 37°C ;
- Depois da incubação, foi feita uma contagem do número de colônias formadas em cada placa.

Explicação: A comparação entre a contagem de colônias formadas pelas bactérias que ficaram expostas ao plástico de controle e pelas bactérias que ficaram expostas ao polímero tratado é indicativo da intensidade do efeito antimicrobiano do aditivo dentro do polipropileno.

- Recapitulando, após todas as contagens teremos três números: "A- Contagem de Colônias Formadas pelas bactérias extraídas **antes** de expostas a qualquer polímero, no começo do teste; "B- Contagem de Colônias Formadas pelas bactérias expostas ao polímero de controle; "C- Contagem de Colônias Formadas pelas bactérias expostas ao polímero tratado.

Figura 26 – Especificações dos corpos de prova



Fonte: ISO 221961

Durante a análise de resultados, a comparação entre as contagens de bactérias fornecerá a intensidade antimicrobiana do material.

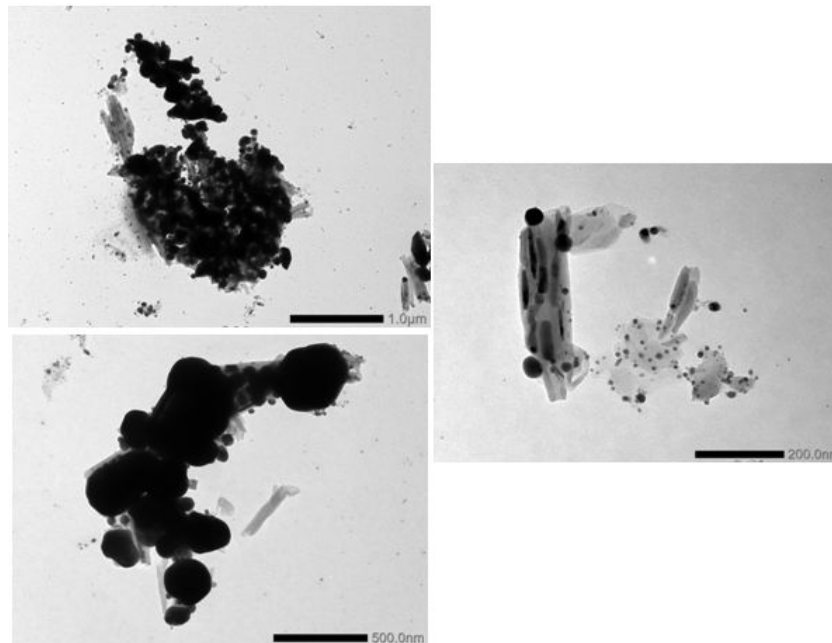
4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Este capítulo irá analisar os dados obtidos nos experimentos descritos na seção de metodologia.

4.1 SÍNTESE DO ADITIVO

O método de síntese de aditivo 1.0 mostrou-se um pouco problemático. A figura 27 mostra as três morfologias típicas de nanopartículas que foram obtidas neste procedimento.

Figura 27 – Microscopias de nanopartículas sintetizadas segundo o processo 1.0 descrito na metodologia.



Fonte: Autoria Própria

- **Tipo 1:** Uma quantidade desproporcionalmente alta de prata sintetizada no substrato, aglomerada;
- **Tipo 2:** Partículas cresceram no substrato, mas cresceram demais, o que resultou em nanogrãos de tamanho muito elevado, superando a barreira dos 500nm e por isso não podendo ser caracterizadas como nanopartículas;
- **Tipo 3:** Morfologia satisfatória. Substrato de haloisita carregado com nanopartículas em ordem de tamanho nanométrica.

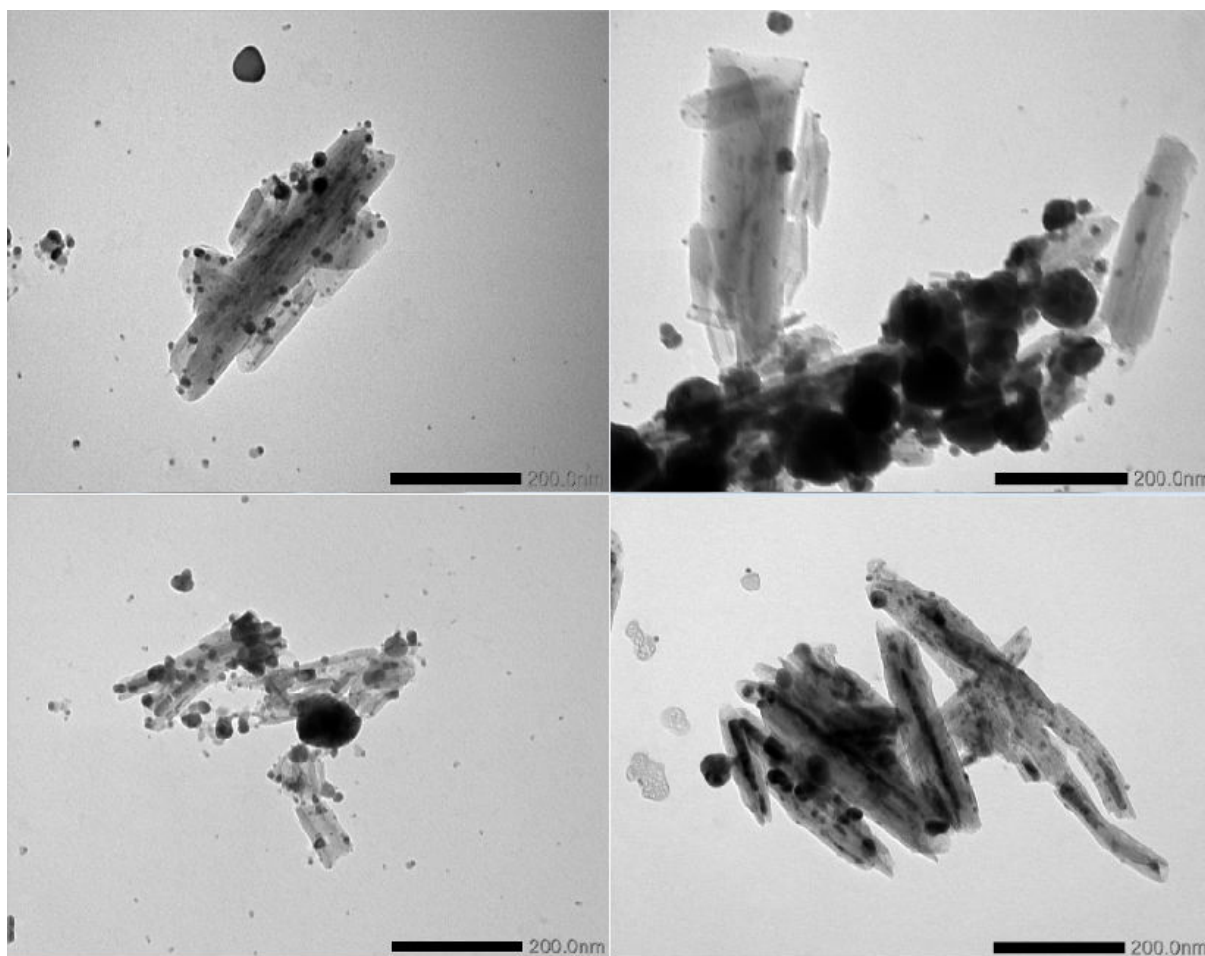
Embora as nanopartículas do *Tipo 3* tenham aspecto adequado, as do *Tipo 1* e *Tipo 2* estão ruins. No *tipo 1*, temos muita prata aglomerada, o que reduz a eficácia do material como antimicrobiano. No *tipo 2* temos grãos grandes demais. Em ambas as morfologias há muito mais prata do que no *tipo 3*.

A alta quantidade de prata nas nanopartículas dos tipos 1 e 2, seja na forma de aglomerados ou de grãos grandes demais, indica que talvez houvesse mais Acetato de Prata participando da reação do que aquele que é carregado nos nanotubos. Como isso seria possível? Foi levantada a hipótese de que durante a centrifugação da amostra Acetato de Prata estivesse precipitando-se junto com a haloisita carregada, liberando quantidades anômalas do metal no processo de redução.

Se há mais acetato de prata do que o que foi carregado diretamente na haloisita, isso significa que durante o processo de redução, será liberada uma quantidade de ions de prata disassociada da matriz de haloisita, e talvez até em quantidade muito grande para ser comportada diretamente na matriz. Esses ions de prata sobressalentes podem ser adsorvidos nos cristais de prata já nucleados na matriz de haloisita, contribuindo para um crescimento exacerbado dos grãos.

Para testar esta hipótese e tentar mitigar este problema foi desenvolvido o processo de síntese 2.0, em que foi tomado um cuidado especial com a dissolução do reagente durante a etapa de carregamento. O resultado está nas microscopias da figura 29.

Figura 28 – Nanopartículas sintetizadas de seguindo o método de síntese 2.0

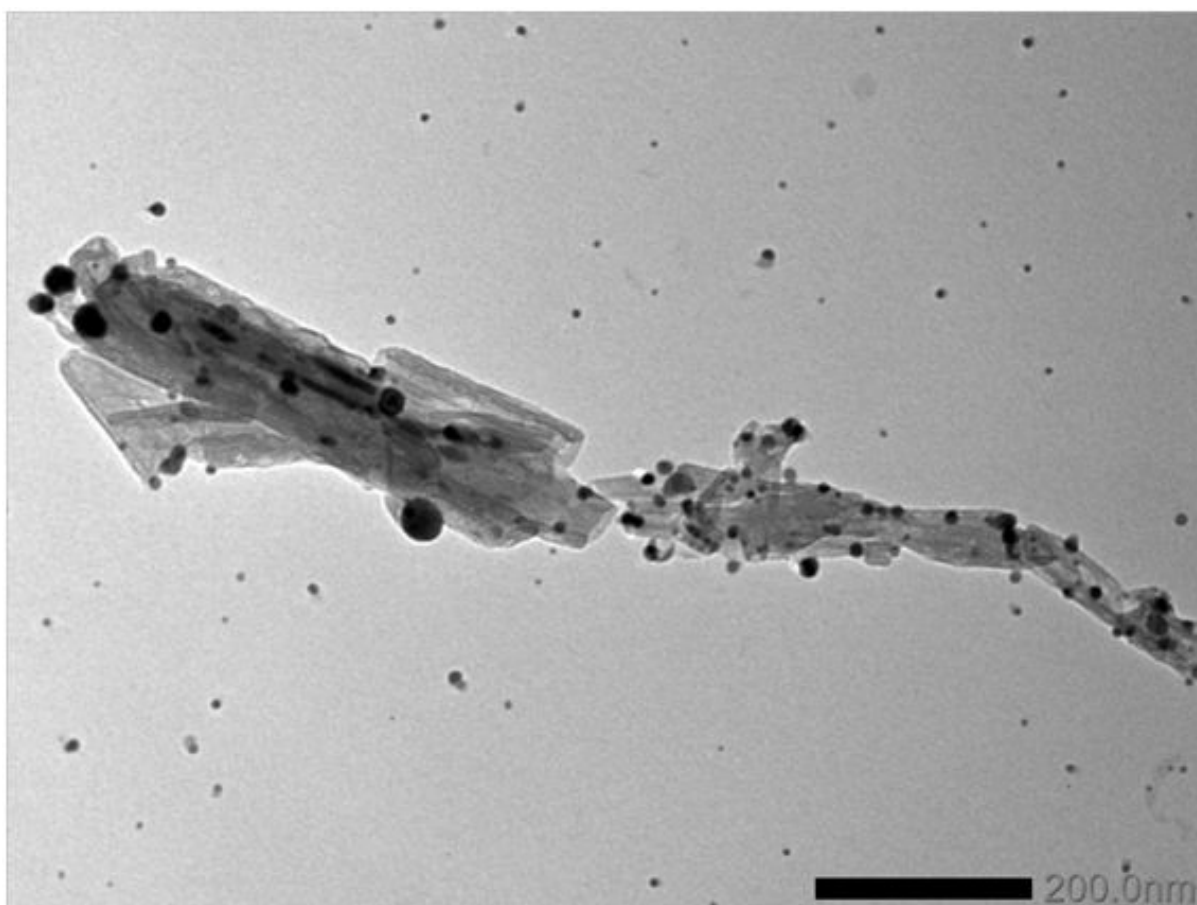


Fonte: autoria própria

É possível observar que o problema de aglomerados de prata foi resolvido, validando a hipótese anterior de que ele era oriundo de precipitados de reagente. Além disso, Não foram encontradas nanopartículas tão grandes quanto as do *tipo 2* da figura 31, de fato, todas as nanopartículas sintetizadas através deste método resultaram em tamanho inferior a 200nm. Isso confirma que a precipitação de reagentes influe não apenas na formação de prata aglomerada, mas também no tamanho de partícula obtido durante a redução.

Embora o problema de partículas fora de escala nanométrica tenha sido resolvido, pode-se observar que o tamanho dos grãos ainda esteve maior do que seria desejável, especialmente na microscopia superior direita da figura 28. Para investigar a possibilidade de de reduzir ainda mais o tamanho de grão, foi feito um ajuste nos parâmetros termodinâmicos através do processo de síntese 3.0. O resultado pode ser observado na microscopia da figura 30.

Figura 29 – Microscopia de nanopartículas sintetizadas segundo o processo 2.0

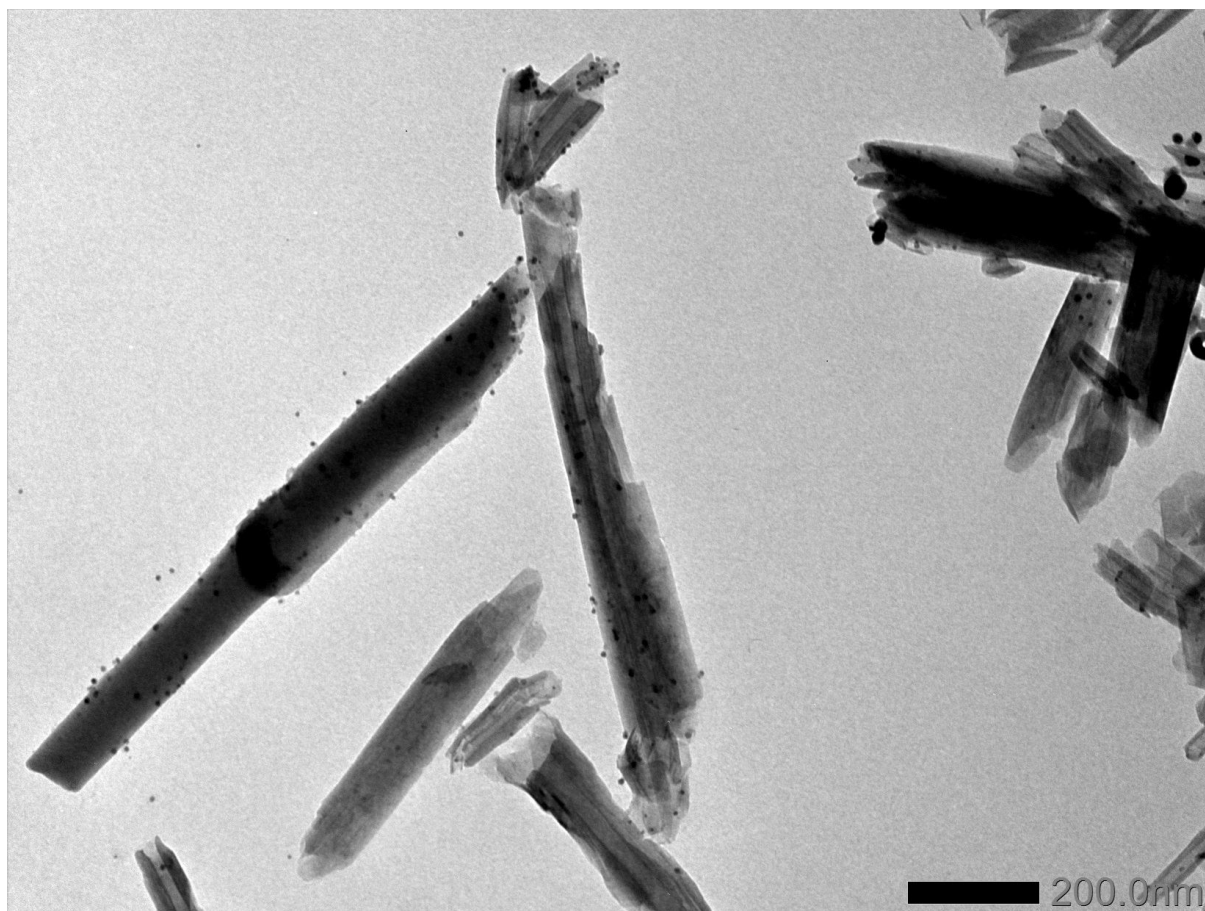


Fonte: autoria própria

Aparentemente, houve leve queda no tamanho das nanopartículas através do ajuste de parâmetros termodinâmicos. Isso provavelmente aconteceu porque a amostra não chegou a ser exposta a temperatura de crescimento de grão, conforme descrita por (LOGVINENKO et al., 2007).

É interessante observar também que a prata se formou tanto na superfície interior

Figura 30 – Microscopia de nanopartículas sintetizadas segundo o processo 3.0



Fonte: autoria própria

quanto na superfície exterior do nanotubo de haloisíta. Infelizmente, entretanto, apenas uma fração dos nanotubos foi carregado interiormente. Isso indica que o procedimento de carregamento a vácuo foi ao menos parcialmente bem sucedido. Como é possível observar pelas microscopia da figura 29, este carregamento vem acontecendo desde o processo de síntese 2.0 (atentar, especialmente, para a microscopia inferior direita). A figura 31 detalha esse fenômeno, em uma amostra sintetizada segundo o processo 3.0.

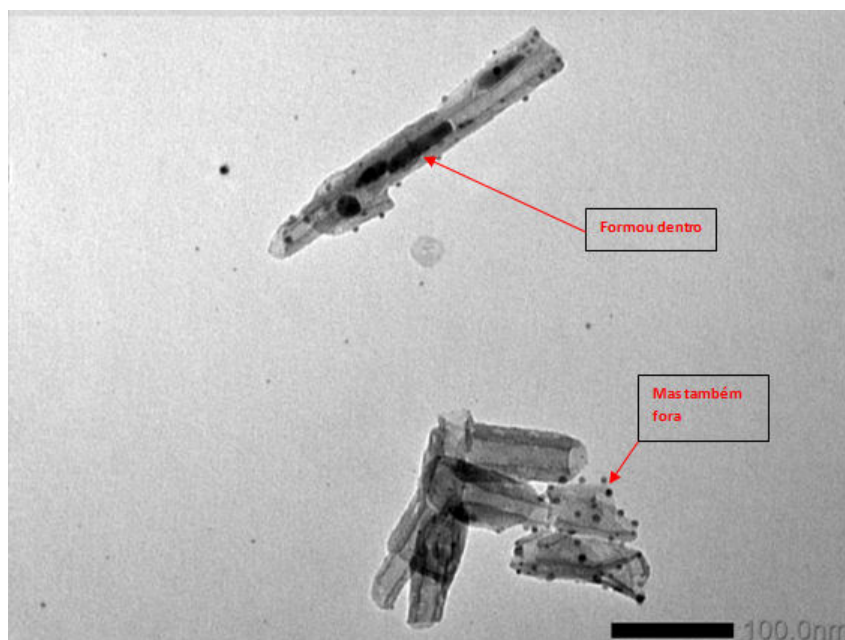
Finalmente, foi feita uma difratometria de raios-x (DRX) para analisar a composição do material obtido. As análises foram geradas utilizando-se o software Match! 3.ink.

As análises em DRX da amostra forneceram indícios concretos de que o material sintetizado na haloisíta de fato era um composto de prata, como indicam os picos padrões em vermelho (picos de difração previstos para prata metálica) quase que perfeitamente alinhados com a curva medida em azul (figura 32).

O índice de mérito gerado pelo programa de análise foi 0,8824, que é considerado alto índice de confiabilidade na análise.

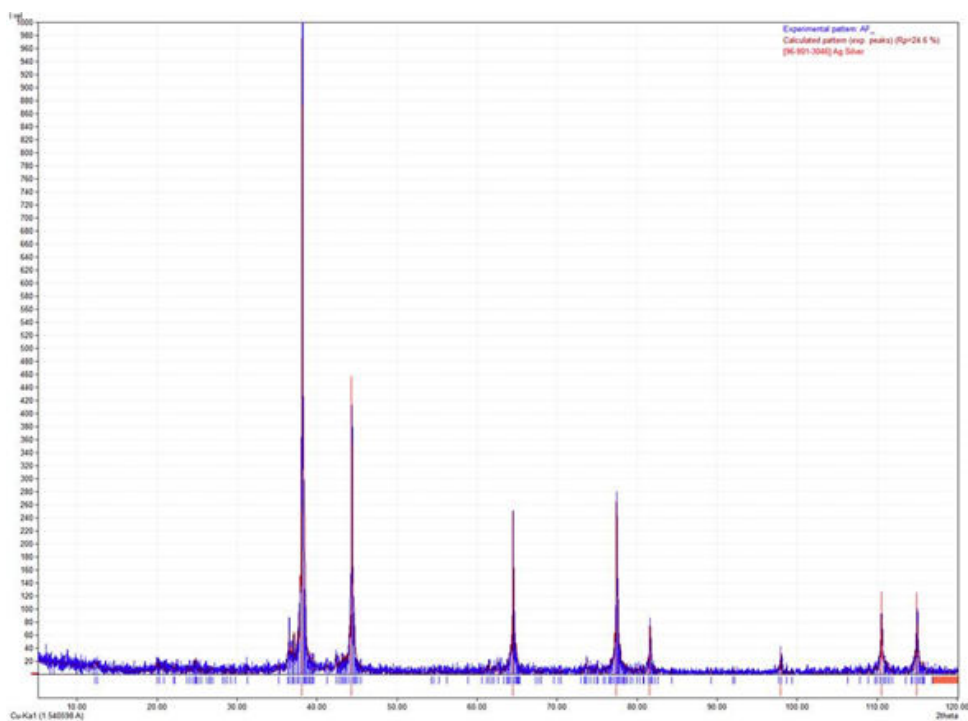
Entretanto, o padrão de difração da prata metálica é bastante semelhante ao do óxido de prata. Foi analisada a compatibilidade do padrão da amostra com o de óxido de prata, e

Figura 31 – Microscopia de nanopartículas sintetizadas segundo o processo 3.0, indicando formação interior e exterior de prata.



Fonte: autoria própria

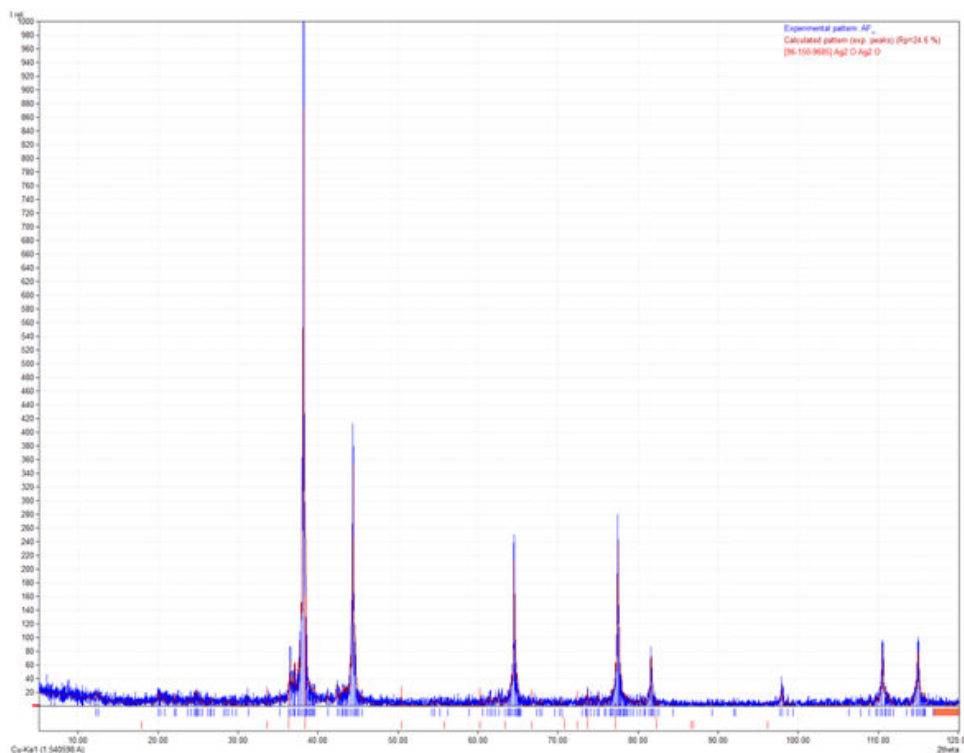
Figura 32 – Curva de difração de raios-x da amostra versus padrão e difração da prata metálica



Fonte: autoria própria

também foi obtido um índice de mérito bastante satisfatório (0,7085), embora existam falhas em alguns picos de difração, como em 50, 60 e 67 graus) (figura 33).

Figura 33 – Curva de difração de raios-x da amostra versus padrão e difração do óxido de prata



Fonte: autoria própria

Portanto, pelo padrão de difração semelhante entre os dois materiais, não é possível determinar com precisão se os grãos observados são de prata metálica, óxido de prata, ou uma mistura dos dois, e se uma mistura, quanto de cada substância está presente. É possível apenas especular que pelo índice de mérito mais alto em relação a prata metálica, esta deve estar presente na amostra em maior quantidade.

Os pontos chave que foram apreendidos neste experimento são:

- A precipitação do reagente junto com a hsaloisita na fase de separação desencadeia uma liberação de prata anômala no processo de redução, comprometendo a síntese;
- O controle dos parâmetros térmicos do forno, a fim de não permitir que a amostra atinja a temperatura de crescimento de grão, ajuda a controlar problemas de super-crescimento de grãos, e aparentemente reduz o tamanho médio das partículas obtidas. Seria interessante futuramente buscar métodos computacionais para quantificar o tamanho médio de grãos e obter medidas precisas da diminuição do tamanho, mas isso foge ao escopo deste trabalho.
- Há prata sendo formada no substrato, mas não foi possível determinar precisamente qual

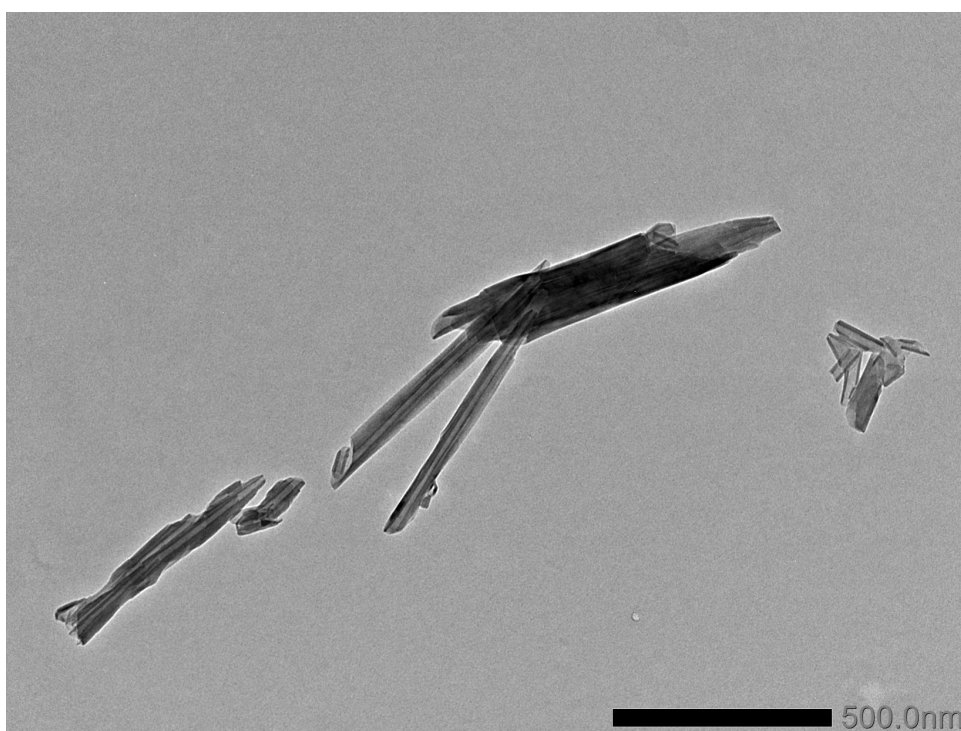
fração da prata está na forma de óxido ou qual a velocidade da oxidação.

4.2 TRATAMENTO DO SUBSTRATO

Conforme explicado na metodologia, foi feito um tratamento químico para alterar a composição cristalina da haloisita. A ideia é que o tratamento corresse a fase de silicato, expondo a de aluminol. As figuras 39 até 46 mostram imagens das microscopias das haloisitas extraídas do tratamento respectivamente nos dias 0, 2, 4, 6 e 8.

É possível ver que, interessantemente, conforme o tratamento progredia, as folhas de haloisita tendem a se "desenrolar". Isso é manifesto inicialmente por um aumento do lumem central dos nanotubos, seguido pelo completo desenrolamento das folhas.

Figura 34 – Haloisita antes do tratamento químico de NaOH



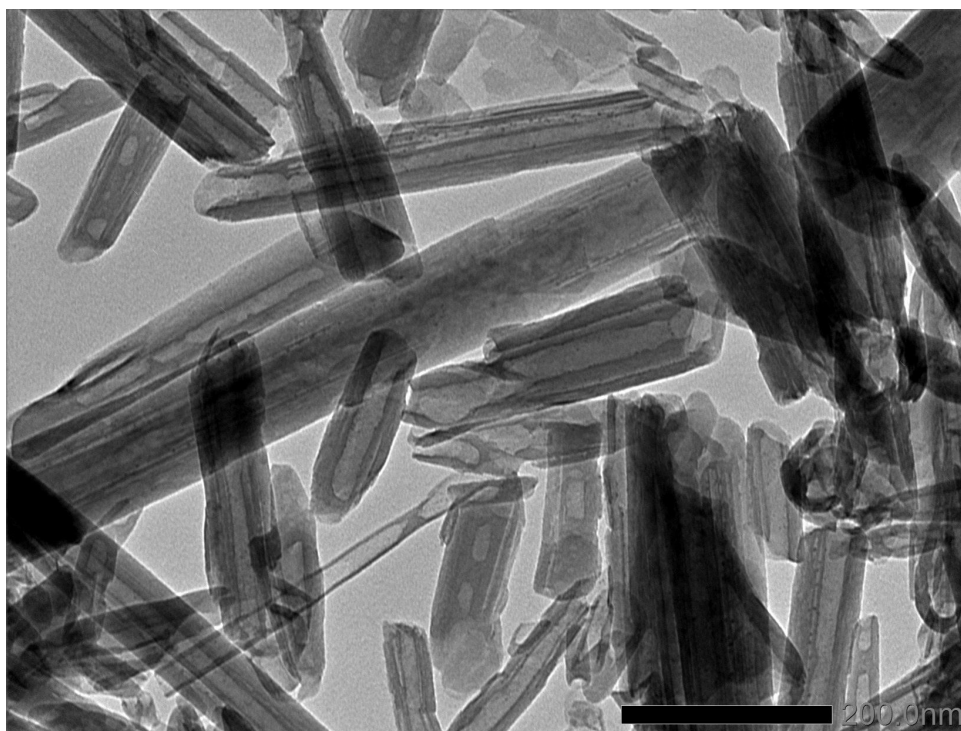
Fonte: autoria própria

Ao comparar a figura 34 com a 35 é possível observar um leve, embora perceptível, aumento do furo central da haloisita.

Pelas figuras 36 e 37 é possível observar que até o quarto dia, os nanotubos tiveram um aumento substancial da espessura do seu furo central, indicando que a folha de haloisita devia estar se "desenrolando".

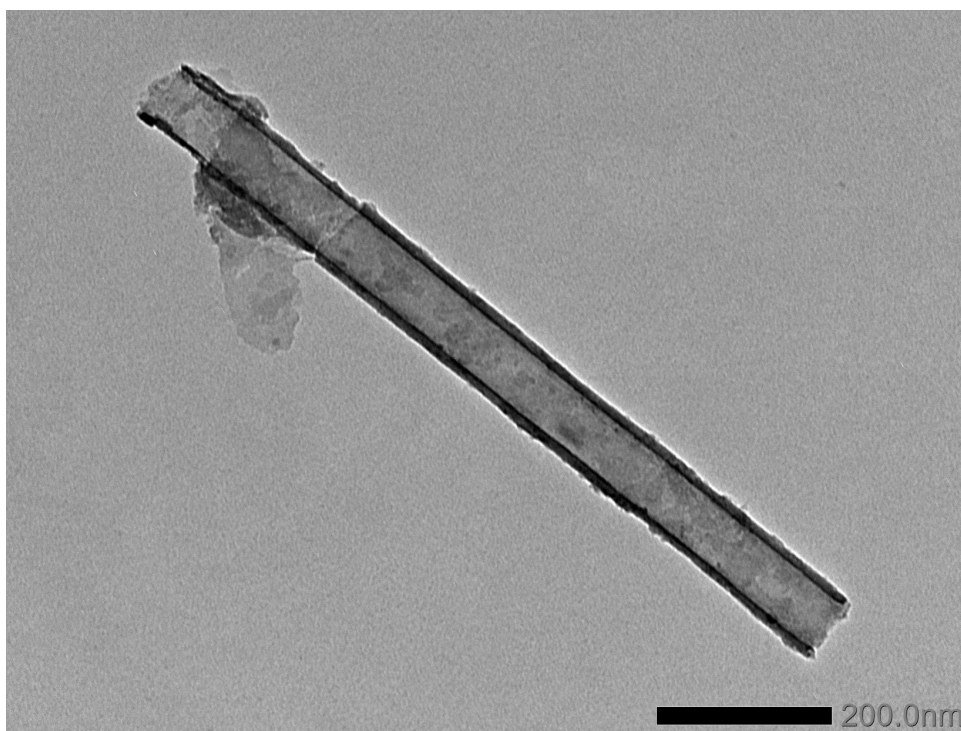
Nas fotos 38 e 39 é notável que parte dos nanotubos já se "desenrolou", e aparecendo nas microscopias como que uma "folha", junto com nanotubos de furo central expandidos. Isso indica que os seis dias de tratamentos não são suficientes para desenrolar parte das haloisitas, mas não todas. A amostra, então, está em uma fase de transição.

Figura 35 – Haloisita no segundo dia de tratamento com NaOH



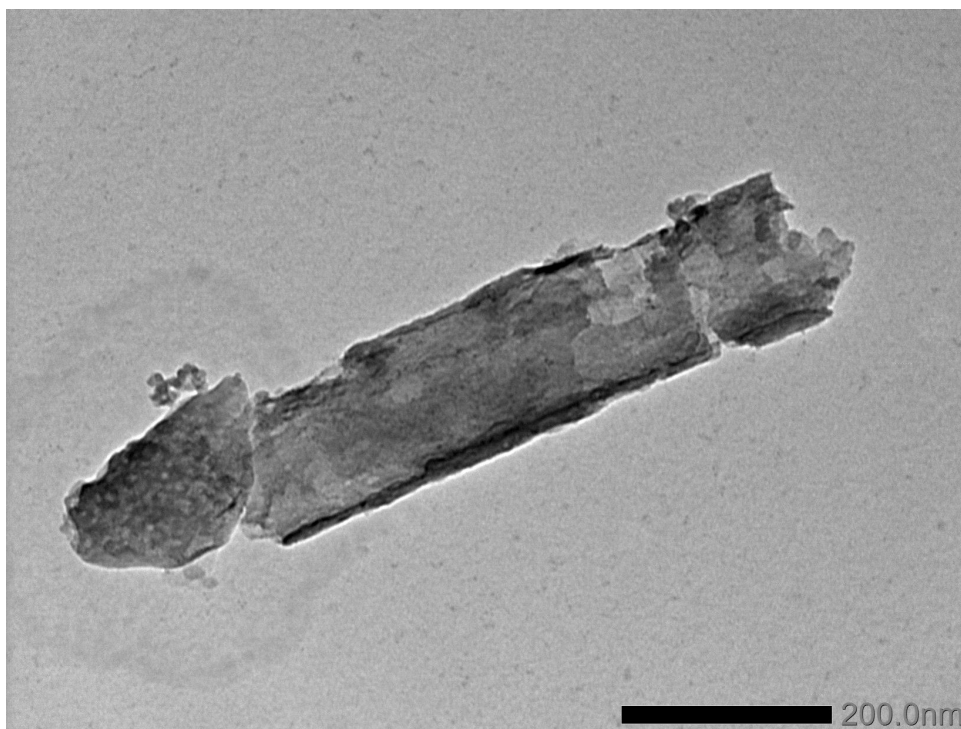
Fonte: autoria própria

Figura 36 – Haloisita no quarto dia de tratamento com NaOH



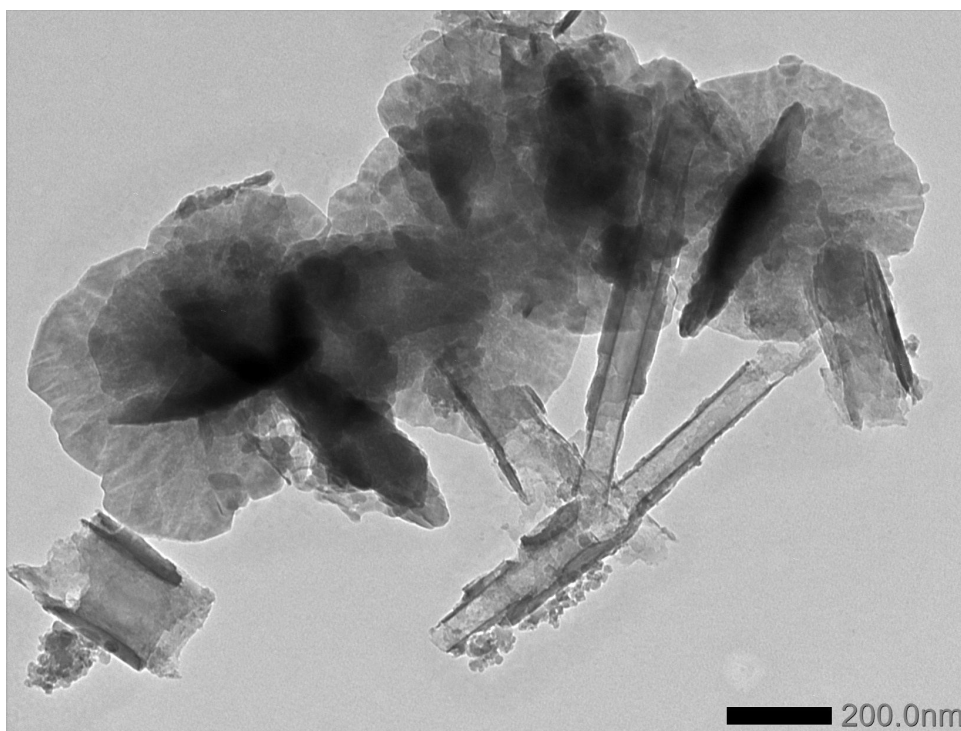
Fonte: autoria própria

Figura 37 – Haloisita no quarto dia de tratamento com NaOH



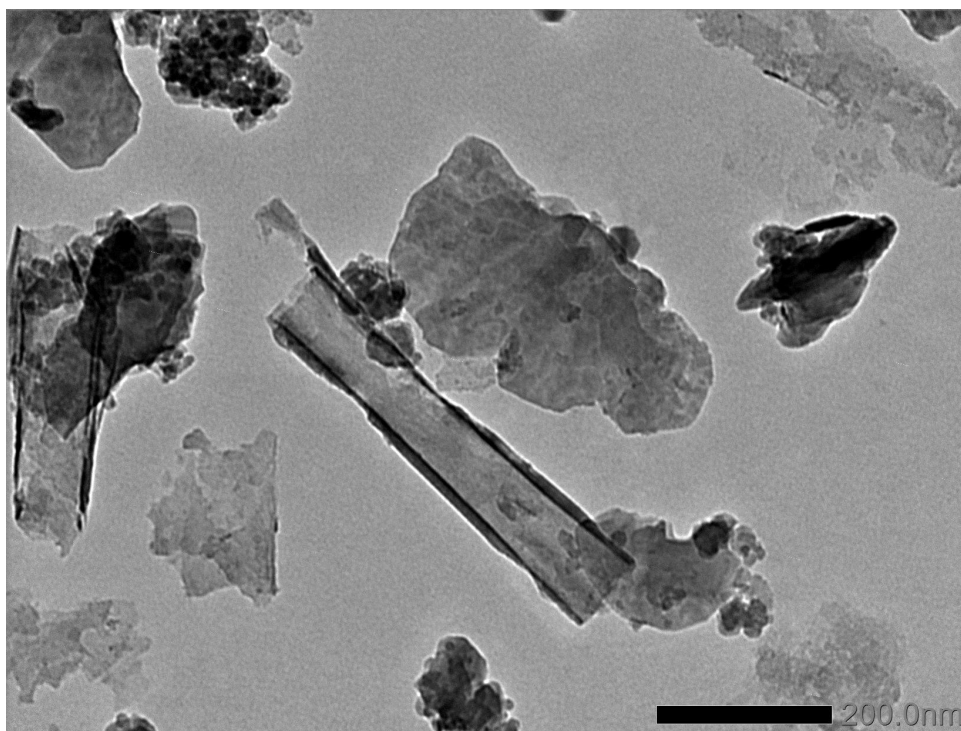
Fonte: autoria própria

Figura 38 – Haloisita no sexto dia de tratamento com NaOH



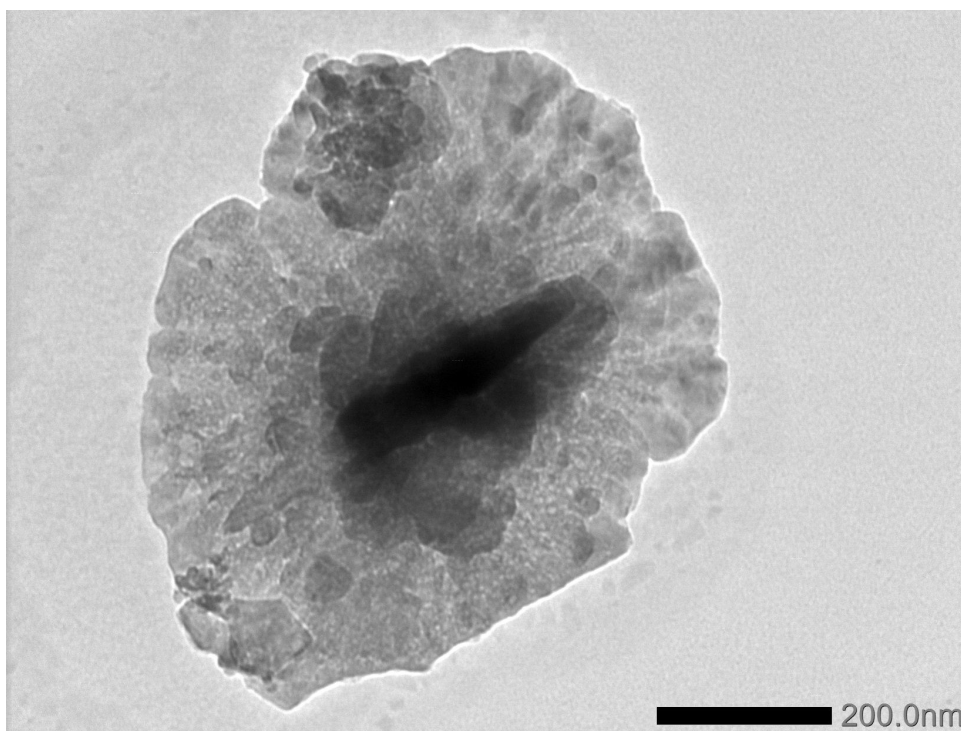
Fonte: autoria própria

Figura 39 – Haloisita no sexto dia de tratamento com NaOH



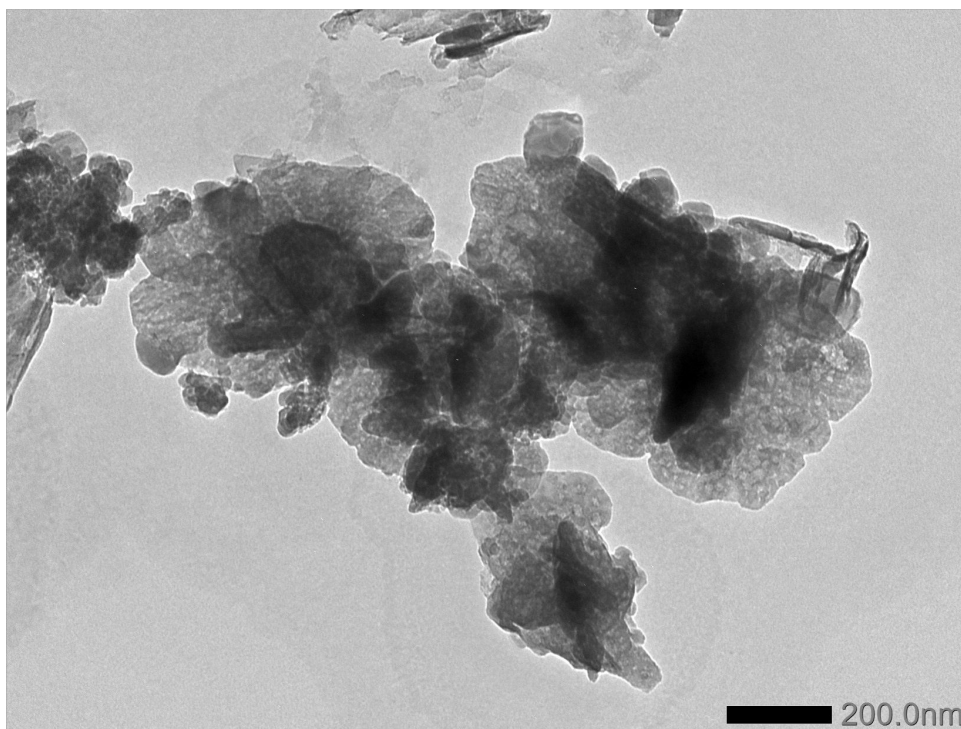
Fonte: autoria própria

Figura 40 – Haloisita no oitavo dia de tratamento com NaOH



Fonte: autoria própria

Figura 41 – Haloisita no oitavo dia de tratamento com NaOH



Fonte: autoria própria

Já no oitavo dia, praticamente todas as haloisitas estão desenroladas, e aparecem em formato de folha. Foi praticamente impossível encontrar nanotubos nesta amostra.

Como, entretanto, essa transformação afeta as propriedades da haloisita?

Como explanado na fundamentação teórica e na metodologia, a ideia era que o tratamento apenas gerasse defeitos superficiais na estrutura cristalina da haloisita, expondo a fase de aluminol para a superfície externa. Não era previsto que o nanotubo de haloisita fosse convertido em nanofolhas.

Por um lado, a conversão em nanofolhas pode ser interessante, visto que a razão (área de superfície)/(volume) nas nanofolhas é muito maior que nos nanotubos, o que aumenta a área de substrato disponível para nucleação de prata.

Além disso, ao desenrolar a folha de haloisita, a fase de aluminol é exposta ao meio externo de forma muito mais extensiva do que apenas através dos defeitos superficiais de nanotubo.

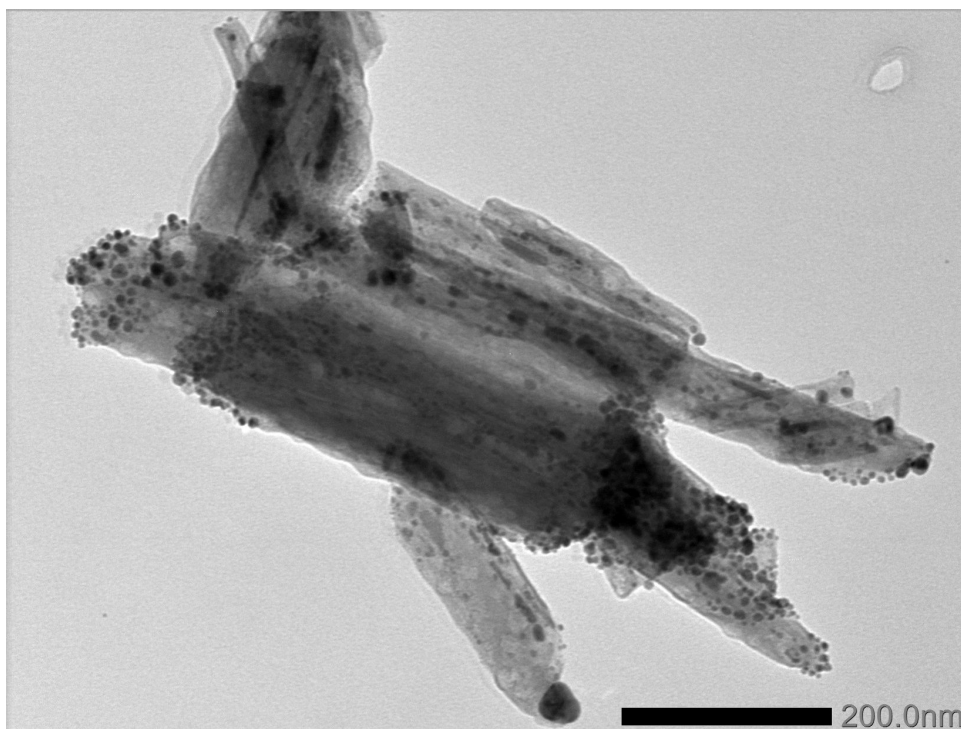
Para testar o efeito destas transformações, foram sintetizadas duas amostras. Uma com haloisita retirada no terceiro dia de tratamento, e outra com haloisita retirada no oitavo dia de tratamento.

As figuras 42 até 45 mostram microscopias da amostra sintetizada na haloisita tratada por 3 dias.

Pelas microscopias é possível observar as seguintes coisas:

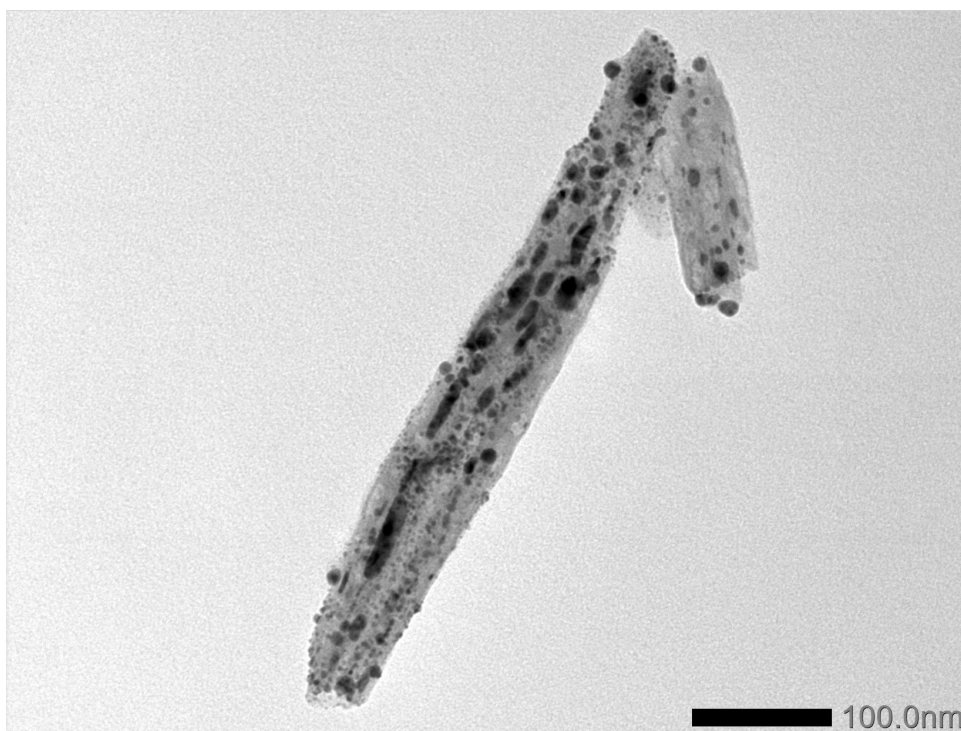
- Em geral a haloisita não "desenrolou";

Figura 42 – Nanopartículas de prata sintetizadas em haloisita tratada por três dias



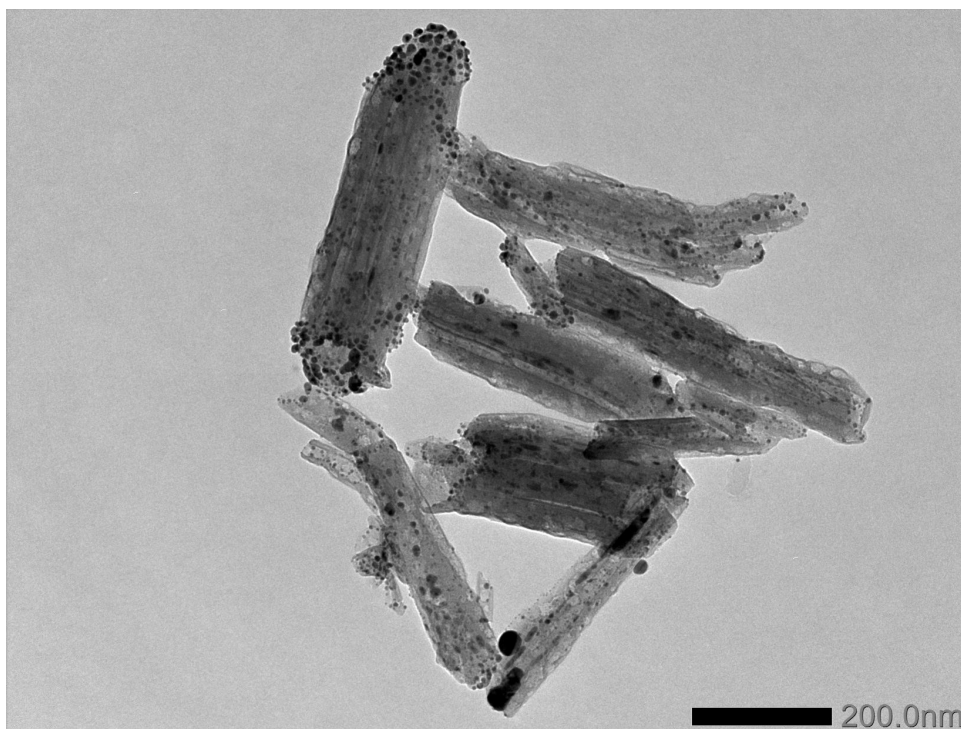
Fonte: autoria própria

Figura 43 – Nanopartículas de prata sintetizadas em haloisita tratada por três dias



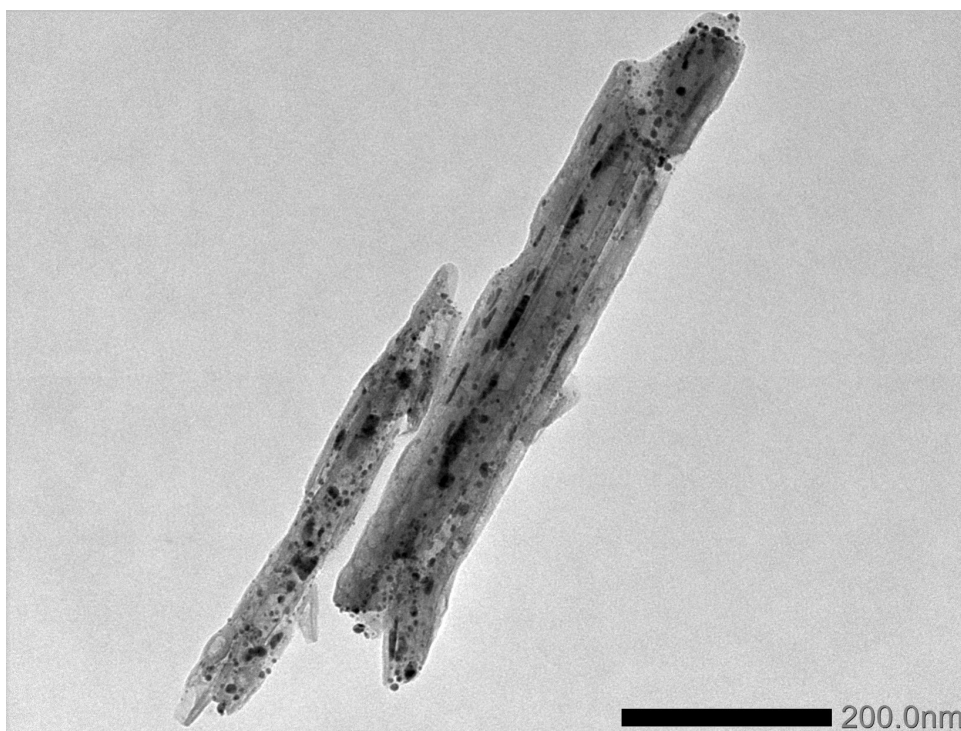
Fonte: autoria própria

Figura 44 – Nanopartículas de prata sintetizadas em haloisita tratada por três dias



Fonte: autoria própria

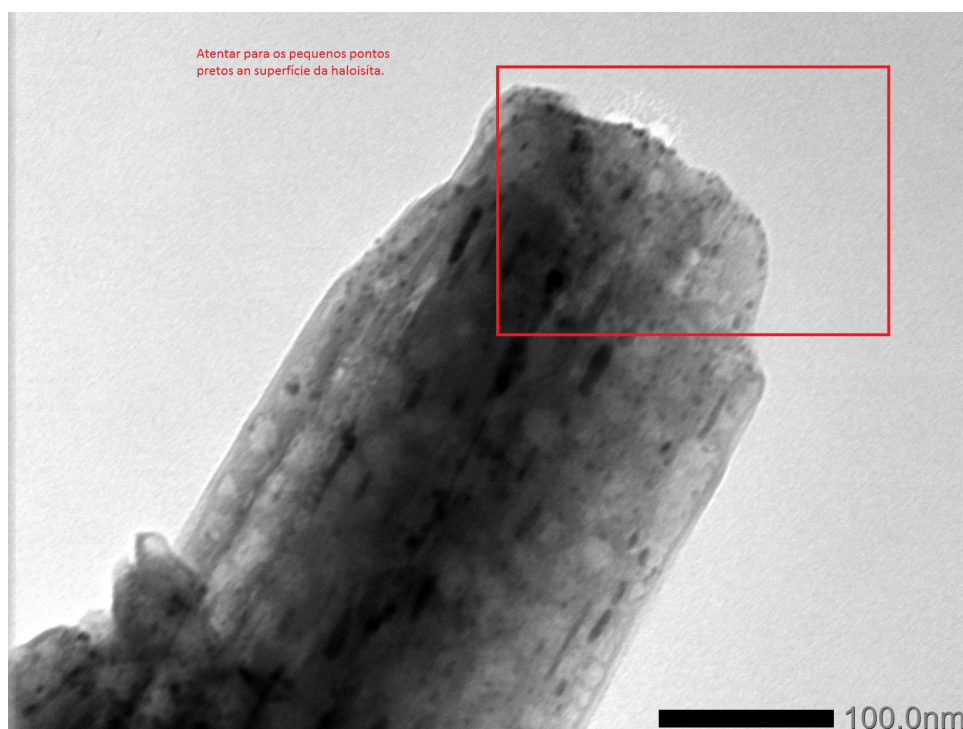
Figura 45 – Nanopartículas de prata sintetizadas em haloisita tratada por três dias



Fonte: autoria própria

- A quantidade de partículas de prata formadas na haloisita aumentou substancialmente quando em comparação com as do **experimento I**. Isso indica que, de fato, o tratamento químico foi capaz de gerar defeitos superficiais na estrutura cristalina da haloisita, expondo a fase de aluminol;
- A prata tendeu a formar-se nas extremidades dos nanotubos (o que é bastante visível nas figuras 43 e 45). Isso indica que provavelmente o tratamento químico inicia a corrosão de forma mais intensa nas extremidades a estrutura cristalina da haloisita, o que é esperável, visto que nessa região tem-se um "corte transversal" de toda a estrutura cristalina do material. Ali o NaOH pode, portanto, interagir com os átomos de Silício da estrutura mais facilmente, acelerando a corrosão (visto que no resto da estrutura cristalina o silício está atrás de uma fase de oxigênio, como pode ser visto pela figura 15).
- Aparentemente, grãos *muito* pequenos (na ordem de 2nm) estão sendo formados na superfície do material, como pode ser observado no detalhe da figura 47. Infelizmente, o microscópio utilizado não conseguia aumentar a resolução da imagem, sendo portanto impossível conseguir boas imagens para comprovar a extensão da formação destas minúsculas nanopartículas.

Figura 46 – Detalhamento nas nanopartículas na superfície da haloisita tratada por três dias antes do processo de síntese.

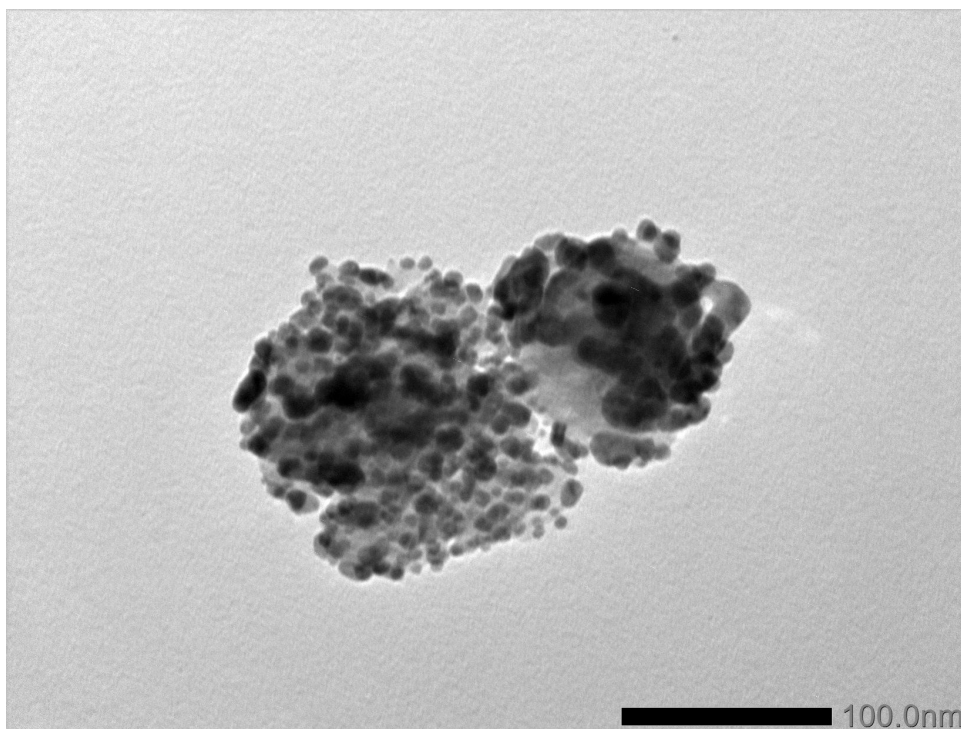


Fonte: autoria própria

Também foi feito um processo de síntese em substratos de haloisita tratados por 8 dias. Esse procedimento é ilustrado pelas microscopias das figuras 47 até 50.

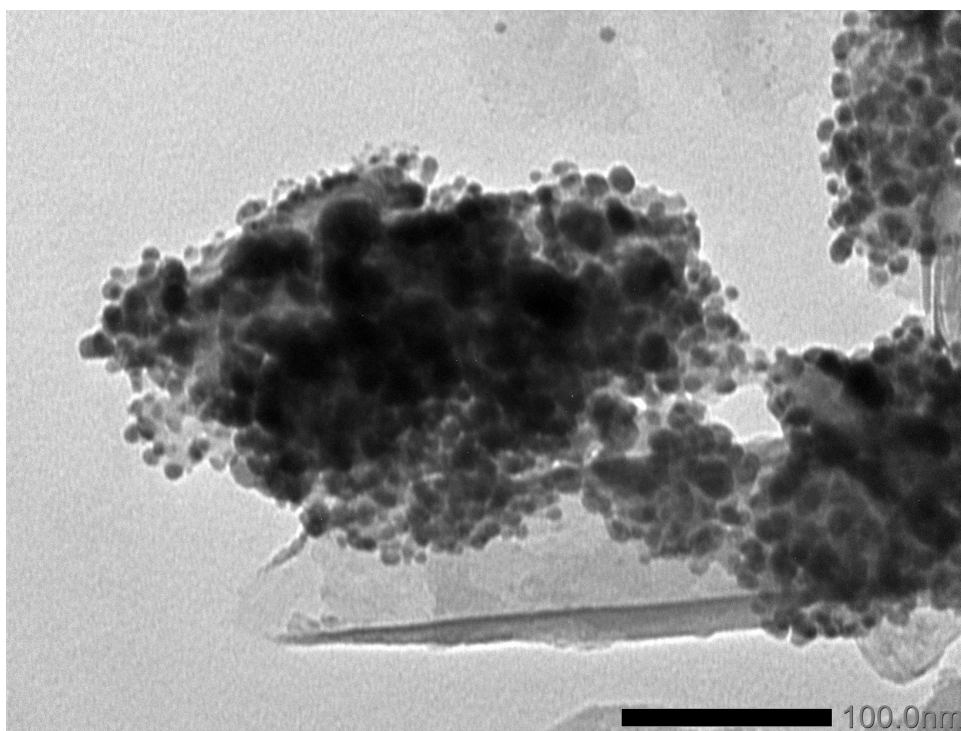
Analisando as microscopias é possível observar que:

Figura 47 – Microscopia síntese de prata em haloisita tratada por 8 dias



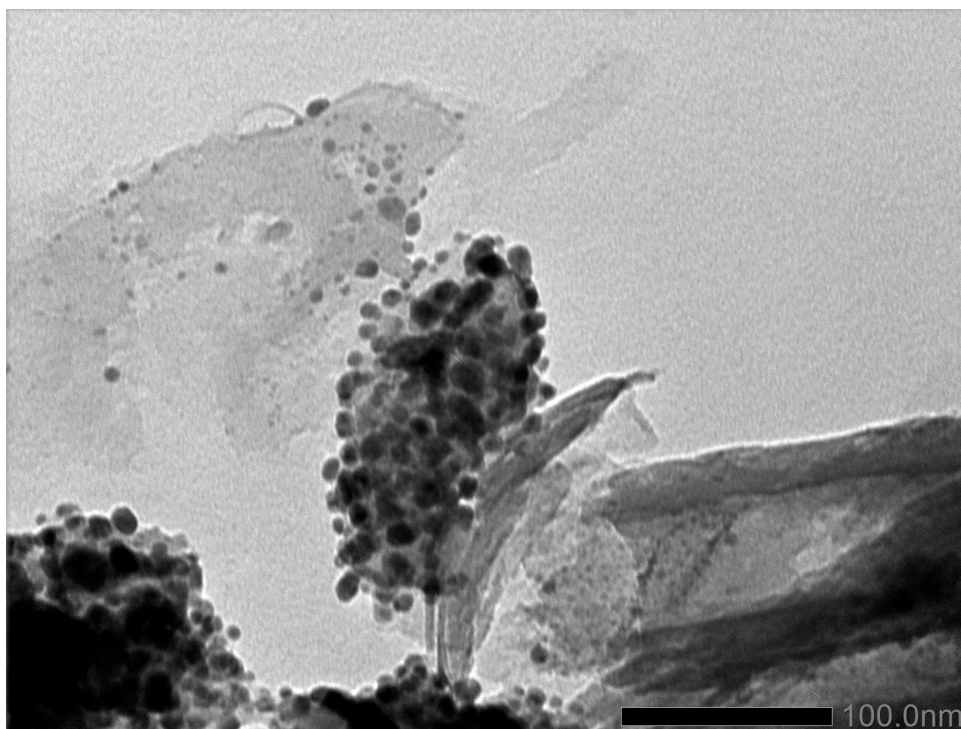
Fonte: autoria própria

Figura 48 – Microscopia síntese de prata em haloisita tratada por 8 dias



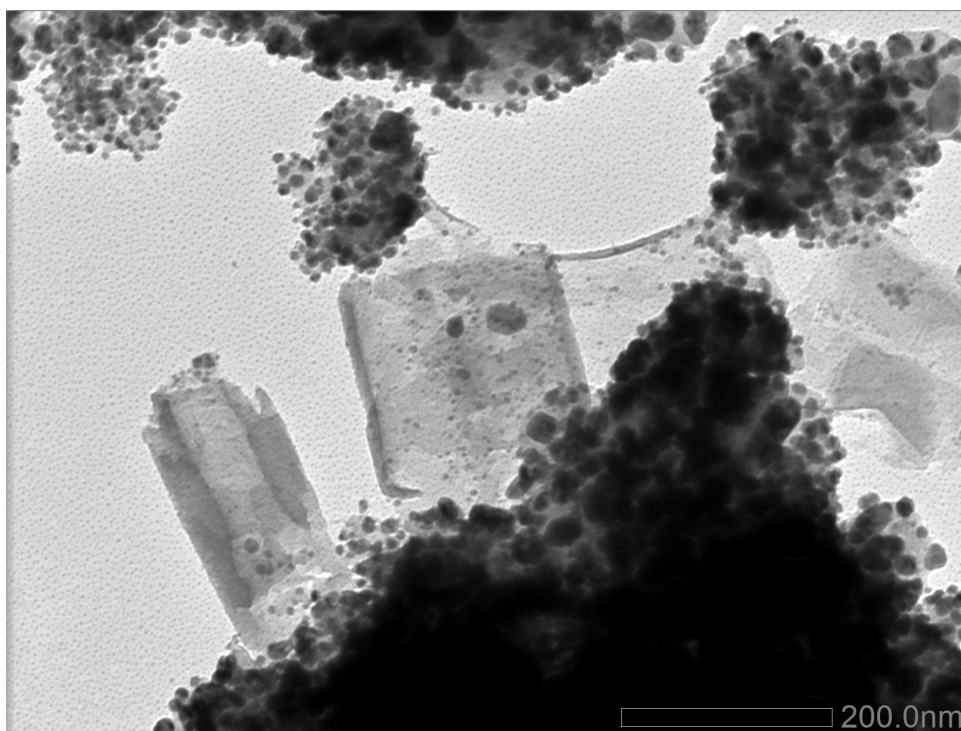
Fonte: autoria própria

Figura 49 – Microscopia síntese de prata em haloisita tratada por 8 dias



Fonte: autoria própria

Figura 50 – Microscopia síntese de prata em haloisita tratada por 8 dias



Fonte: autoria própria

- Não há nanotubos remanescentes na amostra;
- A quantidade de nanopartículas formada é substancialmente maior do que na amostra de haloisita tratada por três dias. Isso pode ser explicado pelo fato de que como o tratamento foi muito mais longo, e como a estrutura cristalina da haloisita foi "desenrolada" há um substrato de aluminol exposto muito maior do que nas amostras anteriores, provendo a prata de uma quantidade muito maior de pontos de nucleação para formar-se;
- Os grãos de prata são um pouco maiores do que na amostra tratada por três dias;

Dessa forma, fica evidente que tanto em três dias de tratamento, quanto com outros dias de tratamento, é possível alterar as propriedades da haloisita para mudar substancialmente a morfologia final do nanoaditivo obtido através do processo de síntese.

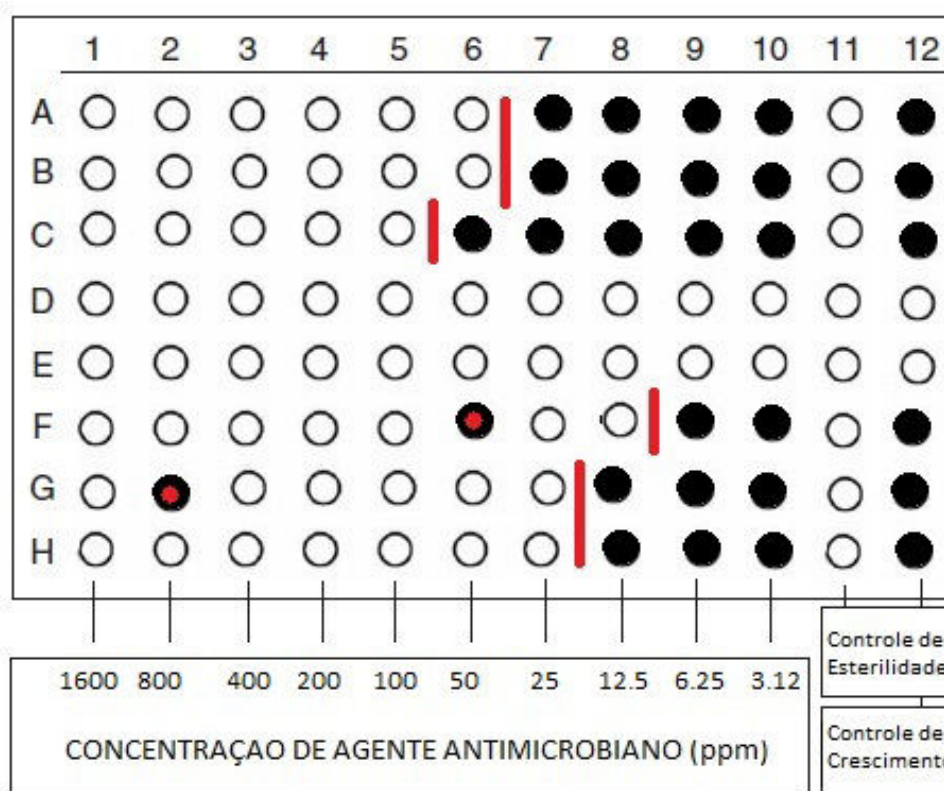
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana do aditivo foi mensurada de duas formas. A primeira, descrita na metodologia como experimento III, quantifica a atividade biocida do material em si mesmo. A segunda, executada através do experimento IV, descreve a atividade antimicrobiana do material dentro de uma matriz polimérica de polipropileno.

No teste de concentração mínima inibitória, a contagem de bactérias retiradas do poço de controle indicou que a quantidade original de micro-organismos era $3,3 \times 10^5$ para o *S. aureus* e $5,3 \times 10^5$ para o *E. coli*, conforme descrito pelo método.

A quantificação do efeito antimicrobiano é feito pela leitura da microplaca de poços. A figura 51 mostra um esquema desta placa, após incubação.

Figura 51 – Esquema da placa de poços. Os círculos pretos indicam poços onde houve crescimento



Fonte: autoria própria

Os poços das linhas A, B e C foram preenchidos com *S. aureus*, já os poços E, F e G, foram preenchidos com *E. coli*. Os poços 6F e 2G tiveram resultados incompatíveis com o resto da placa, portanto foram descartados.

Computando a média das triplicatas, foram obtidos MICs de 20,83 ppm para o *E. coli* e 66,67 ppm para o *S. aureus*.

A diferença de efeito inibitório está associada as diferenças morfológicas das duas espécies de bactérias. Sendo o *S. aureus* uma bactéria gram positiva, ela possui parede celular

Tabela 2 – Contagem de unidades formadoras de colônias

Bactéria	Tempo zero (cfu/ml)	controle	40 ppm	160 ppm
S. aureus	$1,74 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	não foi possível contar	$2,6 \times 10^3$
E. coli	$1,81 \times 10^5$	$5,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$

muito mais espessa. Isso torna a penetração de agentes externos muito mais difícil nesta célula, o que deve dificultar a ação do agente antimicrobiano.

O resultado do ensaio em matriz polimérica, entretanto, foi menos promissor.

A tabela 2 indica a contagem de unidades formadoras de colônias retiradas em cada etapa do ensaio.

É importante destacar que nas amostras tratadas:

- Não foi possível fazer a contagem no *E. coli* em polipropileno com 100ppm de polímero, pois as colônias cresceram caoticamente e sobrepostas;
- Uma das amostras de E. Coli em 25 ppm foi descartada por ter resultado inconsistente com as diluições e com as outras amostras da triplicata (amostra mais diluída estava com mais colônias);
- Como podemos ver comparando as tabelas 4 e 3, a quantidade de bactérias recuperadas nas amostras de controle incubada foi significativamente menor do que nas amostras que foram retiradas *antes da incubação*. Isso deve-se ao fato de que ao ficar em incubação, a suspensão de bactérias que estava presente na superfície do polímero secou consideravelmente.

Ao comparar as contagens das amostras de controle com das amostras tratadas, podemos obter o grau de inibição de proliferação de micro-organismos dos materiais tratados:

- **E. coli, 25 ppm de aditivo:** $2,6 \times 10^4$ para $2,6 \times 10^3$. **Inibição de 90%;**
- **E. coli, 100 ppm de aditivo:** não foi possível fazer a contagem;
- **E. coli, 25 ppm de aditivo:** $5,5 \times 10^3$ para $5,5 \times 10^3$. Não houve inibição;
- **E. coli, 100 ppm de aditivo:** $5,5 \times 10^3$ para $1,5 \times 10^3$. **Inibição de 72%;**

Dessa forma, fica constatado que de fato o material sintetizado nesta pesquisa possui efeito antimicrobiano, mas que ao ser introduzido em matriz polimérica este efeito é substancialmente reduzido.

5 CONCLUSÃO

Através desta pesquisa, foi possível concluir que o de fato a prata em escala nanométrica, sintetizada segundo os parâmetros aqui descritos, possui efeito antimicrobiano.

Entretanto, também foi constatado que o efeito antimicrobiano deste material caiu substancialmente quando inserido em uma matriz polimérica.

Também foi possível concluir que o ajuste de parâmetros termodinâmicos, durante a fase de formação de prata metálica pode ser utilizado para influenciar o tamanho dos grãos formados. Isso pode ser atingido evitando que a temperatura de processo atinja a temperatura de crescimento de grãos do metal.

Além disso, foi descoberto que de fato um tratamento químico com NaOH é capaz de favorecer o surgimento de pontos de nucleação para a prata na matriz de haloisita, o que é uma informação até então não encontrada na literatura científica. Também foi descoberto que a partir de certo ponto, este tratamento não apenas corrói a superfície externa do nanotubo, ele compromete tanto a estrutura cristalina a ponto de fazê-la se "desenrolar", formando uma espécie de "nano-folha".

5.1 TRABALHOS FUTUROS

Existem algumas pesquisas que podem ser executadas futuramente para ampliar a utilidade deste trabalho:

- Investigar o efeito antimicrobiano da nanop prata quando embebida em matrizes de outros materiais além do utilizado neste estudo;
- Investigar o efeito antimicrobiano da nanop prata em outros micro-organismos além do *E. coli* e do *S. aureus*;
- Estudar formas de melhorar a compatibilidade entre nanopartícula e matriz polimérica na qual ela é inserida. Possivelmente testando uma diversidade de agentes surfactantes durante o processo de incorporação;
- Estudar os mecanismos que levam a prata a ser ou não compatível com matrizes de outros materiais.

5.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pessoalmente, considero que este trabalho foi enriquecedor como mecanismo para fazer o autor trabalhar de forma mais formal com nanotecnologia.

A maior parte dos problemas encontrados pelo autor durante a execução da pesquisa foram relacionados com a falta de conhecimento nas áreas não correlacionadas a formação de engenheiro mecânico ou materiais, ou seja: microbiologia e química. Julgo ser fundamental a

busca de qualificação intelectual para compensar a formação deficiente em áreas distintas da de minha graduação.

Referências

- ABDULLAYEV, E. et al. Economically viable fabrication method of nanocomposite materials from linear arrays of metallic nanoparticles and nanorods on tubular halloysite templates. In: AMERICAN SOCIETY OF MECHANICAL ENGINEERS. **ASME 2012 International Mechanical Engineering Congress and Exposition**. [S.l.], 2012. p. 1033–1042. Citado na página [11](#).
- ABDULLAYEV, E. et al. Halloysite tubes as nanocontainers for anticorrosion coating with benzotriazole. **ACS applied materials & interfaces**, ACS Publications, v. 1, n. 7, p. 1437–1443, 2009. Citado na página [21](#).
- ABDULLAYEV, E. et al. Natural tubule clay template synthesis of silver nanorods for anti-bacterial composite coating. **ACS applied materials & interfaces**, ACS Publications, v. 3, n. 10, p. 4040–4046, 2011. Citado 5 vezes nas páginas [12](#), [13](#), [14](#), [18](#) e [24](#).
- AFONSO, M. d. S.; FILHO, J. M.; SANT'ANA, L. S. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*rosmarinus officinalis* L.). **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 35, n. 1, 2010. Citado 3 vezes nas páginas [9](#), [10](#) e [11](#).
- ALIG, I. et al. Establishment, morphology and properties of carbon nanotube networks in polymer melts. **Polymer**, Elsevier, v. 53, n. 1, p. 4–28, 2012. Citado na página [20](#).
- AZLIN-HASIM, S. et al. Effects of a combination of antimicrobial silver low density polyethylene nanocomposite films and modified atmosphere packaging on the shelf life of chicken breast fillets. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 4, p. 26–35, 2015. Citado na página [1](#).
- BART, J. C. **Additives in polymers: Industrial analysis and applications**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2005. Citado na página [21](#).
- BEYTH, N. et al. Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–16, 2015. Citado na página [3](#).
- BROWN, G. **Crystal structures of clay minerals and their X-ray identification**. [S.l.]: The Mineralogical Society of Great Britain and Ireland, 1982. v. 5. Citado 4 vezes nas páginas [15](#), [16](#), [17](#) e [18](#).
- CHEN, Y. et al. Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing ha coatings. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Springer, v. 19, n. 12, p. 3603–3609, 2008. Citado na página [4](#).
- CHURCHMAN, G. et al. Characteristics of fine pores in some halloysites. **Clay Minerals**, v. 30, n. 2, p. 89–98, 1995. Citado na página [11](#).
- DEFENSE, U. D. of. **U.S. Department of Defense-funded clinical trials, as presented at the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2008. Citado na página [2](#).

- DU, M.; GUO, B.; JIA, D. Newly emerging applications of halloysite nanotubes: a review. **Polymer International**, Wiley Online Library, v. 59, n. 5, p. 574–582, 2010. Citado na página 21.
- EDWARDS-JONES, V. Antimicrobial and barrier effects of silver against methicillin-resistant staphylococcus aureus. **Journal of Wound Care**, v. 15, n. 7, p. 285–290, 2006. Citado na página 2.
- FENG, Q. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on escherichia coli and staphylococcus aureus. **Journal of biomedical materials research**, New York: Wiley, 1967-c2002., v. 52, n. 4, p. 662–668, 2000. Citado 6 vezes nas páginas 5, 6, 7, 8, 9 e 10.
- FOOD; UN, A. O. of the. **Food production review, Brazil**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/counprof/brazil/brazil.>> Acesso em: 31 de Outubro de 2016. Citado na página 1.
- JOUSSEIN, E. et al. Halloysite clay minerals—a review. **Clay minerals**, v. 40, n. 4, p. 383–426, 2005. Citado na página 15.
- LANGSTON, R.; JENNE, E. Naoh dissolution of some oxide impurities from kaolins. **Clays and Clay Minerals**, v. 12, p. 633–647, 1964. Citado na página 28.
- LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, Nature Research, v. 11, n. 6, p. 371–384, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 14.
- LEVY, S. impacting on the problem of antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 25–30, 2002. Citado na página 1.
- LIU, J.; HURT, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. **Environmental science & technology**, ACS Publications, v. 44, n. 6, p. 2169–2175, 2010. Citado na página 9.
- LIU, M. et al. Interactions between halloysite nanotubes and 2, 5-bis (2-benzoxazolyl) thiophene and their effects on reinforcement of polypropylene/halloysite nanocomposites. **Nanotechnology**, IOP Publishing, v. 19, n. 20, p. 205709, 2008. Citado na página 22.
- LOGVINENKO, V. et al. Study of thermal decomposition of silver acetate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Akadémiai Kiadó, co-published with Springer Science+ Business Media BV, Formerly Kluwer Academic Publishers BV, v. 90, n. 3, p. 813–816, 2007. Citado 3 vezes nas páginas 26, 27 e 41.
- LUAN, J. et al. Synthesis techniques, properties and applications of polymer nanocomposites. **Current Organic Synthesis**, Bentham Science Publishers, v. 9, n. 1, p. 114–136, 2012. Citado na página 21.
- LVOV, Y. et al. Halloysite clay nanotubes for loading and sustained release of functional compounds. **Advanced Materials**, Wiley Online Library, v. 28, n. 6, p. 1227–1250, 2016. Citado 5 vezes nas páginas 11, 12, 13, 15 e 17.
- METAK, A. M. Effects of a combination of antimicrobial silver low density polyethylene nanocomposite films and modified atmosphere packaging on the shelf life of chicken breast fillets. **International Journal of Applied Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 26–35, 2015. Citado na página 1.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, IOP Publishing, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005. Citado na página 13.

MORONES-RAMIREZ, J.; WINKLER, J.; SPINA C.; COLLINS, J. S. Enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 190, p. 81, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 3 e 4.

NIU, J. Formation mechanisms of tubular structure of halloysite. 2016. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 18.

NOVER, L.; SCHARF, K.; NEUMANN, D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. **Molecular and Cellular Biology**, Am Soc Microbiol, v. 3, n. 9, p. 1648–1655, 1983. Citado 2 vezes nas páginas 5 e 6.

PATAI, S. **The chemistry of the thiol group**. [S.l.]: Wiley, 1974. Citado na página 9.

RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. Multifarious applications of halloysite nanotubes: a review. **Rev. Adv. Mater. Sci**, v. 30, p. 282–295, 2012. Citado na página 14.

REICH, S.; THOMSEN, C.; MAULTZSCH, J. **Carbon nanotubes: basic concepts and physical properties**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008. Citado na página 15.

RM, K.; JR, E.; CL, R. Estimating health care-associated infections and deaths in u.s. hospitals. **Public Health Reports**, v. 122, n. 2, p. 160–166, 2007. Citado na página 1.

ROUQUEROL, J. et al. Recommendations for the characterization of porous solids (technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 1739–1758, 1994. Citado na página 22.

SINGH, B. Why does halloysite roll?—a new model. **Clays and Clay Minerals**, Citeseer, v. 44, n. 2, p. 191–196, 1996. Citado na página 17.

TANG, X. et al. Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. **Critical reviews in food science and nutrition**, Taylor & Francis, v. 52, n. 5, p. 426–442, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.

VILELA, N. et al. **O peso da perda de alimentos para a sociedade: o caso das hortaliças**. 1. ed. São Paulo: Hortic. Bras, 2003. Citado na página 1.

WHITE, R. D.; BAVYKIN, D. V.; WALSH, F. C. The stability of halloysite nanotubes in acidic and alkaline aqueous suspensions. **Nanotechnology**, IOP Publishing, v. 23, n. 6, p. 065705, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 22.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (mic) of antimicrobial substances. **Nature protocols**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008. Citado na página 30.

WILKS, S.; MICHELS, H.; KEEVIL, C. The survival of escherichia coli o157 on a range of metal surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 445–454, 2005. Citado 2 vezes nas páginas 1 e 2.

XU, H. et al. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on escherichia coli o157: H7. **Biometals**, Springer, v. 25, n. 1, p. 45–53, 2012. Citado na página 11.

YUAN, P.; SOUTHON, P.; LIU, Z. Functionalization of halloysite clay nanotubes by grafting with aminopropyltriethoxysilane. **Journal of Physical Chemistry**, v. 112, n. 40, p. 15742–15751, 2008. Citado na página 3.

YUAN, P. et al. Functionalization of halloysite clay nanotubes by grafting with γ -aminopropyltriethoxysilane. **The Journal of Physical Chemistry C**, ACS Publications, v. 112, n. 40, p. 15742–15751, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 22.

YUAN, P.; TAN, D.; ANNABI-BERGAYA, F. Properties and applications of halloysite nanotubes: recent research advances and future prospects. **Applied Clay Science**, Elsevier, v. 112, p. 75–93, 2015. Citado 5 vezes nas páginas 14, 15, 17, 19 e 23.