



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE REVESTIMENTOS
ANTIMICROBIANOS DE SILICONE COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
(PDMS/AgNPs) PARA USO EM EMBALAGENS ATIVAS, UTENSÍLIOS E
EQUIPAMENTOS VIA *SOLUTION BLOW SPRAYING* – SBSp**

THIAGO PÉRICLES MARTINS FERREIRA

Orientadora: Profa. Dr^a. Amélia Severino Ferreira e Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros

João Pessoa –PB

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE REVESTIMENTOS
ANTIMICROBIANOS DE SILICONE COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
(PDMS/AgNPs) PARA USO EM EMBALAGENS ATIVAS, UTENSÍLIOS E
EQUIPAMENTOS VIA *SOLUTION BLOW SPRAYING* – SBSp**

THIAGO PÉRICLES MARTINS FERREIRA

Dissertação apresentada ao PPCEM
como requisitos para obtenção do título
de MESTRE em Ciências e Engenharia
de Materiais.

Orientadora: Profa. Dr^a. Amélia Severino Ferreira e Santos.

Co-orientador: Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros.

João Pessoa –PB

2015

F383o Ferreira, Thiago Pércles Martins.
Obtenção e caracterização de revestimentos
antimicrobianos de silicone com nanopartículas de prata
(PDMS/AgNPs) para uso em embalagens ativas, utensílios e
equipamentos via solution blow spraying - SBSp / Thiago Pércles
Martins Ferreira.- João Pessoa, 2015.
100f. : il.
Orientadora: Amélia Severino Ferreira e Santos
Coorientador: Eliton Souto de Medeiros
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT
1. Engenharia de materiais. 2. Nanocompósito. 3. Embalagem
ativa. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Prata (PDMS/SBSp).

*Dedico a você, Rafaella Ferreira, minha parceira
de vida, que sonha os meus sonhos, chora minhas
lágrimas, sorri minhas alegrias, transforma
minhas angústias em esperança, bem simples, TE
AMO!!!*

VITAE DO CANDIDATO

Engenharia de Alimentos, pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB (2008)

Obtenção e caracterização de revestimentos antimicrobianos de silicone com nanopartículas de prata (PDMS/AgNPs) para uso em embalagens ativas, utensílios e equipamentos via *Solution Blow Spraying* – SBSp

Por

Thiago Péricles Martins Ferreira

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal da Paraíba.

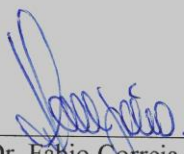


Prof.ª Dr.ª Amélia Severino Ferreira e Santos
Orientadora



Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros
Co-orientador

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
PPGO-CCS-UEPB



Prof.ª Dr.ª Itamara Farias Leite

PPCEM-CT-UEPB

João Pessoa, 27 de novembro de 2015.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por me fazer acreditar ser capaz de me transformar em algo melhor e buscar meus sonhos.

A minha mãe Maria Goreti e minha avó Ana Maria por me fazer um homem honrado, sonhador e íntegro.

A minha esposa Rafaella Ferreira e meu filho Klinsthyann Medeiros por embarcar nesta viagem chamada vida comigo, desafiando o dia a dia e nos levantando sempre, acreditando que tudo será diferente.

Aos meus amigos Marcos Antônio e Sebastião que sempre me motivaram nas horas mais angustiantes e me trouxeram palavras de motivação ao menor traço de tristeza.

Ao prof. José Marques (Zémarques) que sempre me inspirou e esteve em todos os instantes ao meu lado, acalmando meus pensamentos e trazendo boas vibrações.

Aos amigos Fagner Ferraz, José Idifrance e Rômulo Jorge que foram um exemplo para mim e acreditaram em meu potencial.

Aos professores Doutores Amélia Severino e Eliton Souto por me orientar, motivar, desafiar, ensinar, desconstruir, cobrar, enfim, me fazer enxergar e me apaixonar por este novo mundo da ciência e pesquisa dos materiais.

Ao professor Doutor Juliano Elvis por ajudar na concepção deste trabalho como também pelas sugestões e esclarecimentos durante a execução deste.

Aos professores Doutores Fábio Sampaio e Itamara Leite por participar da banca examinadora elevando o nível do trabalho e acrescentando com seus conhecimentos.

Aos técnicos André, Meyson, Rafael Caluete, Issac pelo pronto atendimento, sugestões, brincadeiras e paciência nos resultados das minhas caracterizações.

Ao amigo Bismarck Luiz pelos ensaios de ângulo de contato, sua disponibilidade e presteza.

A Roberta Bonan pelo ensaio microbianos prévios e pelas dicas e incentivos no início desta trajetória.

Aos amigos de LAMAB: Lucas Ricardo, Diego Valois, Tatiana Lima, Vínicius Dias, Amanda Carvalho pelas boas gargalhadas e descontração.

Aos amigos: Eudes Leonan, Neymara Nepomuceno, Rebeca Tibau, Adillys Marcelo, Igor Pimenta e Ítalo Souza por toda a ajuda nesta trajetória, desde os primeiros conceitos até o final.

A você Igor Pimenta, que com seu jeito brincalhão muitas vezes fez com que a minha cabeça quente resfriasse um pouquinho.

Ao Allan Albuquerque e a José Francisco do LABIAL por todos os ensaios microbianos realizados como também pelas sugestões e novas ideias para trabalhos futuros.

Ao professor Doutor Mauricio Pinheiro do ICT pelos testes de potencial zeta, como também a Luciana do IPT pela análise de ICP/AES.

Aos amigos de Jornada Robson Aquino e Fabiana Kelly que juntos com Igor Pimenta enfrentamos muitos desafios para a conclusão deste mestrado.

A Neto, secretário do PPCEM, por ser sempre solícito e atencioso em todos os problemas que ocorreram nesta trajetória.

Obrigado a todos os professores que me ajudaram a compreender e consolidar os conhecimentos adquiridos neste mestrado.

A CAPES e ao CNPQ por financiar os experimentos e fornecer a bolsa de estudos a qual fui contemplado.

Não poderia deixar de lembrar e agradecer a todos que fizeram a hora do café na copa do LSR o momento marcante deste mestrado, pois foi lá aonde sugeriram as melhores resoluções para os mais diversos problemas enfrentados, além das ótimas conversas e brincadeiras, valeu cafezinho sem você a ciência sofreria.

E a todos que de uma forma ou de outra colaboraram com esta etapa da minha vida, meus sinceros agradecimentos e muita paz na vida de todos.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim. ”

(Francisco Cândido Xavier)

Lista de Abreviaturas

AFM – Microscopia de força atômica

Ag⁺ - íon de prata

AgNPs – Nanopartículas de prata

CMC – Carboximetil celulose

DLS – Espalhamento dinâmico da luz

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

ICP/AES - Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PDMS – Poli-dimetil siloxano

SBS – *Solution blow spinning* (fiação por sopro em solução)

SBSp – *Solution blow spraying* (pulverização por sopro em solução)

UV-Vis - Espectroscopia no ultravioleta visível

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática da atividade antimicrobiana da prata.....	17
Figura 2 – Esquema de preparação de nanocompósitos metálicos: a) in situ, b) Ex situ.	19
Figura 3 – Estrutura do PDMS.	21
Figura 4- Fluxograma esquemático das atividades experimentais desenvolvidas	31
Figura 5- Cultivo com <i>swab</i> das bactérias em meio Mueller Hinton ágar.....	34
Figura 6 - Pipetagem das nanopartículas testadas na técnica de difusão em ágar	34
Figura 7– Sistema de eclosão de cistos de <i>Artemia salina</i> e coleta dos náuplios	36
Figura 8– Sistema do Solution Blow Spraying utilizado para a produção do revestimento de PDMS	38
Figura 9 – Preparação para o ensaio de ângulo de contato.	43
Figura 10 – Placas de culturas utilizadas no ensaio.	44
Figura 11– Microplacas utilizadas para realização da fluorescência.....	45
Figura 12– Espectro de UV-Vis das AgNPs obtida pela rota de TURKEVICH.....	46
Figura 13- Resultados do teste de difusão em ágar das AgNPs para <i>S.aureus</i> (a e b) e <i>E.coli</i> (c e d)	48
Figura 14– Micrografia dos revestimentos de silicone WD ₂₀ RPM ₂₅₀ (a-b), WD ₂₅ RMP ₅₀₀ (c-d) e WD ₂₀ RPM ₁₀₀₀ (e-h) aplicado sobre a lâmina de vidro por SBSp.....	50
Figura 15– Isoterma de cura do PDMS.....	52
Figura 16 –Micrografia de MEV das amostras: a) t_0 , b) $t_{1/4}$, c) $t_{1/2}$, d) $t_{3/4}$, e) t_f e f) t_{multi} .	53
Figura 17 - Mapeamento da prata nas amostras obtido por EDS: a) t_0 , b) $t_{1/4}$, c) $t_{1/2}$, d) $t_{3/4}$, e) t_f e f) t_{multi}	54
Figura 18 - Imagens da área 2D e 3D por AFM da amostra: a) PDMS, b) t_0 , c) $t_{1/4}$, d) $t_{1/2}$, e) $t_{3/4}$, f) t_f e g) t_{multi} . (30 x 30 μm^2 área escaneada)	57
Figura 19- Gráfico do ângulo de contato das amostras em função do método e do tempo de início da aplicação das AgNPs.....	60
Figura 20 – Imagens do formato da gota durante a determinação de ângulo de contato dos revestimentos: a) PDMS b) t_0 c) $t_{1/4}$ d) $t_{1/2}$ e) $t_{3/4}$; f) t_f ; e g) t_{multi}	61
Figura 21 - Gráfico do ângulo de contato das amostras de PDMS puro em função do método e do tempo de início da aplicação da solução H ₂ O: CMC.....	62

Figura 22-Imagens do formato da gota durante a determinação de ângulo de contato dos revestimentos: a) PDMS b) PDMS- t_0 c) PDMS- $t_{1/4}$ d) PDMS- $t_{1/2}$ e) PDMS- $t_{3/4}$; f) PDMS- t_f ; e g) PDMS- t_{multi}	64
Figura 23 - Gráfico dos nº de biofilmes aderidos nas amostras.	65
Figura 24 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas de AgNPs.....	81

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros do SBSp testados na produção do revestimento de PDMS	37
Tabela 2 - Tempos escolhidos para início da deposição das AgNPs	40
Tabela 3 - Resultados da toxicidade para Artemia salina nas concentrações propostas....	49
Tabela 4 - Teor de prata nos revestimentos.....	56
Tabela 5 - Valores do ângulo de contato para os revestimentos de PDMS puro e PMDS/AgNPs preparados pelos métodos de aplicação única e múltiplas	59
Tabela 6 - Valores do ângulo de contato para os revestimentos de PDMS puro e PMDS aspergido com solução aquosa de CMC preparados pelos métodos de aplicação única e múltiplas	62
Tabela 7 - Média dos resultados obtidos pelo teste e desvio padrão	65

Resumo

Neste trabalho, foram obtidos revestimentos de poli(dimetil siloxano) com nanopartículas de prata (PDMS/AgNPs), produzidos pelo método de *solution blow spraying* (SBSp), uma adaptação da técnica de *Solution Blow Spinning* (SBS), com potencial para aplicação em embalagens e revestimentos de equipamentos na indústria de alimentos. AgNPs, sintetizadas pelo método de Turkevich, foram depositadas sobre filmes de PDMS pela técnica de SBSp e a atividade antimicrobiana testada contra os micro-organismos *S. aureus* e *E. coli* (ATCC). Os resultados de espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostraram que as AgNPs tiveram tamanho médio de 170,5 nm. Além disso, essas nanopartículas apresentaram atividade antimicrobiana, de acordo com o teste de disco de difusão, e foram consideradas atóxicas pelo teste de toxicidade frente a *Artemia salina*. As AgNPs foram depositadas sobre os filmes de PDMS em vários intervalos de cura dessa resina. Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram observar que os filmes formam revestimentos uniformes com espessura de $1,62 \pm 0,2\mu\text{m}$ e que as partículas estão uniformemente distribuídas pela superfície do filme (MEV-EDS) com concentrações variando de acordo com o tempo e número de deposições das AgNPs. Estes resultados também foram corroborados por microscopia de força atômica (AFM) e espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP/AES). Quando a aplicação das AgNPs foi realizada no final ou após decorrer $\frac{3}{4}$ do tempo de cura do PDMS, houve uma redução mais significativa na adesão celular e formação de biofilme uniespécie para *S. aureus* e *E. coli* (ATCC). Essa redução também foi melhorada quando múltiplas aplicações de AgNPs foram feitas. Uma vez que todos os revestimentos apresentaram atividade antimicrobiana, sua utilização na indústria de alimentos pode ser considerada promissora.

Palavras-chaves: nanocompósito, embalagem ativa, antimicrobiano, prata, PDMS, SBSp.

Abstract

In this work, poly coatings were obtained (dimethyl siloxane) with silver nanoparticles (PDMS / AgNPs), produced by the method of *solution blow spraying* (SBSp), a technique of adapting *Solution Blow Spinning* (SBS), with potential for application in packaging and equipment coatings in the food industry. AgNPs synthesized by Turkevich method were deposited on the PDMS film SBSp technique and tested antimicrobial activity against microorganisms *S. aureus* and *E. coli* (ATCC). The results of dynamic light scattering (DLS) showed that AgNPs had an average size of 170,5 nm. In addition, these nanoparticles show antimicrobial activity, in accordance with the disk diffusion test, and were considered for nontoxic toxicity tests against *Artemia salina*. The AgNPs were deposited on the PDMS films at various intervals cure this resin. Scanning electron microscopy (SEM) allowed the observation that the films form uniform coatings with a thickness of $1,62 \pm 0,2\mu\text{m}$ and the particles are evenly distributed over the surface of the film (SEM-EDS) with concentrations varying according to the time and number of depositions of AgNPs. These results were also corroborated by atomic force microscopy (AFM) and atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP / AES). When the application of AgNPs was performed at the end or after the course of $\frac{3}{4}$ PDMS curing time, there was a greater reduction in cell adhesion and biofilm formation uniespécie for *S. aureus* and *E. coli* (ATCC). This reduction has also been improved when multiple applications AgNPs were made. Once all coatings showed antimicrobial activity, their use in food industry can be considered promising.

Keywords: *nanocomposite, active packaging, antimicrobial, silver, PDMS, SBSp.*

Sumário

Agradecimentos	iii
Lista de Abreviaturas	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1.INTRODUÇÃO	1
2. ASPECTOS TEÓRICOS	3
2.1 . Nanotecnologia – Aspectos Gerais.....	3
2.2 Embalagens de Alimentos.....	6
2.2.1 Embalagens antimicrobianas	8
2.2.2 Legislação	10
2.3 . Nanopartículas metálicas	12
2.3.1 Nanopartículas de prata – Propriedades e estratégias de síntese	13
2.4 . Nanocompósitos com partículas metálicas	18
2.4.1 Nanocompósitos com partículas de prata	19
2.5 . Poli(dimetil siloxano) (PDMS) – propriedades e aplicações	21
2.6. Preparação de revestimento antimicrobiano de prata por técnicas de deposição de filmes finos.....	22
3. REVISÃO DA LITERATURA	25
4.OBJETIVOS E METAS.....	30
5.MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1 – Materiais.....	32
5.2 - Síntese e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs)	32
5.2.1 – Síntese das AgNPs	32
5.2.2 – Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis)	33

5.2.3 – Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	33
5.2.4 – Teste de difusão em ágar	33
5.2.5 - Teste de toxicidade com náuplios de <i>Artemia salina</i>	35
5.3 - Preparação e caracterização do revestimento de PDMS	37
5.3.1 - Preparação da solução de PDMS em hexano	37
5.3.2 – Preparação do revestimento de PDMS	37
5.3.3 – Determinação da espessura por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
5.3.4 – Determinação do tempo de cura por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	39
5.4 - Preparação e caracterização dos revestimentos de PDMS/AgNPs	39
5.4.1 Preparação do revestimento de PDMS/AgNPs por aplicações únicas e múltiplas	39
5.4.2 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada a espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS)	41
5.4.3 – Determinação do teor de prata dos revestimentos	41
5.4.3.1 – Preparação das amostras	41
5.4.3.2 - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES)	42
5.4.4 - Microscopia de força atômica (AFM).....	42
5.4.5 – Determinação do ângulo de contato	42
5.4.6 – Formação de biofilme	43
5.4.6.1 – Preparação da amostra	43
5.4.6.2 – Análise de biofilme por fluorescência	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
6.1 – Caracterização das AgNPs	46
6.1.1 - Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis)	46
6.1.2 – Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	47

6.1.3 - Teste de difusão em ágar das nanopartículas sintetizadas.....	47
6.1.4 - Teste de toxicidade com náuplios de <i>Artemia salina</i>	49
6.2 – Caracterizações do revestimento de PDMS	49
6.2.1 – Determinação da espessura por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
6.2.2 – Determinação do tempo de cura por calorimetria exploratória diferencial (DSC)	51
6.3 – Caracterizações dos revestimentos de PDMS/AgNPs.....	53
6.3.1 - Microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectrometria de energia dispersiva de raios-X (MEV/EDS)	53
6.3.2 - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP- AES).....	55
6.3.3 - Microscopia de força atômica (AFM).....	56
6.3.5 – Determinação do ângulo de contato	59
6.3.6- Análise de biofilme por fluorescência:	65
7.CONCLUSÕES:	67
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE	81

1.INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos enfrenta o constante desafio de inibir o crescimento de micro-organismos indesejados em seus produtos, mas sem comprometer a sua segurança, qualidade, frescor e propriedades sensoriais. É sabido que uma das funções das embalagens é preservar ao máximo a qualidade do produto, criando condições que minimizem alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas. Contudo, o conceito tradicional de que esta função deve ser exercida por meio de uma mínima interação entre a embalagem e o produto está superado frente às várias tecnologias que vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas e que têm por princípio justamente uma interação embalagem/produto, como forma de preservar a qualidade e a segurança do alimento, a exemplo dos absorvedores de oxigênio ou etileno e os controladores de umidade (ROONEY, 1995; BRODY *et al.*,2001).

Tais embalagens são conhecidas como embalagens ativas, pois, além de atuarem como uma barreira a agentes externos, apresentam alguma outra função desejável como por exemplo, aumentar a vida de prateleira ou corrigir deficiências presentes na embalagem convencional. Neste segmento, nos últimos anos, têm se destacado os desenvolvimentos envolvendo o uso de agentes antimicrobianos na embalagem.

No Brasil, o desenvolvimento destas embalagens ainda é tímido, faltando até uma legislação para a sua regulação, a qual orienta seguir as orientações da FDA e órgãos europeus. Visando facilitar e promover o uso de embalagens ativas no país, este trabalho buscou desenvolver uma solução pratica e de custo relativamente baixo para este problema, como também estudar outras formas de obtenção de revestimentos a partir de novas técnicas de produção (fiação por solução em sopro – SBS). Uma vez que o uso de superfícies antimicrobianas atende diversos segmentos de mercado como a área médica e de eletrodomésticos, por exemplo, o escopo desse trabalho vai além daquele da indústria de alimentos.

Vários compostos naturais e sintéticos têm sido testados, a exemplo de íons metálicos, ácidos orgânicos, bacteriocinas, isotiocianatos e fungicidas como os benzoatos, sorbatos e imazalil. Na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos, o crescimento microbiano é superficial. A aplicação de fungicidas em ceras e outros revestimentos comestíveis já são utilizados em produtos como queijos e frutas.

Um vasto campo de pesquisa se abre com a utilização de agentes antimicrobianos, em virtude da exigência do mercado em consumir produtos com uma menor carga de conservantes, mas com uma vida de prateleira alta. Dentre os agentes antimicrobianos, destaca-se as nanopartículas metálicas e mais especificamente a prata, pois, de acordo com BRODY *et al.* (2001), é um dos agentes antimicrobianos de maior potencial antimicrobiano. Logo, capaz de atender a demanda do mercado consumidor de alimentos mais saudáveis e com alta durabilidade. O desenvolvimento de novas embalagens ou mecanismos que realizem tais missões é o novo desafio dos pesquisadores e da indústria de alimentos.

Tendo em vista estas demandas, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um revestimento utilizando poli(dimetil siloxano) (PDMS) e nanopartículas de prata (AgNPs), utilizando a técnica *solution blow spraying* (SBSp) que é uma variação da técnica de produção de nanofibras denominada *solution blow spinning* (SBS) para aplicação em embalagens ativas, utensílios e equipamentos. Com esse objetivo, foram sintetizadas por redução química as AgNPs que posteriormente foram aplicadas sobre o PDMS com diferentes graus de cura, ou seja, diferentes tempos de cura, e estudado a influência desses tempos nas características físicas e antimicrobianas do produto final. Além disso, também foi avaliado o efeito da concentração das AgNPs sobre o revestimento de silicone, por múltiplas aplicações das nanopartículas sobre o revestimento nos tempos pré-determinados em função do grau de cura da resina e dentro do intervalo de cura do PDMS.

2. ASPECTOS TEÓRICOS

2.1 . Nanotecnologia – Aspectos Gerais:

O físico e químico Rutherford, conhecido pelo modelo atômico que sugeriu no início do século 20, entendia que as ciências eram a física e a matemática. A matéria, como a conhecemos, e seus fenômenos começam no âmago dos átomos. Ver mais profundamente os detalhes e humores desse mundo subatômico foi tarefa e competência destinada geralmente a quem se dedicava ao estudo da física, que, através de técnicas e equipamentos associados ao cálculo, à física quântica e a outros termos não familiares aos biólogos, perscrutavam de maneira indireta os segredos estruturais dos materiais. A evolução tecnológica da ciência dos materiais propiciou o desenvolvimento da microinformática, da precisão de manufatura e o melhor desempenho de peças e equipamentos, fazendo surgir, portanto, os instrumentos analíticos que permitem aproximar de não físicos a possibilidade de monitorar os eventos, nos quais estão envolvidos os materiais biológicos (TISCHER *et al.* 2009).

De fato, o que define essencialmente a nanotecnologia é a possibilidade de estudo de materiais complexos a partir de sua constituição básica, o átomo (SUGIMOTO *et al.* 2005). A nanotecnologia diz respeito a materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem propriedades e fenômenos físicos, químicos e/ou biológicos significativamente novos e modificados devido a sua escala nanométrica. O objetivo é explorar essa propriedade por meio de controle de dispositivos em níveis atômicos, moleculares, supramoleculares e aprender a fabricar e usar esses dispositivos de maneira eficiente (DURAN *et al.*, 2006). Para que se chegue a esse nível de resolução, é necessário dividir o que vemos como um metro em 1 bilhão de pedaços; o tamanho de um desses pequenos pedaços é de um nanômetro.

O termo nanotecnologia foi usado pela primeira vez em 1974, por Norio Taniguchi, quando descrevia as tecnologias usadas na construção de materiais na escala nanométrica. A visão de Taniguchi, cujo maior divulgador é Eric Drexler, vai no sentido da manipulação de átomo a átomo para a produção de novos materiais, até mesmo de máquinas nanométricas (*nanodevices*), como nanorrobôs e regeneradores de tecido (DREXLER, 2007). Uma definição mais ampla foi: “Nanotecnologia é o design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas pela manipulação controlada do tamanho e forma na escala nanométrica (1-500nm) que

produz estrutura, dispositivos e sistemas com pelo menos uma característica ou propriedade nova ou superior” (BAWA *et al.*, 2005).

Além disso, para ser efetiva ela tem que possuir um caráter multidisciplinar, onde sua eficiência e sucesso dependem da reunião de conceitos da química, física, biologia, etc (RATNER, 2002).

Quando os materiais são manipulados em escala atômica, trabalha-se com leis diferentes. A síntese e o controle dos materiais em nano-escala podem antecipar a fabricação e o controle da estrutura da matéria num nível molecular e representam o início de uma nova e revolucionária era, onde pode-se ter acesso a novas propriedades funcionais e químicas de materiais e dispositivos de uma forma nunca vista antes (DURAN *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2006). Por isso, suas propriedades são modificadas: alguns se tornam melhores condutores de eletricidade ou calor, outros ficam mais resistentes, alguns têm melhores propriedades magnéticas, e também há os que refletem melhor a luz ou mudam de cor à medida que o tamanho é alterado. Essas mudanças são decorrentes de alterações em efeitos como: fricção, combustão, eletrostática, forças de Van der Waals e movimentos brownianos (NICOLAU *et al.* 2000; RIET 2003). Logo, em escala nanométrica, as propriedades dos materiais dependem diretamente do seu tamanho (THAKKAR *et al.*, 2009). Outra diferença significativa é que os materiais em nano-escala possuem área de superfície muito maior, o que os tornam mais disponíveis e susceptíveis para a interação com outras moléculas, células, tecidos, partículas, íons, etc. (TISCHER *et al.*, 2009).

Alguns dos acontecimentos que marcaram a evolução da nanotecnologia e despertaram a percepção da sua relevância foram (TISCHER *et al.* 2009):

- a criação do microscópio de tunelamento (*scanning tunneling microscope*) por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, em 1981; e, no mesmo ano, a publicação do livro *Engines of Creation*, de Eric Drexler, que popularizou a nanotecnologia (DREXLER 2007);
- a descoberta dos fulerenos por Robert Curl, Harold Kroto e colaboradores em 1985 (KROTO *et al.* 1985);
- em 1989, o feito de Donald Eigler ao escrever o nome da IBM com átomos individuais do elemento xenônio (Xe) (SCHWEIZER 1990);
- em 1991, no Japão, a descoberta dos nanotubos de carbono (IIJIMA 1991), estruturas cilíndricas formadas por átomos de carbono que possuem alta resistência.

A nanotecnologia oferece a perspectiva de grandes avanços que permitam melhorar a qualidade de vida e ajudar a melhorar o meio ambiente, porém como em qualquer outra área da tecnologia que faz uso intensivo de novos materiais e substâncias químicas, ela também traz consigo alguns riscos ao meio ambiente e à saúde humana em geral (QUINA, 2004).

Nanomateriais incluem nanopartículas, nanocristais, nanotubos, nanofibras, nanofios, nanobastões, nanofilmes, fulerenos, pontos quânticos, etc (FREEMAN *et al.*, 2008; DURAN *et al.*, 2006). Numerosas técnicas para a fabricação desses nanomateriais estão disponíveis, como *electrospinning*, fiação por sopro em solução (SBS), separação de fases, processos de automontagem, deposição de filmes finos, deposição química em fase vapor, decapagem química (*etching*), nanoimpressão, fotolitografia e litografia por feixe de elétrons ou litografia de nanoesferas, entre outros (FREEMAN *et al.*, 2008).

Atualmente, muitos produtos nanotecnológicos estão em desenvolvimento no mundo e já existem diversos deles sendo comercializados no mercado. Sabe-se que a maior parte dos investimentos nessa área vem de países desenvolvidos. O Brasil tem realizado bons investimentos na área de nanotecnologia e espera-se nos próximos anos muitas inovações para o mercado nacional.

Os materiais manipulados em escala nanométrica geram as chamadas “nanopartículas e nanoestruturas” com diferentes tamanhos, formas e estruturas. Além do tamanho, as propriedades fundamentais de nanoestruturas e nanopartículas dependem também da sua composição, morfologia, ou seja, anisotropia dimensional, estrutura, cristalinidade, razão de aspecto e fase do nanomaterial (THAKKAR *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2010; SAL *et al.*, 2012).

Tipicamente, as nanopartículas possuem um tamanho abaixo do comprimento de onda da luz visível, tornando-as transparentes e interessantes para aplicações em cosméticos, revestimentos e embalagem, por exemplo. Mais especificamente na indústria de alimentos e praticamente em todos os segmentos, a nanotecnologia agrega benefícios, como por exemplo: na agricultura pela encapsulação e liberação controlada de pesticidas e fertilizantes, na detecção animal e vegetal de patógeno e na aplicação de conceitos da engenharia genética; no processamento de alimentos pelo encapsulamento de sabor ou potencializadores de odor, melhoria da qualidade dos alimentos e desenvolvimento de controladores de viscosidade; nas embalagens de alimentos pelo desenvolvimento de sensores de patógenos e de gás, dispositivos anti-falsificação, aditivos de proteção UV e

embalagens poliméricas com maior barreira a gases e maior estabilidade a variações climáticas (temperatura e umidade); e, por último, nos suplementos nutricionais por disponibilizar nutracêuticos com maior estabilidade e biodisponibilidade (COLES *et al.*, 2003; DUNCAN, 2011; SILVESTRE *et al.*, 2011).

Um relatório recente da *Global Active, Smart, and Intelligent Packaging Market by Products, Applications, Trends and Forecasts (2010-2015)*, estima que o mercado global de embalagens ativas e inteligentes vai valer \$ 23.400,000 até o final de 2015. A estimativa de aumento entre 2010 e 2015 é de 8,2%. O relatório analisa o mercado de embalagens inteligentes e ativas com base na tecnologia e aplicações, a fim de compreender os principais impulsionadores do mercado, restrições e oportunidades. O mercado está sendo impulsionado por uma demanda crescente por alimentos embalados frescos e de alta qualidade. Os consumidores também estão se tornando cada vez mais atraídos por alimentos que oferecem um maior nível de conveniência do que aqueles encontrados em embalagens tradicionais. Além disso, os fabricantes de alimentos estão se tornando cada vez mais preocupado com o aumento da vida de prateleira do produto. Tecnologias ativas e embalagens inteligentes para alimentos e bebidas estão ajudando a abordar estas diferentes necessidades e preocupações entre os consumidores e fabricantes.

O uso da nanotecnologia pode, de fato, estender e implementar todas as principais funções da embalagem (de contenção, proteção e preservação, marketing e comunicação). Esta é a razão pela qual muitas das maiores empresas de embalagem de alimentos do mundo estão explorando ativamente o potencial da nanotecnologia, a fim de obter novos materiais de embalagem de alimentos com melhores propriedades mecânicas, antimicrobianas e também, capaz de rastrear e monitorar o estado dos alimentos durante o transporte e armazenamento (SILVESTRE *et al.*, 2011).

2.2 Embalagens de Alimentos

Na sociedade de hoje, a embalagem é generalizada e essencial. Ela envolve, reforça, protege, reduz o desperdício, mantém a qualidade e segurança dos alimentos, desde o processamento à fabricação, através da manipulação e armazenamento para o consumidor final. Sem embalagem, o manuseio de alimentos seria um exercício confuso, ineficiente e caro, como também o marketing moderno de consumo seria praticamente impossível (BRADLEY *et al.*, 2011). O setor de embalagens representa cerca de 2% do

produto nacional bruto (PIB) nos países desenvolvidos, e cerca de metade de todas as embalagens é usada para embalar alimentos (ROBERTSON, 2013).

Embalagem para alimentos, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, é o invólucro, recipiente ou qualquer forma de acondicionamento, removível ou não, destinada a cobrir, empacotar, envasar, proteger ou manter, especificamente ou não, matérias-primas, produtos semielaborados ou produtos acabados. Incluído dentro do conceito de embalagem se encontram as embalagens primárias, secundárias e terciárias (ANVISA - 2008).

As embalagens, por serem o primeiro contato do consumidor com o produto, são consideradas como um veículo de venda e de divulgação da marca e da sua identidade, tornando-se uma das características principais na hora da compra (DELLA LUCIA *et al.*, 2007 *apud* GONÇALVES *et al.*, 2008). Logo, elas são estratégias importantes que podem ser decisivas como vantagem competitiva na indústria de alimentos. Visando atender às exigências dos consumidores, as indústrias buscam fornecer embalagens modernas, práticas, seguras, rastreáveis e que preservem os alimentos, aumentem sua vida de prateleira e tenham viabilidade econômica e ambiental (SOARES *et al.*, 2009; BRADLEY *et al.*, 2011).

Ao longo das últimas décadas, a utilização de polímeros como materiais de embalagem para alimentos aumentou enormemente devido às suas vantagens em relação a outros materiais tradicionais (SELKE *et al.*, 2004; JORDAN *et al.*, 2005). Em termos de mercado, tem-se que 42% do mercado global de polímeros é destinado ao mercado de embalagens (Applied de Informação do Mercado Ltd., 2007).

Embora as embalagens tradicionais tenham contribuído grandemente com os primeiros desenvolvimentos do sistema de distribuição de alimentos, elas não são suficientes para atender às novas exigências dos consumidores por produtos mais próximos ao natural, contendo menos conservantes e que sejam seguros. Além disso, há a preocupação recente com a utilização de alimentos como veículo para o bioterrorismo (YAM *et al.*, 2005). Nesse sentido, atualmente novas tecnologias de embalagens vêm sendo desenvolvidas em resposta a essa demanda (DAINELLI *et al.*, 2008).

É sabido que uma das funções da embalagem é proteger e preservar ao máximo a qualidade do produto, criando condições que minimizem alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas, ou seja, devem agir como uma barreira ao ambiente externo. Contudo, o conceito tradicional de que esta função deve ser exercida por meio

de uma mínima interação entre a embalagem e o produto está superado frente às várias tecnologias que vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas. Essas tecnologias têm por princípio justamente uma interação embalagem/produto, como forma de preservar a qualidade e a segurança do alimento, a exemplo dos absorvedores de oxigênio ou etileno e os controladores de umidade. Embalagens com estas características são conhecidas como embalagens ativas, pois, além de atuarem como uma barreira a agentes externos, desempenham um papel dinâmico na conservação de alimentos. Há ainda as embalagens inteligentes que são aquelas capazes de monitorar o estado dos alimentos embalados ou a atmosfera circundante do alimento, ou ainda atuar como um lacre contra imitação fraudulenta (SILVESTRE *et al.*, 2011).

2.2.1 Embalagens antimicrobianas

Um dos principais destaques no desenvolvimento de embalagens ativas envolve a incorporação direta de agentes antimicrobianos na embalagem. Esse procedimento é um meio conveniente de prolongar a vida de prateleira do alimento e ao mesmo tempo reduzir a quantidade de conservantes utilizados em sua formulação. Logo, atende a demanda atual dos consumidores que é a busca por alimentos minimamente processados e livre de conservantes (SUPPAKUL *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2004).

Os agentes antimicrobianos podem ser incorporados diretamente ao material da embalagem, estar em rótulos/etiquetas ou ainda, contidos em sachês. Na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos, o crescimento microbiano é superficial. A aplicação de fungicidas em cêras e outros revestimentos comestíveis já são utilizados em produtos como queijos e frutas.

As embalagens antimicrobianas são divididas em dois grupos. No primeiro, o agente migra para a superfície do produto, enquanto no segundo eles são efetivos contra o crescimento microbiano superficial, sem a necessidade de migração para o produto, no caso de sólido. A substância antimicrobiana que é incorporada ao material da embalagem pode suprimir contaminação microbiana, alargando a fase de retardamento e/ou reduzindo a taxa de crescimento ou inativação de microrganismos por contato (QUINTAVALLA *et al.*, 2002). Logo, em ambos os casos, um intenso contato entre o produto e o agente antimicrobiano é necessário, o que torna a tecnologia atrativa para alimentos acondicionados a vácuo (VERMEIREN *et al.*, 2002).

Deve-se considerar, na seleção do agente antimicrobiano, seu mecanismo de inibição, natureza química, migração e difusão do agente da embalagem para o alimento, tipo e população de microrganismos, fisiologia do microrganismo-alvo, processo de fabricação e processabilidade do material de embalagem e aspectos relacionados à legislação. Além de características físico-químicas do alimento como: pH, umidade e composição (VERMEIREN *et al.*, 2002).

Diferentes tipos de nanomateriais, como cobre, zinco, titânio (RETCHKIMAN-SCHABES *et al.*, 2006), magnésio, ouro (GU *et al.*, 2003), alginato (AHMAD *et al.*, 2005) e prata vêm sendo utilizados como agentes antimicrobianos, mas as nanopartículas de prata provaram ser mais eficazes, uma vez que tem uma boa eficácia antimicrobiana contra bactérias, vírus e outros microrganismos eucariotos (BRODY *et al.*, 2001; GONG *et al.*, 2007). Íons de cobre também podem destruir microrganismos, mas são considerados tóxicos quando em contato com alimentos, além de serem catalisadores de reações de oxidação, podendo, portanto, acelerar outras reações de degradação.

Por último, tem-se que as bactérias mais comumente estudadas para avaliar o desempenho de embalagens de alimentos antimicrobianas são a *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*, por serem as principais bactérias encontradas em alimentos processados. A bactéria *S. aureus* são do gênero *Staphylococcus*, sendo cocos *Gram-positivos*, pertencentes à família *Micrococcaceae*. Uma vez que se dividem em planos diferentes, quando vistos ao microscópio aparecem na forma de cachos de uva. Elas são facultativas anaeróbias, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando então produzem catalase, enzima que contribui para sua sobrevivência. A maioria pode multiplicar-se em soluções de 7,5% a 15% de NaCl e por serem bactérias mesófilas apresentam temperatura de crescimento na faixa de 7 a 47,8°C. A *S. aureus*, especificamente, pode ser produtora de enterotoxinas nos alimentos, causando intoxicação quando consumidos. São encontradas em lesões de pele e nas vias aéreas superiores do homem, sendo facilmente transferidas para os alimentos (FRANCO, 2005).

Já a *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae* e dos coliformes fecais e entre suas principais características destaca-se: bacilos *Gram-negativos*, não esporulados, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria também fermenta lactose, com produção de gás e ácido, embora algumas sejam anaerogênicas. O significado da presença de *E.coli* em alimentos é a falta das condições higiênicas mínimas do produto. A pesquisa de *E. coli* nos alimentos fornece, com maior

segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (FRANCO, 2005).

Alguns fatores podem afetar a efetividade da embalagem antimicrobiana, como as características do antimicrobiano (solubilidade e tamanho da molécula/partícula) e do alimento, condições de estocagem e distribuição (tempo e temperatura), método de preparo do filme e interação entre agente antimicrobiano e polímero (DAWSON *et al.*, 2003; CHA *et al.*, 2004).

2.2.2 Legislação

A ANVISA publicou diversas resoluções referente às embalagens para alimentos, seguem algumas delas:

- Portaria n. 987, de 8 de dezembro de 1998: aprova o regulamento técnico para embalagens descartáveis de polietileno tereftalato - PET - multicamada destinadas ao acondicionamento de bebidas não alcoólicas carbonatadas.
- Resolução n. 124, de 19 de junho de 2001: aprova o regulamento técnico sobre “preparados formadores de películas a base de polímeros e/ou resinas destinados ao revestimento de alimentos”. Retificada no DOU no. 132, de 10/07/2001.
- Resolução RDC n. 91, de 11 de maio de 2001: aprova o regulamento técnico sobre “critérios gerais e classificação de materiais para embalagens e equipamentos em contato com alimentos”. Republicada no DOU no. 114, de 13/06/2001.
- Resolução n. 105, de 19 de maio de 1999: aprova os regulamentos técnicos sobre “disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos”. Vigente, porém com alterações diversas.
- Portaria nº 177, de 4 de março de 1999. Aprova o regulamento técnico sobre "Disposições gerais para embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos". Alterada pela RDC no. 130, de 10/05/2002.
- Resolução RDC n. 17, de 17 de março de 2008: trata do regulamento técnico sobre “lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos”.
- Resolução RDC nº 20, de 26 de março de 2008. Aprova o Regulamento Técnico que dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre embalagens de polietileno

tereftalato (PET) pós-consumo reciclado grau alimentício (PET-PCR) destinados a entrar em contato com alimentos.

- Resolução RDC nº 51, de 26 de novembro de 2010. Dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. Republicada no DOU no. 244, de 22/12/2010, p.75-79.
- Resolução RDC nº 52, de 26 de novembro de 2010. Dispõe sobre corantes em embalagens e equipamentos plásticos destinados a estar em contato com alimentos. Republicada no DOU no. 244, de 22/12/2010, p. 79-80.
- Resolução RDC nº 56, de 16 de novembro de 2012. Dispõe sobre a lista positiva de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

A nanotecnologia já está sendo desenvolvida no Brasil em diferentes campos de estudos e pesquisas, entre eles o de embalagens para alimentos, porém a ANVISA até o presente momento não traz nenhuma regulamentação sobre o uso desse tipo de embalagens, apenas indica, caso necessário, consultar orientações da FDA- *Food and Drug Administration*.

Em 2006, a agência ambiental dos Estados Unidos começou a regulamentar o uso da nanopartícula como tóxico dentro da Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas. Por isso, empresas que utilizam essas partículas de nanopartícula precisam registrar o produto final como produto tóxico, mesmo que seja um teclado de computador. Nos últimos anos, foram organizados uma série de “diálogos”, internacionais e “multissetoriais” de diretrizes voluntárias e de códigos de conduta para a indústria sem muita utilidade. O Brasil já participou de alguns desses fóruns, mas nenhuma agência de regulamentação tem, até hoje, métodos efetivos para monitorar riscos de exposição às nanopartículas. Da mesma forma, apesar da grande quantidade de produtos já encontrados hoje no mercado, além dos que estão por vir, tem-se que, atualmente, nenhuma agência especifica níveis seguros de exposição que os fabricantes de nanopartículas têm que obedecer. Há regulamentação apenas no sentido de rotular os nanomateriais nas embalagens, como por exemplo, o regulamento da união europeia Nº 1169/2011. No entanto, aqui no Brasil, essa informação, praticamente, só aparece nos rótulos quando o propósito é fazer propaganda do produto (IPEN e EEB 2009). Na maioria dos casos, há uma atenção especial da indústria e das instituições em apresentar a nanotecnologia e os produtos nanotecnológicos como seguros, sem riscos.

2.3 . Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas constituem uma área muito ativa de pesquisa e desenvolvimento no domínio da nanociência e nanotecnologia. A humanidade tem utilizado os metais de várias formas úteis desde o período remoto de sua história.

Nanopartículas metálicas tem possíveis aplicações em diversas áreas como eletrônica, cosméticos, tintas, embalagens e biotecnologia. Por exemplo, as nanopartículas podem ser induzidas a fundir-se a um sólido em temperaturas relativamente baixas, sem degradar o material, para produzir revestimentos para aplicações de eletrônica, como por exemplo, capacitores (THAKKAR *et al.*, 2009).

Na área biomédica, as nanopartículas metálicas podem ser ligadas às cadeias simples de DNA de modo não destrutivo, o que abre caminhos para aplicações de diagnóstico médico. Elas podem ainda atravessar a vasculatura e localizar qualquer órgão-alvo, levando a um ganho potencial terapêutico e também, no diagnóstico por imagem em relação aos agentes farmacêuticos convencionais (THAKKAR *et al.* 2009; MODY *et al.*, 2009).

Existem duas alternativas de síntese de nanopartículas metálicas: a aproximação “*bottom-up*” e a aproximação “*top-down*”. “*Bottom-up*”, ou auto-montagem, refere-se à construção de uma estrutura átomo a átomo, molécula a molécula, ou *cluster* a *cluster*. Nesta abordagem, são utilizados procedimentos químicos ou biológicos para sua síntese onde inicialmente são formados blocos nanoestruturados, ou seja, as nanopartículas e, posteriormente, montada a estrutura final. Uma vantagem clara da aproximação “*bottom-up*” é a possibilidade realçada de obter nanopartículas metálicas com defeitos comparativamente menores e com composições químicas mais homogêneas. Na aproximação “*top-down*”, um material inicial conveniente reduz-se no tamanho utilizando meios químicos, ou um procedimento físico, isto é, mecânico. A desvantagem principal da aproximação “*top-down*” é a imperfeição da estrutura superficial. Tais defeitos na estrutura superficial podem ter um impacto significativo nas propriedades físicas e na estrutura química das nanopartículas metálicas devido ao seu tamanho reduzido. Os métodos tradicionais e os mais largamente usados na síntese de nanopartículas metálicas usam procedimentos químicos (TAN *et al.*, 2003).

Quando os íons metálicos são reduzidos, devido as suas dimensões nanométricas, os efeitos quânticos são pronunciados e se refletem macroscopicamente. Um dos efeitos é o surgimento de intensa cor nas dispersões coloidais formadas com dependência direta

das propriedades dimensionais e geométricas das partículas. Essa cor é devido ao efeito *plasmom* ressonante, um efeito de ressonância onde os elétrons das bandas eletrônicas do metal formam um plasma eletrônico que circunda a partícula e pode ser excitado por luz visível para executar oscilações plasmom, segundo a teoria de Mie (KLABUNDE, 2001).

Dentre a variedade de nanopartículas existentes podemos citar, por exemplo, a Ag, o Au, o Mo, o Si, a Pt, o Pd, o Ru, entre outras, que apresentam uma ampla variedade de aplicações práticas, tais como eletrodos transparentes, catálise, conversão de energia solar, emissão de campo, dispositivos fotônicos, entrega de medicamentos, biossensores (DNA, óptico, químico, gás e imunossensores) bio-rotulagem, biomarcadores, imagem por ressonância magnética (MRI), tecnologia a laser, engenharia de tecidos, agentes antimicrobianos, entre outras aplicações (SALATA, 2004).

2.3.1 Nanopartículas de prata – Propriedades e estratégias de síntese

A prata metálica foi usada durante séculos como um anti-séptico e é conhecida por ser atóxica para o ser humano em baixas concentrações e relativamente inerte (OLIVEIRA, 2004). Como exemplo, tem-se que na antiguidade a prata era utilizada em recipientes de água e também, na prevenção de deterioração de líquidos e alimentos. Os íons de prata eram geralmente utilizados no tratamento de queimaduras e como agentes quimioterápicos contra patologias provocadas por bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (CHOPRA, 2007). Além de sua baixa toxicidade para seres humanos, a prata possui várias propriedades benéficas que a torna uma excelente candidata para uso como um material antimicrobiano.

No entanto, em 1940, após a descoberta da penicilina e sua introdução na medicina, o uso da prata como agente bactericida diminuiu. Mas com a descoberta de cepas resistentes a antibióticos, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em razão da necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos (CHOPRA, 2007). A utilização da prata na forma de nanopartículas potencializa sua ação antimicrobiana, pois implica numa maior área superficial para ficar em contato com a célula bacteriana (MORONES *et al.* ,2005; SANTOS, 2010).

A medicina tem demonstrado que as nanopartículas de prata (AgNPs) tem atividade antimicrobiana contra uma vasta gama de micro-organismos patogênicos, ou seja, algo em torno de 650 micro-organismos. Tais características, associadas ao baixo custo de produção, tornam as AgNPs eficazes contra micro-organismos nocivos

(BREGGIN *et al.*, 2009), outras vantagens são que ela tem boa estabilidade térmica e é estável às radiações UV e visível. (COWAN *et al.*, 2003).

Sua atividade antimicrobiana tem sido estudada em diferentes campos da medicina para reduzir infecções, bem como prevenir colonização bacteriana em superfícies de prótese e cateteres. Seu uso também se estende em materiais odontológicos, materiais têxteis e da indústria de alimentos, como superfícies de aço inoxidável (GUZMÁN *et al.*, 2009).

Um estudo recente de nanopartículas de prata com tamanhos de 44, 50, 25 e 35 nm que foram preparadas por utilização de glucose, galactose, maltose e lactose, respectivamente, mostrou que as menores partículas de prata (25 nm) apresentaram maior atividade antimicrobiana, enquanto as partículas maiores (50 nm) teve o menor efeito antimicrobiano. Portanto, a nanop prata com tamanho menor mostra a atividade antimicrobiana mais forte (PANACEK *et al.*, 2006).

Em relação à forma das nanopartículas, a que apresentou melhor atividade antibacteriana foi a de formato triangular, enquanto as de forma de bastonetes exibiu um desempenho inferior (PAL *et al.*, 2007).

O controle do tamanho e forma das nanopartículas é realizado por muitas técnicas, incluindo métodos físicos e químicos, que foram desenvolvidas para preparar nanopartículas metálicas. A redução química é o método mais frequentemente aplicado para a preparação de AgNPs como dispersões coloidais estáveis em água e solvente orgânicos (TAO *et al.*, 2006). Os redutores comumente usados são: boridretos, citratos, ascorbatos e hidrogênio elementar (AHMADI *et al.*, 1996). A redução dos íons de prata em solução aquosa geralmente produz prata coloidal com diâmetros de partícula de diversos nanômetros. Inicialmente, a redução de vários complexos com íons de Ag^+ levam à formação de átomos de prata (Ag^0), que é seguido pela aglomeração de oligômeros. Essas aglomerações eventualmente levam à formação de partículas de Ag coloidais (KAPOOR *et al.*, 1994).

Com o intuito de prevenir aglomerações indesejadas dos colóides, a síntese de nanopartículas por métodos de redução química é muitas vezes realizada na presença de estabilizadores. Dentre eles, alguns exemplos são: goma arábica, ácido oleico, dodecanatiol, carboximetil celulose (CMC), polivinilpirrolidona (PVP), dodecil sulfato de sódio (SDS), poli(etileno glicol) (PEG), entre outros.

Um dos métodos de redução química mais difundidos é o de TURKEVICH (TURKEVICH *et al.*, 1951) que consiste na utilização de citrato de sódio como agente

reduzidor e tem como precursor, soluções de nitrato de prata, mantidos sobre agitação, aquecimento e posterior resfriamento. Sua ampla aplicação se deve às características não tóxicas do citrato de sódio; à boa reprodutibilidade e simplicidade desse método; e a boa atividade antimicrobiana para as classes Gram-negativas e positivas das AgNPs obtidas (GORUP, 2011; SANTANA, 2012). Quando as partículas coloidais são muito menores que o comprimento de onda da luz visível, as soluções têm uma coloração amarelada com uma intensa banda na faixa de 380-400 nm e outras menos intensas em comprimentos de ondas maiores do espectro de absorção (TESSIER *et al.*, 2000).

Partículas na escala nanométrica são termodinamicamente instáveis (ATKINS, 1994) por possuírem grande área superficial por volume. Logo, as nanopartículas apresentam alta tendência de agregarem-se para minimizar a energia total ou interfacial do sistema. A aglomeração das nanopartículas é causada pela força atrativa de van der Waals e/ou forças que tendem a minimizar a energia total de superfície do sistema. Portanto, para evitar a agregação das partículas, forças repulsivas devem sobrepor às atrativas (JIANG *et al.*, 2009).

Forças repulsivas podem ser alcançadas pela estabilização estérica, eletrostática ou eletroestérica. A estabilização estérica se dá pela adsorção de um polímero não carregado ou surfactantes não iônicos sobre a superfície das nanopartículas, o que impede a agregação por meio de repulsão estérica (EL BADAWY *et al.*, 2010). Já a estabilização eletroestérica ocorre quando um polieletrólito adsorve sobre a superfície da partícula coloidal.

Polieletrólitos são polímeros com grupos ionizáveis, sendo classificados em aniônicos ou catiônicos de acordo com seu grupo funcional, ou seja, é um polímero cujas unidades de repetição suportam um grupo eletrólito que se dissocia em solução aquosa, fazendo com que o polímero fique carregado (EL BADAWY *et al.*, 2010). Então, a estabilidade é provocada pela repulsão estérica, bem como eletrostática. Alguns dos polímeros usados para estabilização de AgNPs são: polivinilpirrolidona (PVP) (WILEY *et al.*, 2005; EL BADAWY *et al.*, 2010), poli (álcool vinílico) (PVAL) (PENICHEVA *et al.*, 2012), poli (etileno glicol) (PEG) (POPA *et al.*, 2007), poliacrilamida (CHEN *et al.*, 2006), carboximetil celulose (GARCIA, 2011).

A combinação da nanotecnologia com o seu efeito antimicrobiano bastou para a prata se tornar um dos campos mais promissores da ciência, bem como de interesse comercial. De todos os nanomateriais, e mesmo que as questões regulamentares ainda sejam obscuras, a nanop prata tem o maior grau de comercialização. Não se restringe apenas

a aplicações médicas, mais de 100 produtos de consumo com nanop prata já podiam ser encontrados no mercado em 2007, como exemplo tem-se: forros internos em frigoríficos, máquinas de lavar, cosméticos ou produtos de higiene (cremes, loções, sabonetes, desodorantes, escovas de dente, pasta de dente, etc), talheres ou superfícies de contato com alimentos (tábuas de corte, bancadas, contentores, transportadores), têxteis (vestuário, roupa interior, meias, estofados), brinquedos, sistemas de purificação de água ou ar, revestimentos espectralmente seletivos para a absorção da energia solar e assim por diante (RAND *et al.*, 2004; LAGARON *et al.*, 2011).

A ação antimicrobiana dos íons de prata não é totalmente compreendida, porém o efeito dos íons de prata nas bactérias pode ser observado pelas mudanças estruturais e morfológicas (Figura 1). As nanopartículas de prata, assim como os íons de prata têm a capacidade de ancorar na parede celular bacteriana e depois penetrar no seu interior, causando mudanças estruturais na membrana celular como, por exemplo, aumento da porosidade, o que altera sua permeabilidade e pode levar à morte da célula. Também já se relatou que na liberação dos íons de prata pelas nanopartículas, estes íons podem interagir com os grupos tiol de muitas enzimas e proteínas vitais, tornando-as inativas (KLABUNDE, 2001; PRABHU *et al.*, 2012).

Outro mecanismo sugere que no interior das membranas, as AgNPs e os seus íons ligam-se com o enxofre e fósforo do DNA e com isso, a molécula de DNA muda para a forma condensada e perde sua habilidade de divisão celular, levando à morte celular (FENG, 2000; MORONES *et al.*, 2005; DAMM *et al.*, 2008; LEVIN *et al.*, 2009).

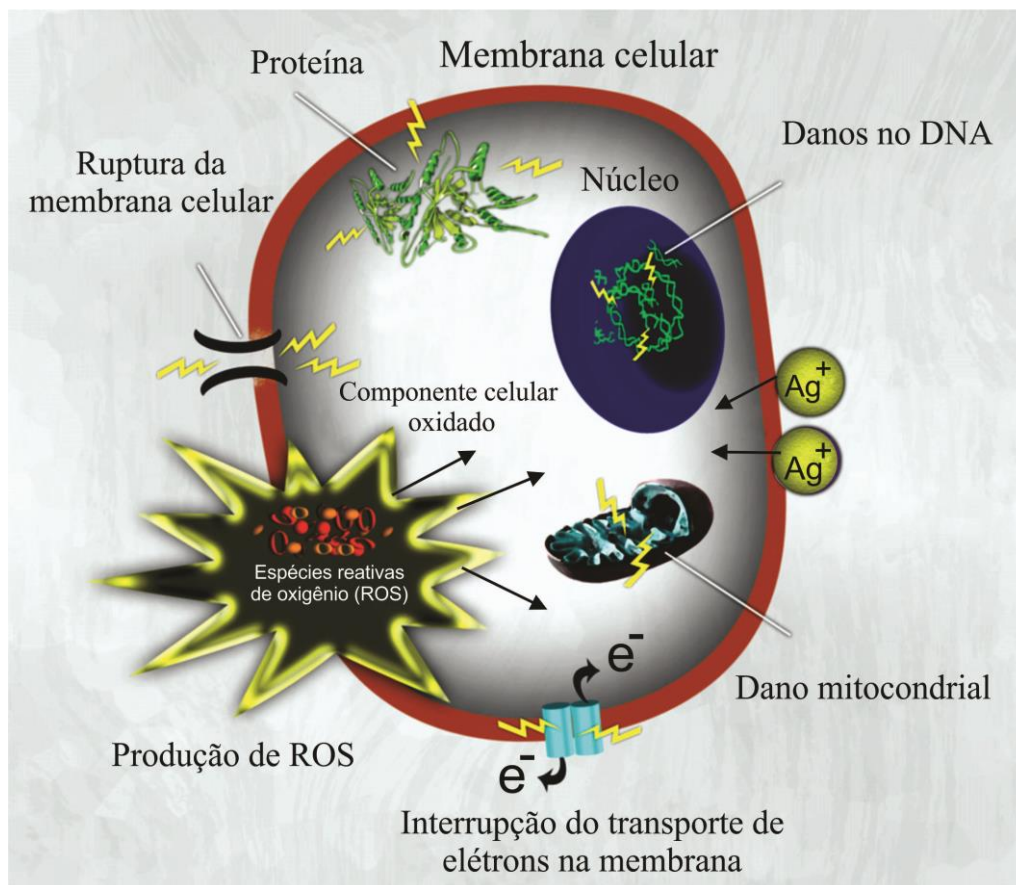


Figura 1- Representação esquemática da atividade antimicrobiana da prata

Fonte: HAJIPOUR *et al*, 2012

No que se refere à interferência na replicação do DNA, tem-se observado para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* que a condensação do DNA em resposta à presença de íons de Ag^+ é um mecanismo de defesa que visa proteger o DNA de danos, mas simultaneamente limita a capacidade das células de se autorreplicar. Além disso, já foi observado que as bactérias Gram-negativas (por exemplo, *E. coli*) geralmente são mais susceptíveis ao tratamento de prata que as bactérias Gram-positivas (por exemplo, *S. aureus*), porque as membranas das bactérias Gram-positivas são mais espessas, o que torna o transporte de íons de prata carregados positivamente através da membrana relativamente lento em comparação ao transporte através da membrana mais fina de espécimes Gram-negativas (RAI *et al.*, 2009).

2.4 . Nanocompósitos com partículas metálicas

O termo “nanocompósito polimérico” é normalmente usado para polímeros carregados com partículas dispersas, tendo pelo menos uma dimensão menor que 500nm (KOMARNENI, 1992; CARLSON *et al.*, 1998; ALEXANDRE e DUBOIS, 2000). Eles estão abrindo uma nova geração de materiais macromoleculares com baixas densidades e propriedades multifuncionais. Uma das principais vantagens dessa classe de materiais é a quantidade extremamente baixa de nanopartícula necessária para alcançar os requisitos desejados, podendo ser uma ou mesmo duas ordens de grandeza menor que a concentração das micro cargas convencionais (PAUL *et al.* 2008).

Os polímeros são considerados como um material bom para acolhimento de nanopartículas metálicas e semicondutoras, as quais, por sua vez, apresentam propriedades ópticas e elétricas excepcionais. Uma variedade de nanocompósitos poliméricos com nanopartículas inorgânicas, que possuem propriedades elétricas, ópticas e magnéticas interessantes e geralmente superiores às do polímero matriz ou espécies inorgânicas, têm sido relatados na literatura (LAGARON *et al.*, 2011).

De um modo geral, os nanocompósitos com nanopartículas metálicas podem ser obtidos através da adição do precursor do metal a uma solução de polímero, seguindo-se a redução do metal precursor por um agente de redução, ou por termólise. Pode-se ainda adicionar o precursor de metal durante a polimerização com a subsequente redução (HUANG *et al.*, 2004).

Uma dispersão uniforme de nanopartículas leva a uma área interfacial polímero/nanopartícula muito grande, o que altera a mobilidade molecular, o comportamento de relaxamento e as consequentes propriedades térmicas e mecânicas do material (AZEREDO, 2009). As nanopartículas com uma relação elevada da maior para a menor dimensão (isto é, razão de aspecto) são particularmente interessantes devido à sua elevada área superficial específica, proporcionando melhores efeitos de reforço (DUBIEF *et al.*, 1999; AZIZI *et al.*, 2005; DALMAS *et al.*, 2007).

Entre as aplicações dos nanocompósitos orgânicos-inorgânicos destaca-se o desenvolvimento de cristais fotônicos; revestimentos e adesivos para indústria automotiva, de construção civil, aeroespacial, de alimentos e têxtil; produtos farmacêuticos, biomédicos e formulações cosméticas (DAVIM *et al.* 2013).

2.4.1 Nanocompósitos com partículas de prata

Nanopartículas de prata são as nanocargas antimicrobianas mais utilizadas em nanocompósitos poliméricos (DAVIM *et al.*, 2013). Estes, por sua vez, são reconhecidos como tendo uma estabilidade térmica elevada e atividade antimicrobiana de longa duração. Além disso, esses nanocompósitos em baixas concentrações de AgNPs não exibem nenhuma toxicidade para as células e tecidos humanos (WILLIAMS *et al.*, 1989).

Duas abordagens gerais podem ser distinguidas para a preparação de nanocompósitos metálicos, dependendo de onde as nanopartículas são sintetizadas (**Figura 2**): (A) *in situ*, utilizando a matriz de polímero como o meio de reação; e (B) *ex situ*, o que significa que a partícula é sintetizada antes da sua incorporação no polímero e desta forma a matriz é simplesmente o meio de dispersão.

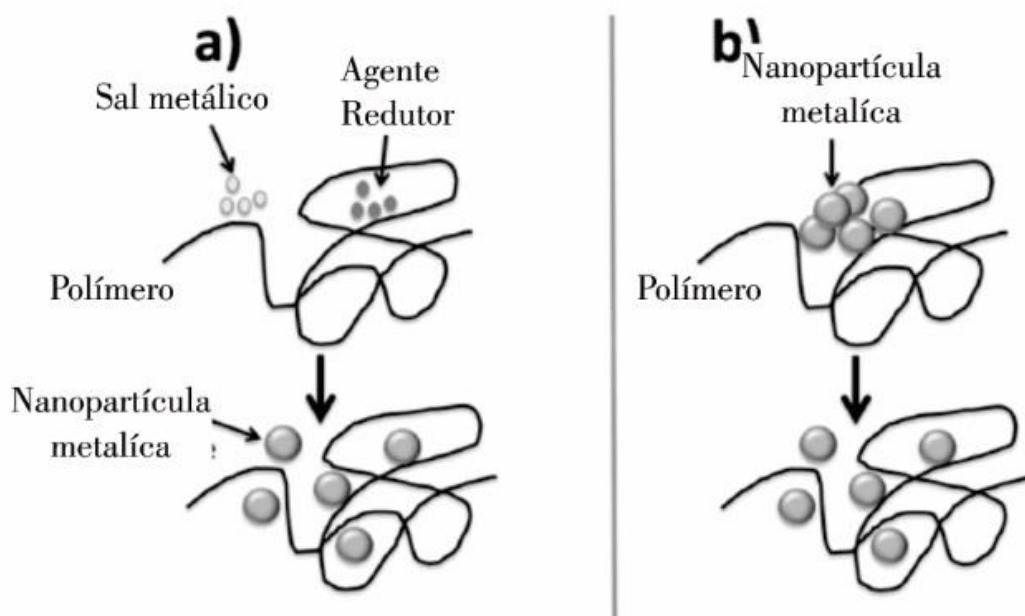


Figura 2 – Esquema de preparação de nanocompósitos metálicos: a) *In situ*, b) *Ex situ*.

Fonte: PALZA, 2015.

A primeira abordagem, métodos *in situ*, é usada principalmente para nanocompósitos obtidos a partir de hidrogéis poliméricos que possuem macromoléculas com vários grupos funcionais e meio rico em água que proporcionam melhor estabilização e dispersão das nanopartículas metálicas. Nesses sistemas, o monômero é polimerizado em solução, com o precursor metálico, tal como nitrato de prata, introduzido

antes ou depois da polimerização. As nanopartículas metálicas são geradas dentro da matriz de polímero por redução química, térmica, por luz ultravioleta (UV) ou radiação γ , por exemplo, e a rede de gel do polímero atua como um nanoreator, onde as nanopartículas são formadas (NICOLAIS *et al.*, 2013). Como exemplo, tem-se que o hidrogel saturado de poli (acrilamida-co-ácido acrílico) pode ser um meio para a formação de nanopartículas de prata com tamanho de cerca de 25-30 nm (THOMAZ *et al.*, 2007).

A segunda abordagem, métodos *ex situ*, é normalmente utilizada em compósitos termoplásticos, onde o comportamento viscoelástico da matriz determina a dispersão das nanopartículas (PALZA, 2015). Nesses sistemas, as nanopartículas de prata elementar são obtidas preliminarmente por rotas químicas e depois, incorporadas em diferentes polímeros como: poliuretano, poliéster, poliamida, polipropileno, poliacrilato, entre outros. Entre os métodos de incorporação destaca-se, por exemplo: método de composição por fusão ou por solução e deposição de partículas metálicas diretamente sobre a superfície do substrato (KENAWY *et al.*, 2007). Normalmente, a síntese das nanopartículas metálicas de forma isolada permite obter nanopartículas modificadas hidrofobicamente que, posteriormente, podem ser facilmente misturadas com os polímeros. Dessa forma, as técnicas *ex situ* para a síntese de nanocompósitos de metal/polímero são frequentemente preferidos em relação aos métodos *in situ* devido a elevada qualidade ótica que pode ser conseguida no produto final (NICOLAIS *et al.*, 2013).

À medida que a atividade antimicrobiana da prata ocorre apenas quando está em forma iônica livre (Ag^+) ou sob a forma de nanopartículas de prata elementar (AgNPs), o desenvolvimento de um polímero à base de prata antimicrobiana deve conter uma das duas formas e cada uma levanta desafios diferentes. No primeiro caso, a matriz que incorpora os íons de prata deve segurá-los quimicamente, permitindo uma migração lenta para um ambiente mais úmido. Isto foi alcançado com sucesso com a utilização de zeólitas de prata, vidros de prata, ou resinas de fosfato de zircônio de prata (LAGARON *et al.*, 2011).

Nas zeólitas de prata, os íons de sódio que ocorrem naturalmente são parcialmente substituídos por íons de prata por imersão da zeólita em uma solução de nitrato de prata. As zeólitas modificadas podem ser, em seguida, incorporadas ou revestidas em uma

grande variedade de polímeros e de outras superfícies. Em contato com a umidade, íons de prata são novamente substituídos por íons de sódio presentes no meio e emitidos para o ambiente de forma sustentável por lixiviação a partir da superfície (RAI *et al.*, 2009).

No segundo caso, o desafio reside na produção de partículas de prata em nanoescala. Este passo é mais crítico, uma vez que irá regular o tamanho, forma, distribuição de tamanho e estabilidade das nanopartículas, que por sua vez, desempenham um papel determinante na sua taxa de liberação e sua eficácia antibacteriana.

2.5 . Poli (dimetil siloxano) (PDMS) – propriedades e aplicações

O PDMS é um elastômero pertencente ao grupo de silicones e é composto por silício, carbono, hidrogênio e oxigênio. A sua cadeia principal (Número CAS 63148-62-9) consiste de unidades flexíveis de (Si-O) e dois grupos laterais (-CH₃), cuja unidade repetitiva está representada na **Figura 3**. O número de unidades repetitivas define a massa molar e, conseqüentemente, as propriedades viscoelásticas do material. Com base nas necessidades da aplicação, o PDMS pode ser reticulado e/ou formulado com cargas. Ele é um polímero altamente hidrofóbico, não-tóxico, translúcido, com temperatura de transição vítrea de -127 °C e módulo elástico de cisalhamento de cerca de 250 kPa, com uma variação de 1,1 kPa a cada mudança de 1°C na temperatura (SEETHAPATHY *et al.*, 2012). Além disso, pode ser utilizado numa ampla faixa de temperatura, i.e., de -50 °C à 250 °C (BRYDSON, 1999).

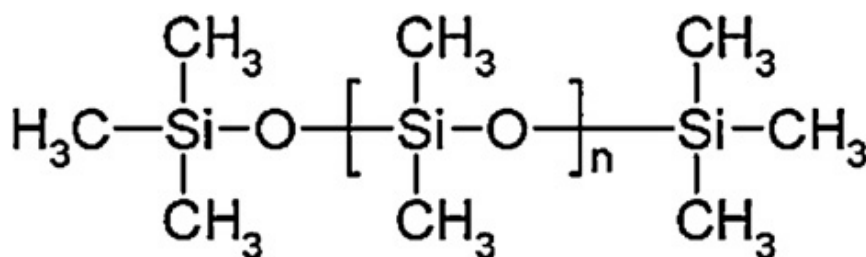


Figura 3 – Estrutura do PDMS.

Fonte: SEETHAPATHY *et al.*, 2012.

A densidade do PDMS está geralmente entre 0,91 e 1,00 g/cm³. Apesar do PDMS ser relativamente inerte em muitos produtos químicos, ele tende a inchar quando expostos a solventes hidrofóbicos, incluindo pentano, di-isopropilamina, trietilamina e xileno.

Como em solventes hidrofílicos tais como água, nitrometano, acetonitrila, dimetil sulfoxido e etileno glicol, utilizados frequentemente em química analítica, o PDMS é relativamente inerte, ele é utilizado para extrair analitos hidrofóbicos em meios hidrofílicos para a análise quantitativa, por exemplo (SEETHAPATHY *et al.*, 2012).

O PDMS é usado em uma infinidade de aplicações em sistemas de bioengenharia, eletrônicos, microfluídicos e microeletromecânicos, como também em utensílios domésticos para uso em altas temperaturas. Componentes feitos com PDMS variam de canais de fluido de selos, válvulas e bombas, misturadores, ciclers para a reação em cadeia da polimerase, separadores de eletroforese capilar a bicos *eletrospray*. As aplicações farmacêuticas incluem membranas porosas para controlar a libertação de drogas em emplastos dérmicos e revestimentos de comprimidos (MILLS *et al.*, 2008). O PDMS permite ainda a fabricação de moldes e selos para litografia e nanoimpressão de baixo custo e com dimensões/espessura de até ≈ 100 nm (CHOONEE *et al.*, 2009).

Além das aplicações citadas acima, podemos destacar o uso do PDMS na indústria de alimentos nos seguintes casos: revestimento de assadeiras; válvulas de uso industrial; bicos de mamadeiras e outros utensílios para bebês; válvulas de distribuição em embalagens de alimentos; tubulações para equipamentos de ordenha e para fins de fermentação; o-rings; rolhas para barris e garrafas de vinho; moldes/formas para cozimento em micro-ondas; espátulas de cozinha; entre outros exemplos de aplicações (FORREST, 2009).

2.6. Preparação de revestimento antimicrobiano de prata por técnicas de deposição de filmes finos

Em geral, há duas formas utilizadas para incorporar os nanocompósitos com nanop prata em superfícies: (1) polímeros com AgNPs são fabricados primeiro e, em seguida, se prendem às superfícies; (2) os polímeros são imobilizados em superfícies primeiro, seguido pela incorporação de AgNPs. Em ambos os casos, é muito importante adesão dos polímeros sobre uma superfície (GUO *et al.*, 2013).

No segundo caso, dada a maior estabilidade térmica das AgNPs, elas podem ser introduzidas em polímeros por técnicas bem estabelecidas que asseguram a distribuição homogênea das nanopartículas sobre a superfície. Entre essas, incluem-se: a implantação iônica por imersão em plasma (PIII- *ion implantation by immersion in plasma*), deposição catódica de arco por pulso filtrado no vácuo, deposição química espontânea (AEC-

autocatalytic electroless chemical plating), pulverização catódica, ou deposição física de vapor (PVD- *physical vapor deposition*). A deposição física de vapor (PVD) é usada, por exemplo, na fabricação de curativos *Acticoat* (*Smith & Nephew*, Londres, Reino Unido), permitindo a deposição de uma camada de 15 nm de espessura de nanopartículas de prata homogeneamente distribuída (DUNN *et al.*, 2004).

Além dos métodos supracitados, temos alguns mais comumente utilizados para a produção de filmes finos, são eles:

Automontagem - é um método pelo qual um revestimento multicamada / filme de camadas com nanômetros de espessura pode ser feita por adsorção sequencial de polieletrólitos de cargas opostas sobre um suporte sólido (RUDRA *et al.*, 2006; LAGARON *et al.*, 2011).

Spin coating - No processo de *spin coating*, a solução é primeiro depositada sobre o substrato, e o substrato é então acelerado para a velocidade de rotação desejada. Líquido flui radialmente, devido à ação da força centrífuga, e o excesso é ejetado para fora da borda do substrato (DAVID *et al.*, 1998).

Spray deposition - Na deposição por *spray*, o material de partida está na forma de partículas sólidas em pó; mediante injeção no plasma quente, derrete-se as partículas e, finalmente, atinge e consolida-se no substrato. Outra forma de obtenção é através de *spray* em solução (MATHUR *et al.*, 1989).

Além desses, há ainda o método de *solution blow spraying* (SBSp) que consiste na variação da técnica *solution blow spinning* (SBS) ou seja, fiação por sopro em solução, desenvolvida por MEDEIROS *et al.* (2009), consolidada na produção de fibras nano e micrométricas, que consiste na formação de fibras nanométricas utilizando uma corrente de ar pressurizada e uma solução polimérica, onde utilizando algumas variáveis (distância de trabalho, pressão do ar, solubilidade da solução, etc.) obtém-se fibras em escala nanométrica. VERAS *et al.* (2015) utilizaram esta adaptação e obtiveram êxito em seus resultados.

Logo, muitas tecnologias estão sendo aperfeiçoadas e estudos estão sendo desenvolvidos na área da produção de filmes finos, para que o custo efetivo de produção

de revestimentos seja cada vez mais competitivo. Nesse contexto, muitas técnicas consolidadas em diferentes campos de produção têm sido testadas para desenvolvimentos de embalagens (ROBERTSON *et al.* 2013).

Outro ponto a ser observado é a grande problemática dos equipamentos e tubulações de transporte de fluidos alimentícios, visto que em virtude da formação de biofilme microbiano na superfície e no interior das tubulações e equipamentos, se faz necessário uma limpeza mais rigorosa que utiliza produtos muito agressivos e tóxicos ao meio ambiente e aos consumidores em caso de contaminação. Desta forma há necessidade de desenvolvimento de artifícios para o combate a formação do biofilme.

Nesse trabalho, por exemplo, a obtenção do revestimento antimicrobiano de PDMS/AgNPs foi produzido por SBSp, em virtude do baixo custo do equipamento, como também a reprodutibilidade dos resultados obtidos, onde ajustando os parâmetros do equipamento (distância de trabalho, taxa de injeção, pressão do ar, etc.) obtém-se resultados com maior índice de reprodução em comparação com os métodos em que a interferência do operador é maior.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Diversos estudos têm demonstrado a eficiência e a aplicabilidade das embalagens ativas antimicrobianas.

SANTIAGO-SILVA *et al.* (2009) avaliaram a eficiência antimicrobiana de filmes de celulose incorporados com pediocina (ALTA 2551) na preservação de presunto fatiado. Os filmes foram testados contra *Listeria innocua* e *Salmonella choleraesuis* e mostraram-se mais eficientes na inibição de *L. innocua*, tendo reduzido o seu crescimento em até dois ciclos logarítmico em relação ao tratamento controle após 15 dias de estocagem. Em outro estudo, CAMILLOTO *et al.* (2007) desenvolveram filme poliolefinico contendo triclosan (2,4,4'-triclouro-2'-hidroxidifenil-eter) para conservação de presunto fatiado. Os presuntos acondicionados nos filmes antimicrobianos apresentaram redução de 1,5 ciclo logarítmicos para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em comparação com presunto embalado com filme controle após 12 dias de estocagem.

Sachê antimicrobiano contendo alil-isotiocinato também inibiu o crescimento de fungos filamentosos e leveduras e *S. aureus* em queijo mussarela fatiado por 12 dias de estocagem a 10 °C (PIRES, 2006). O mesmo sachê também foi capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus* em grãos de amendoim (SILVA, 2008).

DAMM *et al.*, (2006) compararam a eficácia de nano e microcompósitos de poliamida 6 com prata e verificaram que nanocompósitos com baixo teor de prata apresentaram uma eficácia muito maior contra *Escherichia coli*, do que microcompósitos com um teor de prata mais elevado.

SILVEIRA (2006) desenvolveu filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação da massa de pastel. Os resultados mostraram que essa tecnologia alternativa preserva e garante a segurança microbiológica das massas de pastel e evita o consumo de aditivos acima do permitido pela legislação.

Filmes contendo montmorilonita e lactato de sódio foram eficientes contra *L. monocytogenes*, reduzindo seu crescimento em carne bovina fresca em um ciclo logarítmico após cinco dias de armazenamento a 10 °C (SOARES *et al.*, 2007).

RHIM *et al.* (2006) demonstraram a eficácia da quitosana com base em nanocompósitos contendo nanopartículas de prata contra *E. coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*.

DEL NOBILE *et al.* (2004) estudou sobre a atividade antimicrobiana de um revestimento de poli (óxido de etileno) contendo prata sobre uma camada de polietileno. Os aglomerados de prata com tamanho de 90 nm depositados por plasma mostraram alta capacidade bactericida contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*, prolongando a vida de prateleira do sumo da maçã.

SONDI & SALOPEK-SONDI (2004) relataram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata contra *E. coli* na forma de um modelo para as bactérias gram-negativas. A partir das imagens do MEV, foram observadas a formação de agregados constituídos por nanopartículas de prata e células bacterianas mortas. Observou-se também que as nanopartículas de prata interagem com os elementos de construção da membrana bacteriana e causam danos à célula. A análise MET e estudos EDAX confirmaram a incorporação de nanopartículas de prata na membrana celular, o que foi reconhecido por formação de covas na superfície da célula. Eles concluíram que os nanomateriais poderão vir a ser simples, eficaz e adequado para a formulação de novos tipos de materiais antibacterianos.

PENA & TORRES (1991) citaram que os revestimentos podem atuar no alimento como carregadores de agentes com função específica, como: antioxidante, antimicrobiana, corante, aromática, entre outras.

RADHESKUMAR & MUNSTEDT (2006) produziram um polipropileno (PP) contendo prata com eficácia antimicrobiana e observaram que a liberação de íons de prata do nanocompósito de PP/AgNPs não é apenas um fenômeno de superfície, mas há contribuição também das AgNPs contidas na massa polimérica. Assim, as características de liberação de Ag^+ depende das características das AgNPs e da matriz polimérica utilizada.

FAYAZ *et al.* (2009) sintetizaram filmes de alginato de sódio contendo nanopartículas de prata. Os filmes foram moldados e analisados com relação a sua atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus* pelo método de difusão em disco em placas de ágar Muller-Hinton. As culturas foram diluídas com NaCl e foram aplicadas às placas, juntamente com o filme de alginato-AgNPs e o filme de alginato de sódio puro. Após incubação a 37°C durante 24 h, foram observadas zonas de inibição nítidas em torno das amostras de película de alginato-AgNPs e não em volta das amostras de película puras, indicando a eficácia antibacteriana da película de alginato-AgNPs contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Os revestimentos de alginato puros e

carregados com AgNPs foram aplicados às cenouras e peras previamente esterilizadas e aumentaram a vida útil de 6 a 10 dias, para as cenouras, e de 8 a 10 dias, para as peras.

Em outro estudo, filmes de polietileno de baixa densidade (LDPE) e nanopartículas de prata foram preparados no estado fundido em extrusora dupla rosca, e usados na forma de sacos para embalar sumo de laranja fresco a 4°C (EMAMIFAR *et al.*, 2010). O sumo foi armazenado durante 56 dias e periodicamente submetido a contagem total de placas aeróbicas e de levedura total (em placa de ágar de contagem, incubadas a 30°C durante 3 dias) e contagem de disco (em ágar de dextrose de batata +10% de ácido tartárico, incubadas a 25°C, durante 5 dias). Todas as contagens foram significativamente diminuídas na película contendo AgNPs, quando comparada com uma película de LDPE sem AgNPs. A concentração resultante de íons Ag^+ em sumo de laranja foi inferior a 10 ppm, indicando uma baixa migração de prata a partir do material da embalagem.

Filmes nanoestruturados LDPE/ Ag_2O , desenvolvidos por ZHOU *et al.* (2011), também foram capazes de diminuir deterioração microbiana em fatias de maçã.

Materiais de embalagens carregados com nanopartículas de Ag- TiO_2 também têm sido relatados na literatura por apresentar atividade antibacteriana. CHENG *et al.* (2006) modificou nanopartículas comerciais de Ag- TiO_2 (teor de cerca de 0,4 % em massa de Ag^+) em um processo de duas etapas: primeiro, a densidade de grupos hidroxilas superficiais sobre as nanopartículas foi aumentada por dispersão em ácido metanosulfônico e em seguida, numa segunda etapa, as nanopartículas foram modificados por enxertia de γ -aminopropiltrietoxisilano (APS). As nanopartículas foram misturadas com poli (cloreto de vinila) (PVC) em pó e a mistura foi moldada por compressão na forma de filmes. A concentração mínima inibitória (MIC) de nanopartículas de Ag- TiO_2 não modificadas e modificadas contra *E. coli* e *Staphylococcus aureus* indicaram que ambos os tipos de nanopartículas foram igualmente eficazes contra as bactérias (principalmente contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*), o que indica que a modificação da superfície não prejudicou a atividade antibacteriana das nanopartículas. Os nanocompósitos de PVC com Ag- TiO_2 modificadas apresentaram atividade antimicrobiana e foram mais eficazes contra *S. aureus* que contra *E. coli*.

Nanocompósitos de polietileno (PE) com AgNPs contendo maior concentração de nanop prata (5% em massa) exibiram maior liberação de íons de prata e depois de 24 h atingiram 99,99% de eficácia contra a bactéria *Escherichia Coli*, em comparação com o

PE puro. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou que as nanopartículas estavam bem dispersas por toda a matriz de polietileno (ZAPATA *et al.*, 2011).

AgNPs também foram utilizadas por MBHELE *et al.* (2003) para aumentar o módulo de elasticidade, a resistência à tração e as propriedades térmicas, aumentando a estabilidade térmica e a Tg, de uma matriz de poli (álcool vinílico) (PVAL). AN *et al.* (2008) relataram que um revestimento de PVP contendo AgNPs foi eficaz na redução do crescimento microbiano e no aumento da vida de prateleira de aspargos.

SILEIKA *et al.* (2011) empregou uma técnica de imersão simples para depositar polidopamina sobre substrato de policarbonato via polimerização de dopamina. Nanopartículas de prata foram reduzidas *in situ* e depositada sobre os substratos de polidopamina. Outra camada de polidopamina modificada por enxertia com poli (etileno glicol) (PEG) por meio da reação com grupo quinonas foi em seguida depositada sobre o revestimento, resultando em 3 camadas assim dispostas: polidopamina + AgNPs + polidopamina enxertada com PEG. A liberação de íons de prata a partir deste revestimento foi mantida por pelo menos 10 dias. Este revestimento multicamada de película fina demonstrou uma dupla função antibacteriana contra *E. coli*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, devido às nanopartículas de prata e a resistência à incrustações oferecida pelo PEG.

SEABROOK & HEYMANN (1996) (*apud* BRODY *et al.*, 2001) descreveram como a vitamina E incorporada ao plástico pode controlar a liberação do agente antimicrobiano, impedindo que quantidades prejudiciais do elemento ativo sejam liberadas.

LISTCHER *et al.* (2011) estudaram a atividade antimicrobiana de um revestimento polimérico ultrafino com nanopartículas de prata incorporadas por plasma. Este revestimento mostrou uma liberação brusca controlável de íons de prata com a taxa dependente da composição da mistura de gás. Portanto, o revestimento apresentou uma excelente atividade antibacteriana para *P. aeruginosa* e *S. aureus* durante a fase de liberação brusca e após esse período. Além disso, possuía muito boa citocompatibilidade a longo prazo, sendo, assim, muito promissor para implantes ou dispositivos médicos.

ZAPOROJTCHENKO *et al.* têm empregado co-sputtering de metais nobres e de politetrafluoretileno (PTFE) para produzir revestimentos de filmes finos. Revestimentos de Ag/PTFE e Ag-Au/PTFE mostraram propriedades antimicrobianas contra *S. aureus* e

S. epidermidis. A liberação de íons de prata pode ser controlada pela espessura do revestimento, fração em volume e composição das nanopartículas de prata, tendo o revestimento Ag-Au/PTFE apresentado maior capacidade antibacteriana do que o Ag/PTFE.

A adição direta ao LDPE de fungicidas ácidos tradicionais, como os ácidos propiônico, benzoico e sórbico, não se mostrou viável. Como esta incompatibilidade deve-se, provavelmente, a diferenças de polaridade, o problema vem sendo contornado pelo emprego do ácido na forma de anidrido, o que reduz sua polaridade. Os anidridos são relativamente estáveis termicamente e estáveis quando secos. Quando entram em contato com o alimento, a umidade do produto promove a sua hidrólise e o ácido livre formado migra para a superfície do produto, exercendo então sua função antifúngica (HOTCHKISS, 1995).

Tendo em vista os inúmeros estudos e a busca por novas perspectivas para conciliar novas técnicas e novos materiais objetivando uma aplicabilidade no uso diário da população, este trabalho teve por objetivo produzir um filme fino de PDMS através da técnica SBSp com incorporação de nanopartículas de prata na sua superfície. Foi estudado a melhor forma de incorporação das AgNPs na sua superfície, visando maximizar o combate a formação de biofilme bacteriano, tendo como foco dois micro-organismos comumente encontrados na área de alimentos. A utilização de um substrato inerte buscou não restringir as possíveis aplicações do mesmo, ou seja, seja em embalagens para alimentos, tubulações de fluidos alimentícios e utensílios usados na indústria de alimentos.

4.OBJETIVOS E METAS

Este trabalho teve por objetivo desenvolver revestimentos antimicrobianos à base de PDMS com AgNPs para a área de alimentos, utilizando a técnica *solution blow spraying* (SBSp).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar as nanopartículas de prata sintetizadas pelo método de Turkevich por espalhamento dinâmico de luz (DLS), espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis), teste de difusão em ágar e teste de toxicidade com náuplios de *Artemia salina*.
- Buscar os parâmetros ideais do SBSp para a produção de um revestimento uniforme e reprodutível com a espessura de 1 a 3 μm (taxa de injeção do polímero, distância de trabalho, pressão de saída do ar, rotação do coletor, etc.).
- Estudar a influência do grau de cura do PDMS e do método de aplicação na disposição da nanop prata no filme, por meio de medidas de ângulo de contato, formação de biofilme uniespécie bacteriano, de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectrometria de energia dispersiva de raios-X (MEV/EDS).
- Estudar a influência da concentração de prata na atividade antimicrobiana do revestimento por meio de aplicação única e múltiplas aplicações da dispersão coloidal de AgNPs sobre o revestimento de PDMS.
- Determinar a concentração de prata nos revestimentos obtidos por aplicação única e múltiplas aplicações da dispersão coloidal de AgNPs sobre o revestimento de PDMS por absorção atômica.

5.MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de produção e caracterização do revestimento de PDMS/AgNPs estão descritas no fluxograma abaixo:

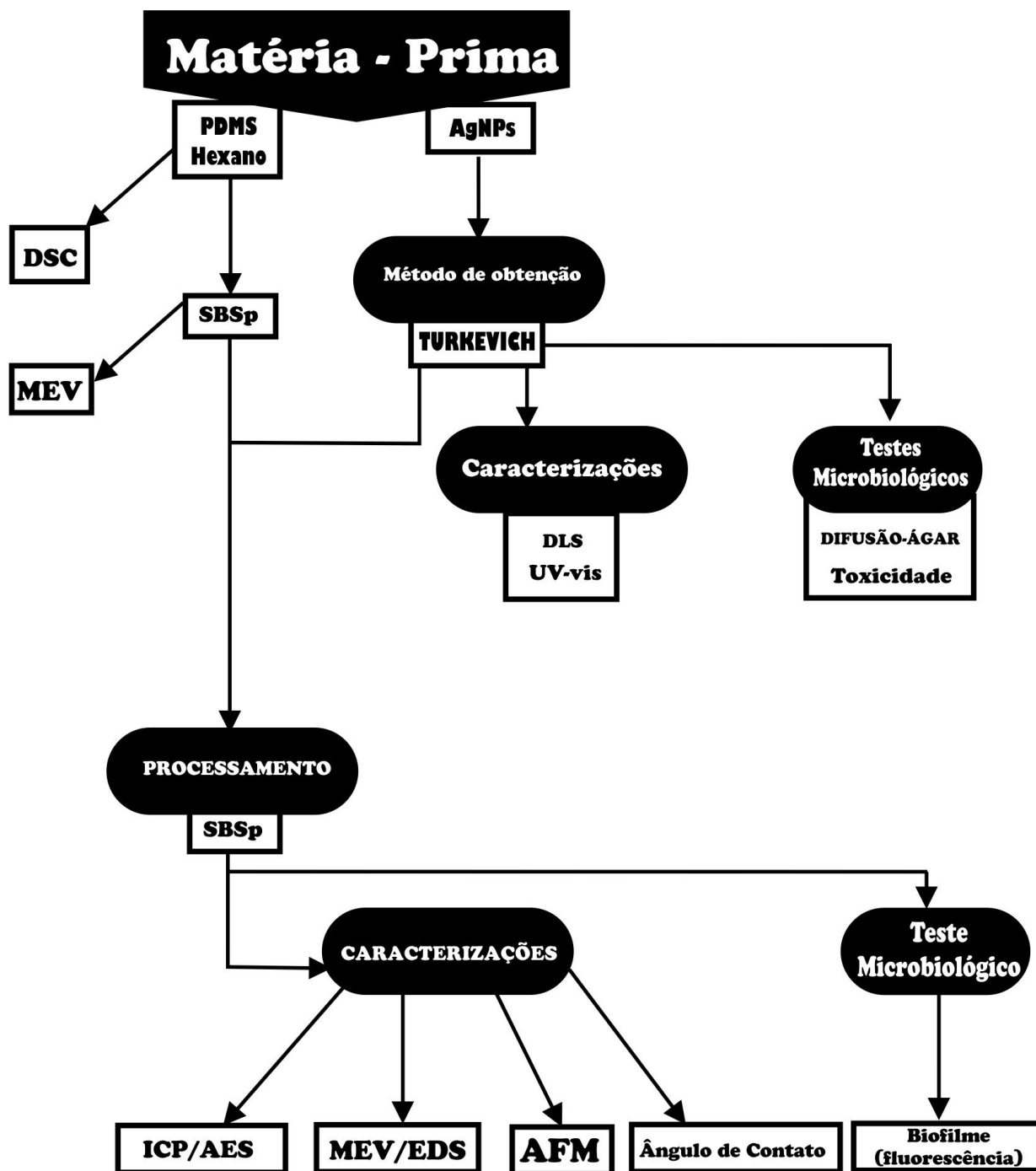


Figura 4- Fluxograma esquemático das atividades experimentais desenvolvidas

5.1 – Materiais

O poli (dimetil siloxano) utilizado para fabricação do revestimento foi o sistema bicomponente SYLGARD 184, fabricado pela Dow Corning Ltda. Como substrato alternativo nos ensaios de determinação do teor de prata foi utilizado poli (metil metacrilato) (PMMA) (ACRITOP).

Nitrato de prata (AgNO_3) (PLAT-LAB), citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7$) (VETEC), hexano (QUÍMICA MODERNA), carboximetilcelulose sódica (DENVER) e álcool isopropílico 70% (QUÍMICA MODERNA), todos com pureza analítica, foram utilizados conforme recebidos, sem nenhum processo de purificação adicional. Reagentes inorgânicos tais como: sal marinho (Real Sea[®]) e ácido nítrico a 65% (QUÍMICA MODERNA) também foram utilizados.

Nos ensaios microbiológicos foram utilizados agar BHI (*brain heart infusion*), *Hueller Hinton* ágar e kit de LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability L13152 (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Estados Unidos).

5.2 - Síntese e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs)

5.2.1 – Síntese das AgNPs

A rota de obtenção das AgNPs seguiu a metodologia proposta por Turkevich (KIMLING *et al.*, 2006), utilizando reagentes de ação biocompatível. Para a redução química do nitrato de prata utilizou-se uma solução de 1 % (m/v) de citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7$). Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa de 0,18 % (m/v) de AgNO_3 e 0,4 % (m/v) de carboximetilcelulose (estabilizante) (utilizando-se água deionizada) sob aquecimento constante a 89°C em placa de aquecimento. Em seguida, aproximadamente, 1 mL da solução de citrato de sódio a 1% foi adicionada à solução de AgNO_3 /CMC, através de uma bomba peristáltica de injeção, com velocidade de gotejamento de uma gota por segundo, sob agitação controlada durante 20 minutos, de forma a manter o controle do pH do processo de síntese das AgNPs entre 6,0-7,0.

5.2.2 – Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis)

Com a finalidade de observar a banda característica das AgNP foi realizado o ensaio de UV-Vis. O equipamento utilizado foi um espectrômetro UV-vis, modelo UV-2550, da marca SHIMADZU. A reflectância foi convertida em absorbância através de uma simples manipulação matemática. A análise por espectroscopia óptica nas regiões das radiações ultravioleta e visível (UV-vis) é utilizada para constatar a formação das AgNPs, mostrando sua banda de ressonância.

5.2.3 – Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das AgNPs foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando um equipamento de potencial zeta Delsa Nano C, Beckman. As amostras foram diluídas em água na relação de 1:50 e uma alíquota de aproximadamente 3 mL foi adicionada em uma cubeta de quartzo e analisada com ângulo de 90° e temperatura de 25°C. As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.4 – Teste de difusão em ágar

Para os testes de difusão em ágar, uma pequena alíquota do inóculo bacteriano padronizado foi semeado em meio Mueller Hinton agar utilizando um *swab* estéril para cada bactéria, sobre toda a superfície do meio (**Figura 5**).

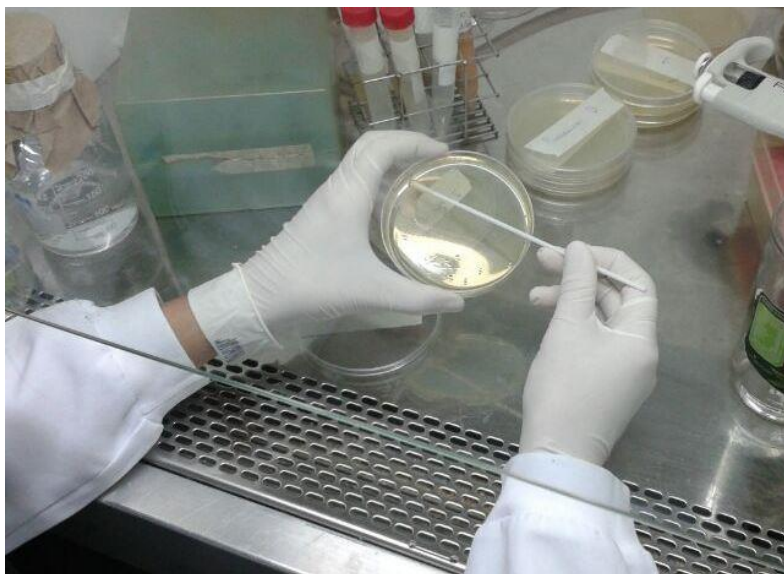


Figura 5- Cultivo com swab das bactérias em meio Mueller Hinton ágar

Em seguida, as placas foram perfuradas e em cada poço foi colocado 50 μ L das nanopartículas testadas (**Figura 6**). Para cada espécie bacteriana foram feitas três placas. As placas foram cobertas com PVC e levadas à estufa microbiológica por temperatura e tempo adequados.

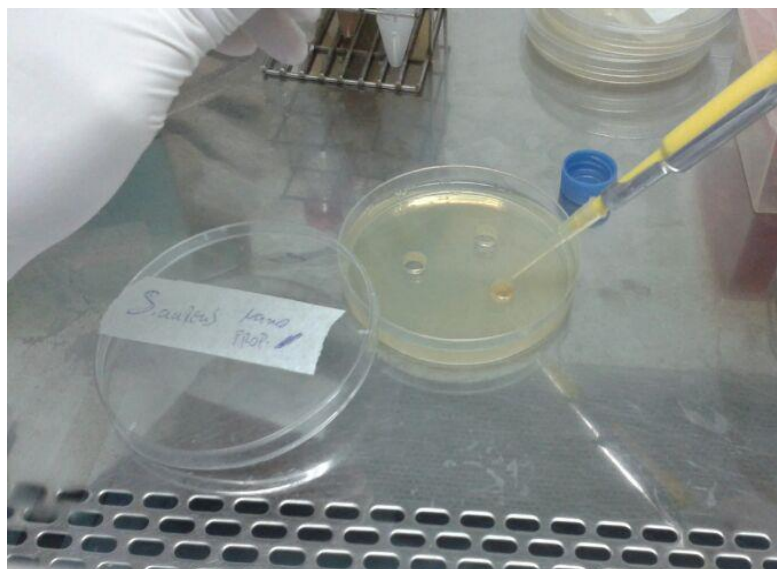


Figura 6 - Pipetagem das nanopartículas testadas na técnica de difusão em ágar

Ao término desse período as placas foram avaliadas quanto à formação ou não de halos de restrição. Os halos existentes foram medidos em seu diâmetro com paquímetro, em triplicata, incluindo a borda do poço à medida do diâmetro externo do halo.

As cepas utilizadas foram a *S.aureus* ATCC® 15656™ e *E.coli* ATCC® 8739™, padronizadas pela *American Type Culture Collection* de bactérias.

Para obtenção de um inoculo bacteriano com concentração necessária aos testes, uma alíquota de 100 µL das cepas bacterianas do estoque foi transferida para tubos de ensaio contendo 7 mL de caldo BHI (brain heart infusion) e incubadas por 48 horas em estufa a 37 °C.

5.2.5 - Teste de toxicidade com náuplios de *Artemia salina*

Para os testes de toxicidade frente a *Artemia salina* foram utilizados a metodologia proposta por MEYER *et al* (1982) com algumas modificações para adequações ambientais. Para tanto, foi utilizado um aquário com dimensões de (25x25x25) cm, iluminado por uma lâmpada de LED (**Figura 7**). Para o preparo da água marinha sintética a 3,3% foi utilizado sal marinho e água destilada oxigenada por bomba de ar comum de piscicultura ornamental doméstica. A temperatura foi mantida constante em 27 °C em sala climatizada (25 °C) e o pH estável entre 7,4 e 8,5 (comum ao seu habitat). Os náuplios de *A. salina* foram adquiridos comercialmente na forma de cistos. Uma tela divisória de 1,5 mm de abertura foi utilizada para dividir o aquário, obtendo uma sessão menor que 3/5 protegida da luz, onde foram postos os cistos. A sessão restante do aquário foi iluminada pela lâmpada de LED até a eclosão de grande parte dos cistos num prazo de 48 horas, onde os náuplios eclodidos foram coletados com pipetador automático de 100 µL.

A dispersão coloidal de nanopartículas de prata foi diluída na proporção de 1 mL para 9 mL de solução salina a 3,3%, obtendo-se assim uma solução-mãe zero (SM0). Considerando-se o colóide original na concentração de 100%, e considerando 100 mg/mL ou 100.000 µg/mL equivalente a 100%, a SM0 continha uma concentração de 10.000 µg/mL. A partir desta SM0 foram realizadas diluições decimais, obtendo-se concentrações de 1000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL.



Figura 7– Sistema de eclosão de cistos de *Artemia salina* e coleta dos náuplios .

Cada um destes colóides recebeu 10 náuplios. Os tubos foram protegidos da luz por 24 horas. Visando evitar possíveis erros de amostragem, pipetagem, entre outros e para o teste ter maior validade estatística, cada uma das doses foi realizada em quadruplicata, e em cada ensaio foi preparado um tubo controle negativo, contendo apenas 10 mL de solução salina e 10 náuplios recém-eclodidos. Passadas 24 horas da exposição dos náuplios às nanopartículas de prata, o número de indivíduos mortos (sem atividade natatória) foi mensurado em cada tubo com auxílio de uma lupa quando necessário (FINNEY, 1952; MEYER, 1982). Os experimentos foram feitos em triplicata.

A toxicidade do produto foi classificada como alta, moderada, tóxica e atóxica, quando obtida morte caracterizada por cessação da atividade natatória de 50% dos náuplios em concentrações de:

- 1000 $\mu\text{g/mL}$: atóxico
- 100 $\mu\text{g/mL}$: baixa toxicidade
- 10 $\mu\text{g/mL}$: moderada
- 1 $\mu\text{g/mL}$: alta
- 0,1 $\mu\text{g/mL}$: elevada toxicidade

5.3 - Preparação e caracterização do revestimento de PDMS

5.3.1 - Preparação da solução de PDMS em hexano

Inicialmente foi preparada uma solução de 2:1 em massa de PDMS/Hexano, em seguida à essa mistura foi adicionado o agente de cura (CA) numa proporção de 1:10 em massa de CA/PDMS, conforme recomendação do fabricante.

5.3.2 – Preparação do revestimento de PDMS

A deposição da solução de PDMS foi realizada através da modalidade de bicos concêntricos, utilizando lâminas de vidro, com dimensões aproximadas de (76,2/25,4/2) mm, como substrato. Antes da utilização, as lâminas foram imersas em etanol por 16 minutos em ultrassom e secadas a 120°C por 30 minutos. Um conjunto de 3 lâminas foram pressas em um coletor rotatório e as condições de SBSp testadas estão descritas na **Tabela 1**. O sistema de SBSp utilizado está ilustrado na **Figura 8**.

Quadro 1 - Parâmetros do SBSp testados na produção do revestimento de PDMS

Parâmetros	Amostras		
	WD ₂₀ RPM ₂₅₀ ¹	WD ₂₅ RPM ₅₀₀	WD ₂₀ RPM ₁₀₀₀
Pressão (psi)	30	30	30
Taxa de injeção (µL/min)	800	800	800
Distância de trabalho (cm)	20	25	20
Rotação do coletor (rpm)	250	500	1000
Tempo de aplicação (min)	1		

¹ WD=distância de trabalho, fixada a 20 ou 25 cm e RPM=rotação do coletor, variável de 250 a 1.000 rpm.

Após a deposição do silicone, as 3 lâminas colocadas no coletor foram levadas para a estufa, SL 104/27-SOLAB, à (70 ±5) °C por 120 minutos. Para a realização dos testes nas condições WD₂₀RPM₂₅₀ e WD₂₅RPM₅₀₀ foram modificados apenas a distância

de trabalho e a velocidade de rotação do coletor. Para a produção do nanocompósito na condição $WD_{20}RPM_{1000}$ foi mantida a distância de trabalho em 20 cm e aumentado a velocidade do coletor para 1000 rpm. Essa última condição foi realizada com o coletor aquecido por soprador térmico, marca SKILL, com uma temperatura de 70°C na base do coletor, visando iniciar o aquecimento do revestimento no próprio sistema de aplicação do SBSp e otimizar o aquecimento do substrato dentro da estufa. Em todas as condições, o tempo de aplicação do SBSp foi de 1min, com mais 4 min com o coletor girando para uniformizar o filme, resultando num tempo total de trabalho de 5 min.



Figura 8– Sistema do Solution Blow Spraying utilizado para a produção do revestimento de PDMS

5.3.3 – Determinação da espessura por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A determinação da espessura do revestimento de PDMS produzido via SBSp foi realizada em um microscópio Carl Zeiss modelo LEO-430, analisando a seção transversal da fratura criogênica do revestimento de silicone depositado sobre lâminas de vidro, colocadas no porta-amostra formando um ângulo de 90° com a sua base. As amostras foram revestidas com uma camada de ouro de 1-10nm usando um Sputter Coater de plasma de argônio modelo EMITECH K550X e observadas com uma tensão de aceleração entre 10-20kV.

5.3.4 – Determinação do tempo de cura por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Através do ensaio de DSC, foi possível estudar o comportamento de cura do PDMS para definir intervalos de tempo regulares para deposição das AgNPs, usando um equipamento modelo DSC 60 da marca SHIMADZU. Uma amostra da mistura do agente de cura (CA) com silicone numa proporção de 1:10 em massa (CA/PDMS), recém preparada, com cerca de 4,5 mg foi aquecida da temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) até 75°C numa taxa de aquecimento de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, permanecendo por 1 hora e 10 minutos nesta condição. A lenta taxa de aquecimento teve como objetivo simular o aquecimento do material na estufa, considerando as características de baixa condutividade térmica do vidro e também, as condições de condução de calor dentro da estufa, assim como as perdas térmicas decorrentes da transferência dos revestimentos da estufa para o sistema de SBSp e vice-versa. Além de permitir registrar o evento de cura de forma controlada, estimando os diferentes graus de cura de forma subestimada e consequentemente, garantindo que as aplicações das AgNPs ocorram após o tempo de pré-vulcanização (tempo de *scorch*) da resina.

5.4 - Preparação e caracterização dos revestimentos de PDMS/AgNPs

5.4.1 Preparação do revestimento de PDMS/AgNPs por aplicações únicas e múltiplas

A partir do ensaio de DSC, o tempo total de cura do silicone foi fragmentado em 5 intervalos definidos (t_i), são eles: início (t_0), $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ e término (t_f). Esses tempos foram utilizados num primeiro momento para determinar o grau de cura ótimo do revestimento para iniciar a aplicação das AgNPs, de forma a garantir o posicionamento mais exposto possível das nanopartículas no revestimento, sem contudo, prejudicar seu ancoramento na superfície. Nesse caso, os diferentes tempos de cura do revestimento foram correlacionados com o grau de cura pela razão entre o calor parcial da reação em cada intervalo de tempo pré-estabelecido e o calor total da reação de cura. Como foi realizado uma única aplicação em estágios de cura diferentes, i.e., após condicionamento do revestimento na estufa, SL 104/27-SOLAB, à $(70 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ no respectivo intervalo de tempo de cura pré-determinado por DSC, esse método de aplicação das AgNPs foi denominado de “aplicação única”.

Num segundo momento, objetivando aumentar a concentração de nanop prata na superfície do revestimento, foi iniciada uma nova aplicação de AgNPs sobre o mesmo revestimento de silicone, pré-vulcanizado em estufa, SL 104/27-SOLAB, à $(70 \pm 5) ^\circ\text{C}$, em cada um dos intervalos de tempo pré-selecionados, totalizando 5 aplicações consecutivas. Nos intervalos entre uma aplicação e outra, o revestimento foi mantido sobre o coletor aquecido no modo estático. Esse método de aplicação foi denominado de “aplicações múltiplas”.

Essas condições e as respectivas nomenclaturas utilizadas estão descritas na **Tabela 2**.

A deposição da dispersão coloidal de AgNPs foi realizada sobre o coletor rotatório pré-aquecido pelo soprador térmico, numa temperatura de 70°C (a mesma utilizada na estufa), no modo de bicos concêntricos, sendo as AgNPs aspergidas pelo bico interno, de acordo com as seguintes condições de aplicação: pressão de injeção: 30 psi; taxa de injeção: $1000 \mu\text{L}/\text{min}$; rotação do coletor: 250 rpm; distância de trabalho: 20 cm; e tempo total de aplicação: 1 min. Terminada a aplicação das AgNPs, os revestimentos eram retornados para a estufa, SL 104/27-SOLAB, à $(70 \pm 5) ^\circ\text{C}$ até completar os 120 minutos de cura recomendado pelo fabricante.

Tabela 2 - Tempos escolhidos para início da deposição das AgNPs.

		Tempo de início da deposição das AgNPs				
Método de preparação	Identificação	t_0	$t_{1/4}$	$t_{1/2}$	$t_{3/4}$	t_f
Aplicação única	t_0	X				
	$t_{1/4}$		X			
	$t_{1/2}$			X		
	$t_{3/4}$				X	
	t_f					X
Aplic. múltiplas	t_{multi}	X	X	X	X	X

5.4.2 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplada a espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDS)

As micrografias e os mapeamentos da prata por EDS dos revestimentos foram obtidos utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss modelo Leo 440 acoplado com um detector de energia dispersiva de raios X (EDS). A superfície dos revestimentos depositados sobre lâminas de vidro foram revestidas com uma camada de ouro de 1-10nm usando um Sputter Coater de plasma de argônio modelo EMITECH K550X e observadas com uma tensão de aceleração entre 10-20kV.

5.4.3 – Determinação do teor de prata dos revestimentos

5.4.3.1 – Preparação das amostras

Para a análise por absorção atômica, os revestimentos foram preparados de forma a garantir as mesmas condições descritas anteriormente, utilizando como substrato placas de poli (metil metacrilato) (PMMA) em substituição às lâminas de vidro para evitar interferências provenientes da deformação do vidro durante o procedimento de calcinação. Após a deposição do PDMS/AgNPs nas placas de PMMA, as amostras foram postas em cadinhos e queimadas em bico de Bunsen para decomposição controlada da fração polimérica, incluindo o substrato. Depois, a amostra resultante foi calcinada em mufla utilizando uma taxa de aquecimento de 1°C/min da temperatura ambiente até 800°C com isoterma de 2 h a 800°C. Terminada a programação de aquecimento, a mufla foi automaticamente desligada e deixada até no mínimo 100°C para retirada dos cadinhos que foram transferidos para dessecador.

As cinzas resultantes de cada amostra foram recolhidas num recipiente fechado e diluídas em 10 mL de ácido nítrico a 65 % (m/v), utilizado para garantir limpeza completa dos cadinhos. Esse procedimento foi realizado utilizando uma placa para cada condição de aplicação das AgNPs e em duplicata apenas para as amostras $t_{1/2}$ e t_{multi} . Um branco, isto é, uma amostra contendo apenas o substrato de PMMA também foi preparada para detectar eventual interferência do substrato de PMMA nos resultados do teor de prata.

5.4.3.2 - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES)

A determinação do teor de prata nas amostras, dissolvidas em ácido nítrico e preparadas conforme subitem 5.4.3.1, foi efetuada utilizando um espectrômetro de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP 03) da Varian, modelo Vista MPX. Um nebulizador de vidro foi utilizado para introdução das amostras no ICP-AES. O gás utilizado para geração do plasma foi o argônio comercial (99,997%) com fluxo de 15 L/min, o qual também foi utilizado como gás de nebulização e auxiliar num fluxo de 0,7 e 1,5 L/min, respectivamente. Essa análise foi realizada em triplicata e o limite de detecção do método foi de 0,03 mg/cm².

5.4.4 - Microscopia de força atômica (AFM)

A morfologia dos revestimentos de PDMS/AgNPs foi avaliada no microscópio de força atômica da Shimadzu SPM 9600. Os revestimentos de PDMS puro e de PDMS/AgNPs obtidos pelo método de aplicação única e múltiplas foram reduzidos para um quadrado de 10mm² de área, sendo seccionado a partir da região central de cada placa de forma padronizada para todas as amostras. As imagens de AFM foram obtidas no modo dinâmico, usando uma taxa de varredura de 1Hz com ponta de Si de raio de curvatura inferior a 10nm.

5.4.5 – Determinação do ângulo de contato

Visando verificar a influência das diferentes condições de aplicação das AgNPs na hidrofobicidade dos revestimentos obtidos, foram realizadas medidas de ângulo de contato pelo método da gota séssil, utilizando um goniômetro HTM Reetz GmbH modelo DSAHT-12 (marca KRÜSS), regulado para 5µL de água destilada. As imagens foram capturadas por uma câmera e armazenadas pelo software Pinnacle Studio 8. Posteriormente, o ângulo de contato foi obtido pelo programa Stüffens. As medidas foram realizadas para as amostras de PDMS/AgNPs obtidas pelo método de aplicação única e múltiplas. Uma vez que a rugosidade dos revestimentos de PDMS/AgNPs e

consequentemente, seu grau de hidrofobicidade, depende do grau de exposição superficial das nanopartículas e da aspersão da dispersão coloidal de AgNPs sobre o revestimento de silicone com diferentes grau de cura, revestimentos de PDMS aspergidos com solução aquosa a 0,4 % (m/v) de carboximetilcelulose sódica sem AgNPs também foram preparados utilizando as mesmas condições dos revestimentos PDMS/AgNPs para determinar o efeito isolado da aspersão da solução aquosa na hidrofobicidade dos revestimentos de PDMS. Essas amostras foram identificadas seguindo o mesmo padrão de nomenclatura dos revestimentos de PDMS/AgNPs, porém inserindo o termo PDMS antes de cada nomenclatura. Os valores apresentados referem-se à média de 20 determinações.



Figura 9 – Preparação para o ensaio de ângulo de contato.

5.4.6 – Formação de biofilme

5.4.6.1 – Preparação da amostra

Para o estudo de formação de biofilmes foram utilizados corpos de prova de alumínio de 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, fabricados em torneiro mecânico. Os revestimentos de PDMS sem e com AgNPs, preparados pelo método de aplicação única e múltiplas, foram depositados em uma de suas faces, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente.

5.4.6.2 – Análise de biofilme por fluorescência

Os corpos de prova foram colocados e imersos em placas para cultura de células de 24 poços imersos em 1,6 mL de ágar BHI (Brain Heart Infusion caldo HiMedia™) e 0,4 mL de inóculo bacteriano padronizado para 0,5 na Escala de Mcfarland. Depois, essas placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas.



Figura 10 – Placas de culturas utilizadas no ensaio.

As espécies bacterianas testadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC e *Escherichia coli* ATCC. Concluído o período de incubação, os corpos de prova foram então imersos suavemente em solução salina estéril a 0,9% por 30 segundos até a remoção do excesso de células planctônicas sobre sua superfície. Para remoção do biofilme e sua posterior análise, os corpos de prova foram transferidos para novas placas de cultura de células estéreis contendo 2 mL de solução salina estéril a 0,9% e levados ao sonicador por 2 minutos.

A solução contendo o conteúdo celular do biofilme desorganizado ou desagregado foi quantificada por fluorescência e uma alíquota de 30 µL desta foi transferida para microplacas pretas (FLUOTRACT™, Greiner Bio-One, Ray Lab, New Zealand) próprias para fluorescência. Cada poço contendo as soluções analisadas recebeu mais 30 µL da solução do usando kit de LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability L13152 (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Estados Unidos).

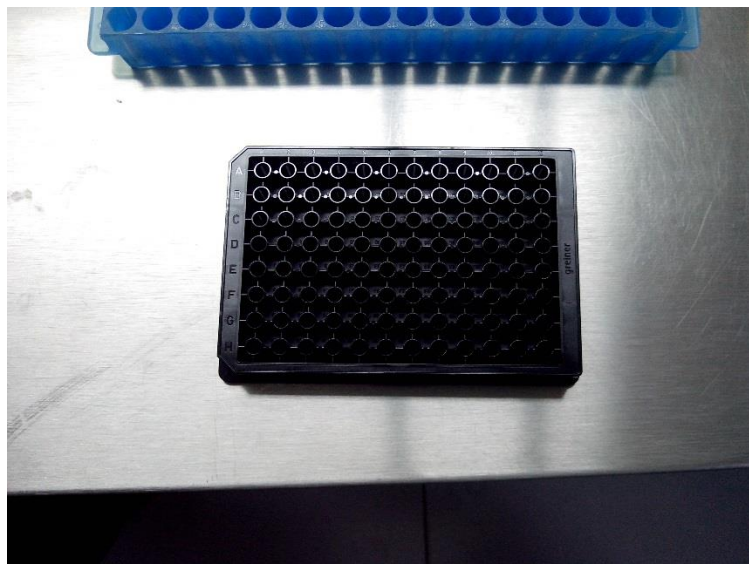


Figura 11– Microplacas utilizadas para realização da fluorescência.

Para análise do biofilme, foi preparado um referencial de calibração de 2 pontos a partir de um inóculo preparado previamente, sendo um ponto contendo 100% de bactérias vivas e outro contendo 100% de bactérias mortas, isto é, bactérias submetidas à imersão em álcool isopropílico a 70% por 1 hora, centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, tendo descartado o sobrenadante e recuperado a massa bacteriana suspensa em solução salina a 0,9%. Os dois pontos referenciais foram colocados na concentração de 0,5 da Escala de McFarland.

Após cada poço da placa de fluorescência receber 30 μ L da solução contendo biofilme e 30 μ L do reagente de fluorescência, esta foi coberta com alumínio para evitar exposição à luz por 10 minutos. Decorrido este tempo, as placas foram analisadas em aparelho analisador tipo FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) (FILOCHE, WONG e SISSONS, 2010).

O reagente possui dois corantes (SYTO 9 e Iodeto de propídio) que permitem identificar células com membrana celular danificada. O SYTO 9 (verde) cora geralmente todas as bactérias numa população, tanto aquelas com membranas intactas, quanto aquelas com membranas danificadas. O iodeto de propídio (vermelho) penetra apenas bactérias com membranas danificadas, causando uma redução na fluorescência do corante SYTO9, quando os dois corantes estão presentes na amostra. A excitação/emissão máximas para estes corantes são cerca de 480/500 nm para SYTO9 e 490/635 nm para o iodeto de propídio (NETUSCHIL *et al.* 2014).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 – Caracterização das AgNPs

6.1.1 - Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis)

O espectro de UV-Vis das AgNPs está apresentado na **Figura 12**.

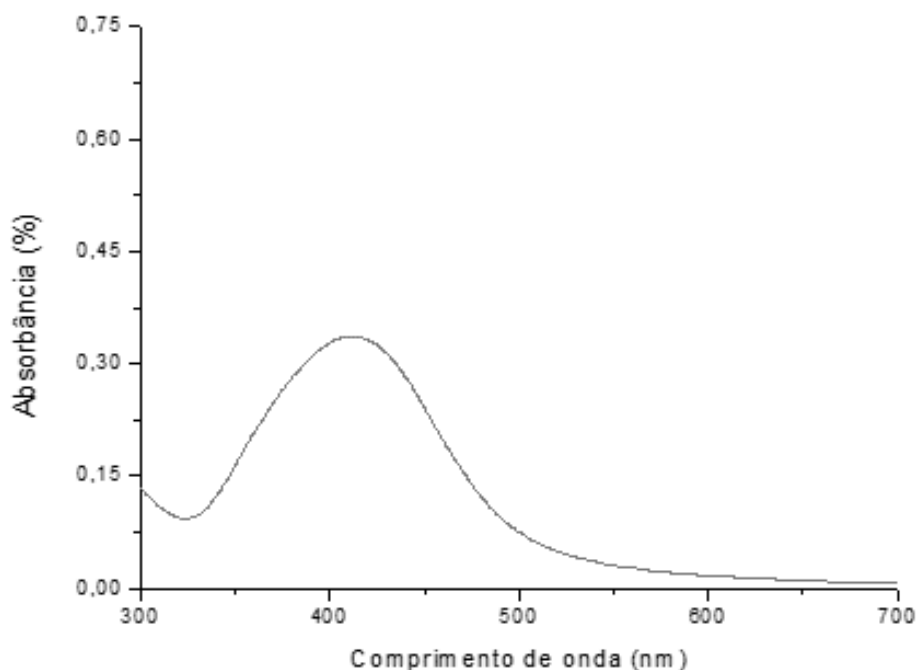


Figura 12– Espectro de UV-vis das AgNPs obtida pela rota de TURKEVICH.

Este espectro mostra um ombro perto de 420 nm, indicando que a amostra analisada possui o comportamento característico de nanopartículas de prata, conforme demonstrado por WANG *et al.* (2008). De acordo com esses autores, o comprimento de onda característico da absorção das AgNPs ocorre em torno de 400 nm e a posição da banda de absorção está diretamente relacionada ao tamanho médio das partículas, sendo menor quanto menor o comprimento de onda do máximo de absorção. Assim, partículas maiores levam ao deslocamento da banda de absorção para comprimentos de onda maiores e quando o deslocamento é para comprimentos de onda menores, partículas de menor dimensão são formadas. Além disso, o formato das nanopartículas também depende da posição da banda de absorção, sendo mais circular, quanto mais próximo de

400 nm for o seu máximo de absorção. Os espectros com bandas de absorção largas, como o mostrado na **Figura 12**, mostraram a obtenção de uma amostra com grande dispersão de forma e tamanho.

6.1.2 – Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O tamanho médio das AgNPs determinado por DLS foi de 170,5 nm e índice de polidispersão de 0,295 (**Apêndice A**). As populações das AgNPs foram localizadas em 160,6 nm (com intensidade fixada em 72% de volume) e 180,3 nm (volume de 73,2% de intensidade). A faixa de variação de tamanho foi de 9-14 nm a 1100-1120 nm, indicando uma ampla faixa de variação do tamanho das nanopartículas, conforme previamente sugerido pelo formato da banda de absorção na região do UV-vis.

Esta ampla faixa de tamanho, como também a dispersão das populações obtidas, é em virtude do agente redutor utilizado, citrato de sódio, onde resultados similares foram obtidos por ZEENA *et al.* (2004) no estudo da influência do agente redutor no tamanho e na dispersão das nanopartículas obtidas.

6.1.3 - Teste de difusão em ágar das nanopartículas sintetizadas

De acordo com os resultados obtidos (**Figura 13**), as AgNP resultantes da síntese de Turkevich apresentaram atividade antimicrobiana contra os 2 microrganismos estudados, *S. aureus* e *E. coli*. Houve formação de halo de inibição com o valor médio de 1,534 mm para o *S. aureus* e 2,739 mm para *E. coli*, tendo a *E.coli* apresentando um halo mais nítido. Logo, sua ação bactericida foi maior contra o microrganismo *E. coli* (Gram-negativa), pelo fato de sua membrana plasmática possuir maior número de elétrons livres que a do *S. aureus* (Gram-positiva). Independentemente, pode-se demonstrar a eficácia das AgNPs contra as modalidades de bactérias: Gram-positivas e Gram-negativa, como também uma difusão das nanopartículas para o meio coloidal/sólido.

Esse resultado indica também que há difusão da prata para o meio de cultura e logo, a importância de quantificar o teor de prata difundido para simulantes de alimentos nas condições de uso.

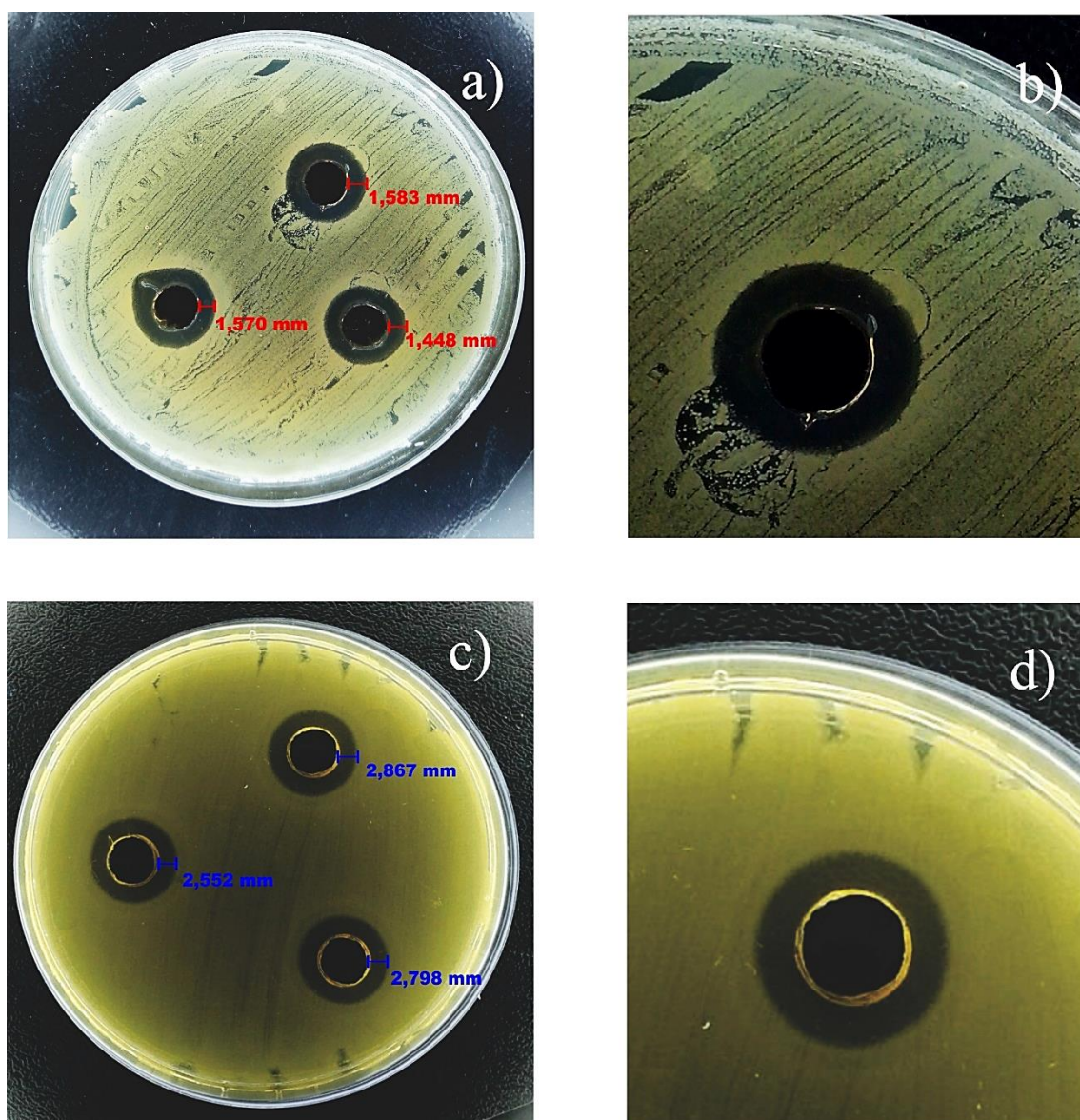


Figura 13- Resultados do teste de difusão em ágar das AgNPs para *S.aureus* (a e b) e *E.coli* (c e d)

6.1.4 - Teste de toxidade com náuplios de *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade das AgNPs frente ao modelo animal *Artemia salina* não revelou a DL50 ou CL50 (dose letal ou concentração letal mínima de 50%) para qualquer das amostras testadas, mesmo nas concentrações de 1000 µg/mL. Em todos os tubos que continham concentrações equivalentes a 1000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL de AgNPs não foram observados náuplios de *Artemia salina* mortos. Logo, esse ensaio mostrou que as AgNPs testadas são atóxicas quanto ao efeito sobre o meio.

Tabela 3 - Resultados da toxidade para *Artemia salina* nas concentrações propostas.

Amostra	C1	C2	C3	C4	C5
TURKEVICH	1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1 µg/mL
	0%	0%	0%	0%	0%

Este ensaio biológico, usado para avaliar a toxicidade aguda, é considerado um ensaio preliminar no estudo de compostos com potenciais atividades biológicas. Em geral, esses invertebrados são muito utilizados em experimentos de ecotoxicologia ou como alternativa ao teste de irritação em coelhos.

6.2 – Caracterizações do revestimento de PDMS

6.2.1 – Determinação da espessura por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas para as diferentes condições de aplicação do revestimento de silicone por SBSp estão apresentadas na **Figura 14**.

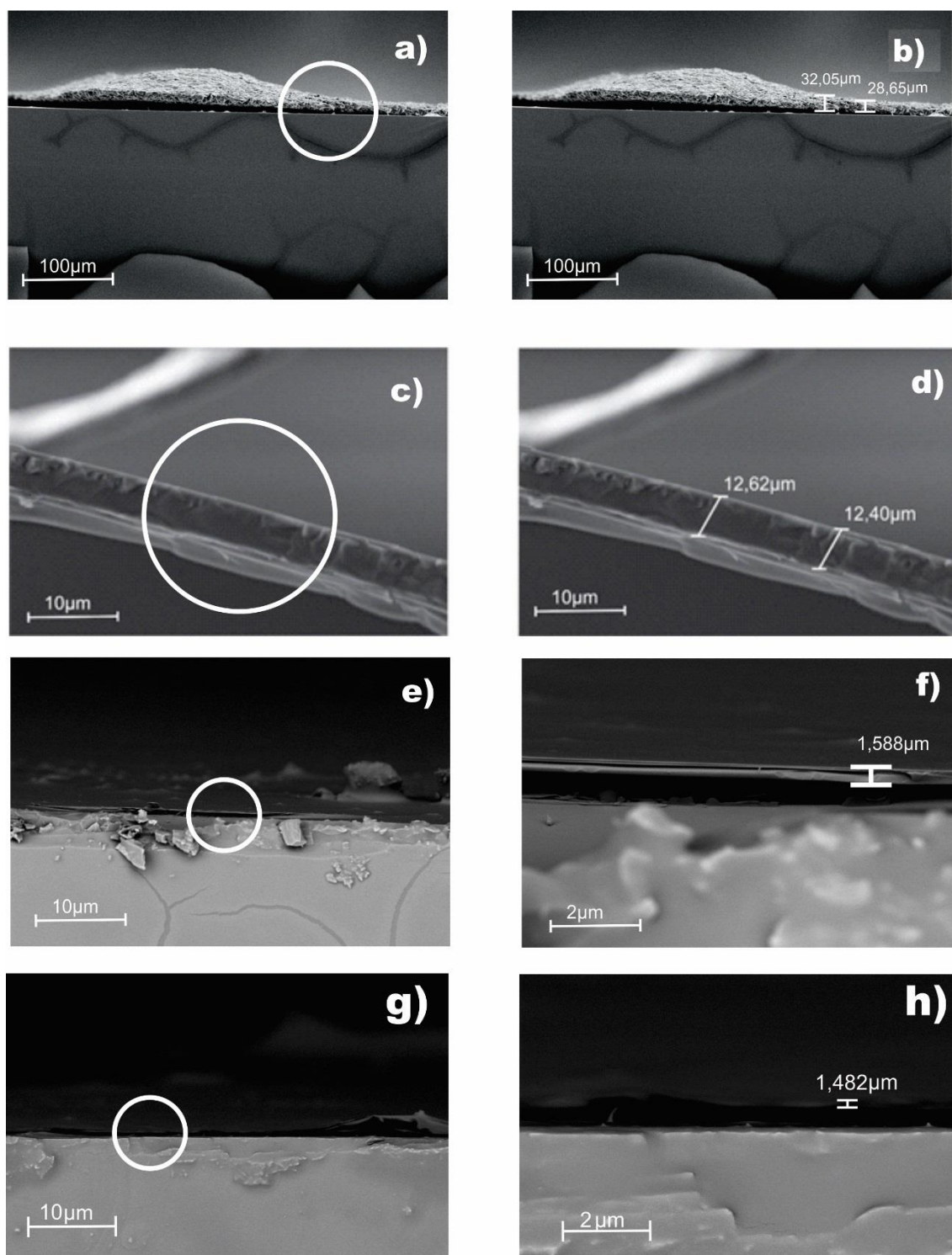


Figura 14– Micrografia dos revestimentos de silicone WD₂₀RPM₂₅₀ (a-b), WD₂₅RMP₅₀₀ (c-d) e WD₂₀RPM₁₀₀₀ (e-h) aplicado sobre a lâmina de vidro por SBSp com diferentes magnificações.

A partir da **Figura 14a** e **14b** é possível constatar a formação do revestimento, com distribuição não uniforme e apresentando espessura superior à proposta para o

desenvolvimento deste trabalho ,1~3 μm (CHOONEE *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2014). Logo a condição WD₂₀RPM₂₅₀ foi considerada insatisfatória para este trabalho.

Apesar da redução significativa da espessura com o aumento da distância de trabalho e rotação do coletor, a condição WD₂₅RPM₅₀₀ (Figura 14c e 14d) não atingiu o resultado desejado, pois a espessura média do revestimento ficou em torno de 12,51 μm . Apenas uma melhora na sua uniformidade foi observada.

Por último, tem-se que o aumento da rotação do coletor para 1000 rpm mantendo a distância de trabalho em 20 cm reduziu a espessura do revestimento para aproximadamente $(1,42 \pm 0,2) \mu\text{m}$, alcançando assim a espessura desejada (Figura 14e-h). Além disso, tem-se que a espessura do revestimento mostrou-se uniforme ao longo de todas as seções transversais analisadas. Logo, esta condição foi definida como ideal para o desenvolvimento deste trabalho e foi utilizada para aplicação do silicone sobre o substrato de vidro.

Esse estudo preliminar também permitiu concluir que a distância de trabalho e a rotação do coletor foram variáveis determinantes do SBSp para a obtenção de filmes finos de PDMS. A primeira variável está relacionada com o alcance do leque da solução aspergida pelo bico de aplicação e o segundo fator está relacionado com a uniformidade e redução da espessura do revestimento através de utilização de força centrífuga.

6.2.2 – Determinação do tempo de cura por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A curva de cura do PDMS está apresentada na **Figura 15**. O pico exotérmico indicado com dois asteriscos (**) é resultado de uma liberação rápida de calor, referente à combustão de gás hidrogênio e produtos inflamáveis proveniente do agente de cura (CORNING, 2013). O restante da curva, a partir do ponto 2 (dois) apresenta-se no formato característico de um processo de cura padrão.

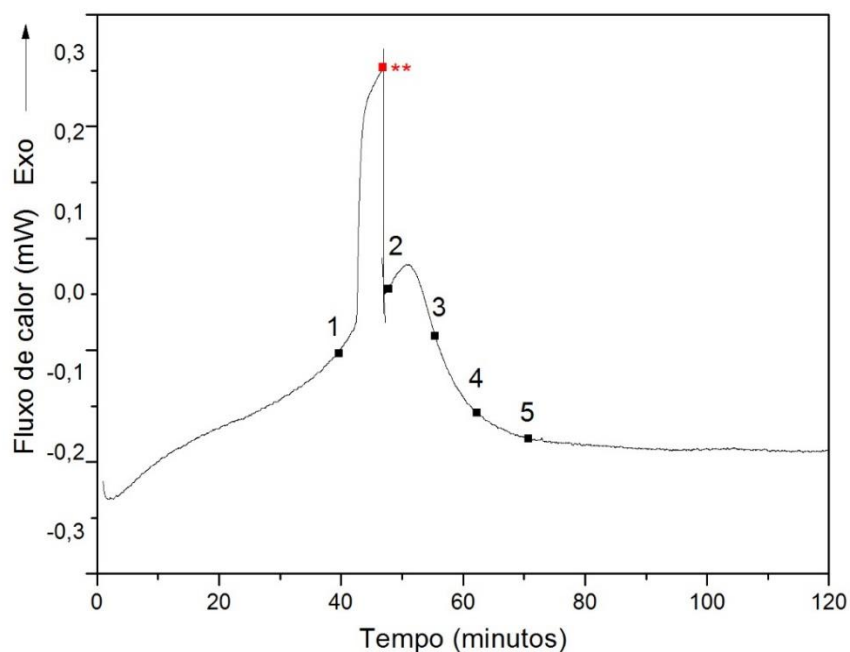


Figura 15– Isoterma de cura do PDMS

A partir desse perfil de cura (**Figura 15**), os tempos para aplicação das AgNPs foram estimados subdividindo-o em 4 intervalos iguais. Assim, foi considerado que o processo de cura do PDMS iniciou após 40 minutos do início do aquecimento do PDMS e terminou após 70 minutos, tendo, portanto, uma duração de 30 minutos. Esse tempo foi subdividido em 4 intervalos iguais, que corresponde a intervalos de 7 minutos e 30 segundos, cada. Assim, os intervalos de tempo estabelecidos para aplicação das AgNPs sobre o revestimento de PDMS foram: $t_0 = 40$ min; $t_{1/4} = 47,5$ min; $t_{1/2} = 55$ min; $t_{3/4} = 62,5$ min; e $t_f = 70$ min.

6.3 – Caracterizações dos revestimentos de PDMS/AgNPs

6.3.1 - Microscopia eletrônica de varredura acoplada a espectrometria de energia dispersiva de raios-X (MEV/EDS)

As micrografias de MEV e o mapeamento da prata dos revestimentos obtidos por aplicação única em diferentes tempos e por aplicações múltiplas estão apresentados nas **Figuras 16 e 17**, respectivamente.

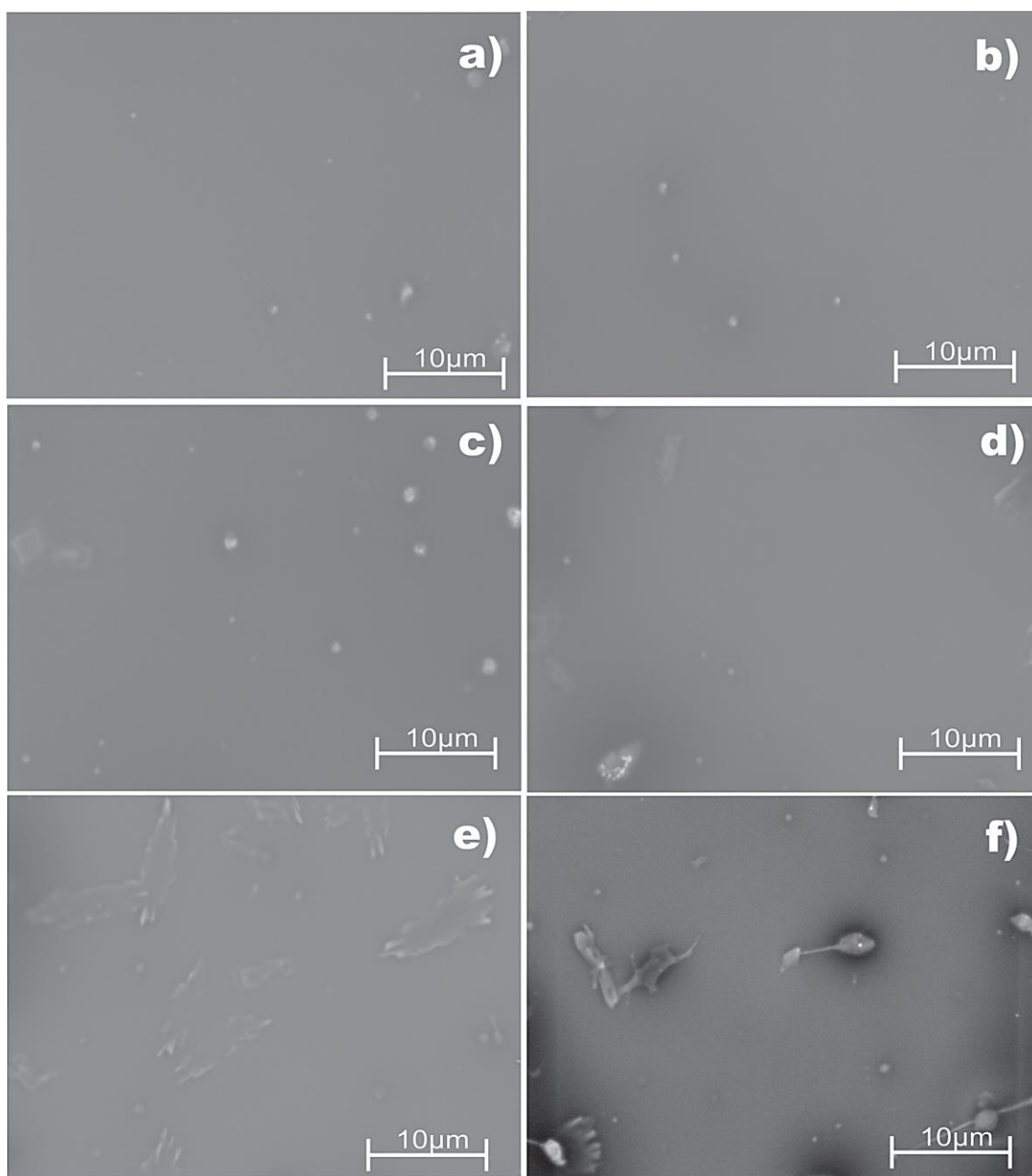


Figura 16 –Micrografia de MEV das amostras: a) t_0 , b) $t_{1/4}$, c) $t_{1/2}$, d) $t_{3/4}$, e) t_f e f) t_{multi} .

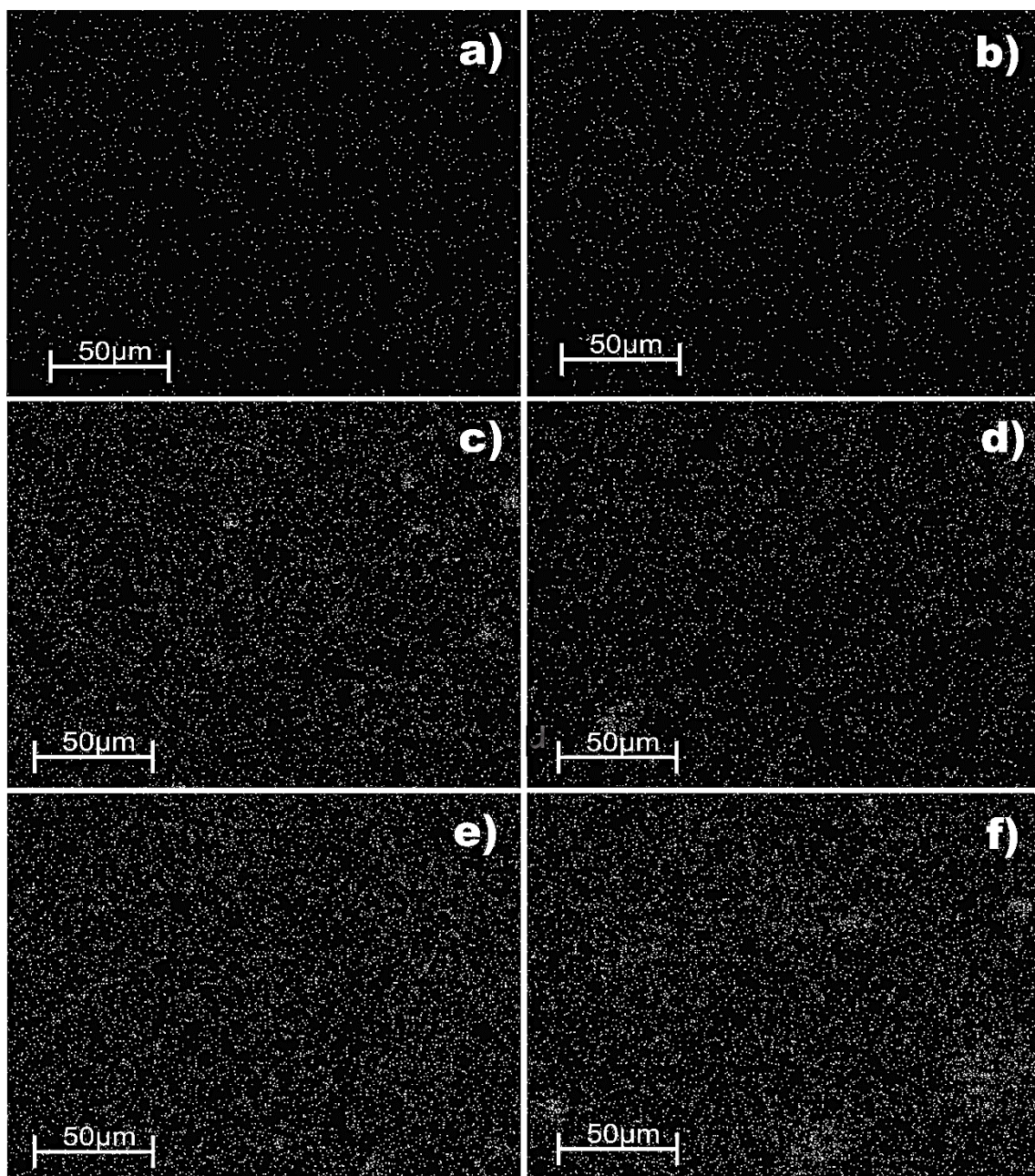


Figura 17 - Mapeamento da prata nas amostras obtido por EDS: a) t_0 , b) $t_{1/4}$, c) $t_{1/2}$, d) $t_{3/4}$, e) t_f e f) t_{multi} .

Através das micrografias da superfície das amostras, pode-se observar um aumento significativo de pontos de aglomeração de AgNPs, pontos mais claros, com o aumento do tempo para início da aplicação das AgNPs, ou seja, com a aplicação das AgNPs sobre o revestimento de PDMS com maior grau de cura (**Figura 16**). Essas aglomerações ficaram ainda mais nítidas para o revestimento de PDMS preparado por aplicações múltiplas.

Este comportamento é justificado pelo aumento da viscosidade do silicone com o decorrer do tempo de cura que acabou favorecendo o ancoramento das AgNPs sobre sua superfície.

A partir dos mapas composicionais da prata nos revestimentos, pode-se observar a presença das nanopartículas de prata, identificada pelos pontos brancos, em todas as condições propostas e sua disposição de forma geral uniforme em todas as amostras. Conforme esperado, foi também possível perceber uma maior concentração de prata na amostra t_{multi} . No caso das amostras preparadas pelo método de aplicação única, a presença de prata aumentou nas amostras preparadas em tempos de cura iguais ou maiores à metade do tempo total de cura do PDMS, indicando um melhor ancoramento das nanopartículas na superfície do revestimento nessas condições. Para as amostras t_0 e $t_{1/4}$, o ancoramento das AgNPs na superfície ficou comprometido, indicando que o grau de cura do PDMS é insuficiente para promover a adesão das nanopartículas no revestimento (**Figura 17**).

6.3.2 - Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES)

Para as amostras preparadas pelo método de aplicação única foram obtidos valores de teor de prata abaixo de $0,0311 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, limite de detecção do método analítico. Para a amostra t_{multi} , foi obtido um valor médio de $0,0471 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de teor de prata por unidade de área de filme aplicado no substrato utilizado. Para a amostra de PDMS puro não foi detectado a presença de prata no revestimento, conforme exposto pela **Tabela 4**.

Tabela 4 - Teor de prata nos revestimentos

Amostras	Teor de Prata ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PDMS	n.d ¹
t ₀	< 0,0311
t _{1/4}	< 0,0311
t _{1/2}	< 0,0311
t _{3/4}	< 0,0311
t _f	< 0,0311
t _{multi}	0,0471 $\pm$ 0,0004 ²

¹ n.d. – não detectado; ² Valores da média e desvio padrão da triplicata.

Como esperado, as múltiplas aplicações de AgNPs sobre o revestimento de PDMS produziu um revestimento com maior teor de prata que aqueles preparados com uma única aplicação de AgNPs. Dado esse comprovado anteriormente pelas micrografias e mapa composicional da prata obtidos de MEV/EDS. No entanto, diferenças no teor de AgNPs em função do tempo de cura do PDMS não puderam ser detectadas e correlacionadas com as diferenças observadas anteriormente por MEV/EDS.

6.3.3 - Microscopia de força atômica (AFM)

Pela microscopia de força atômica das amostras estudadas foi possível verificar a influência do tempo de cura do PDMS e do método de preparação do revestimento na topografia do revestimento, assim como na dispersão das AgNPs (**Figura 18**).

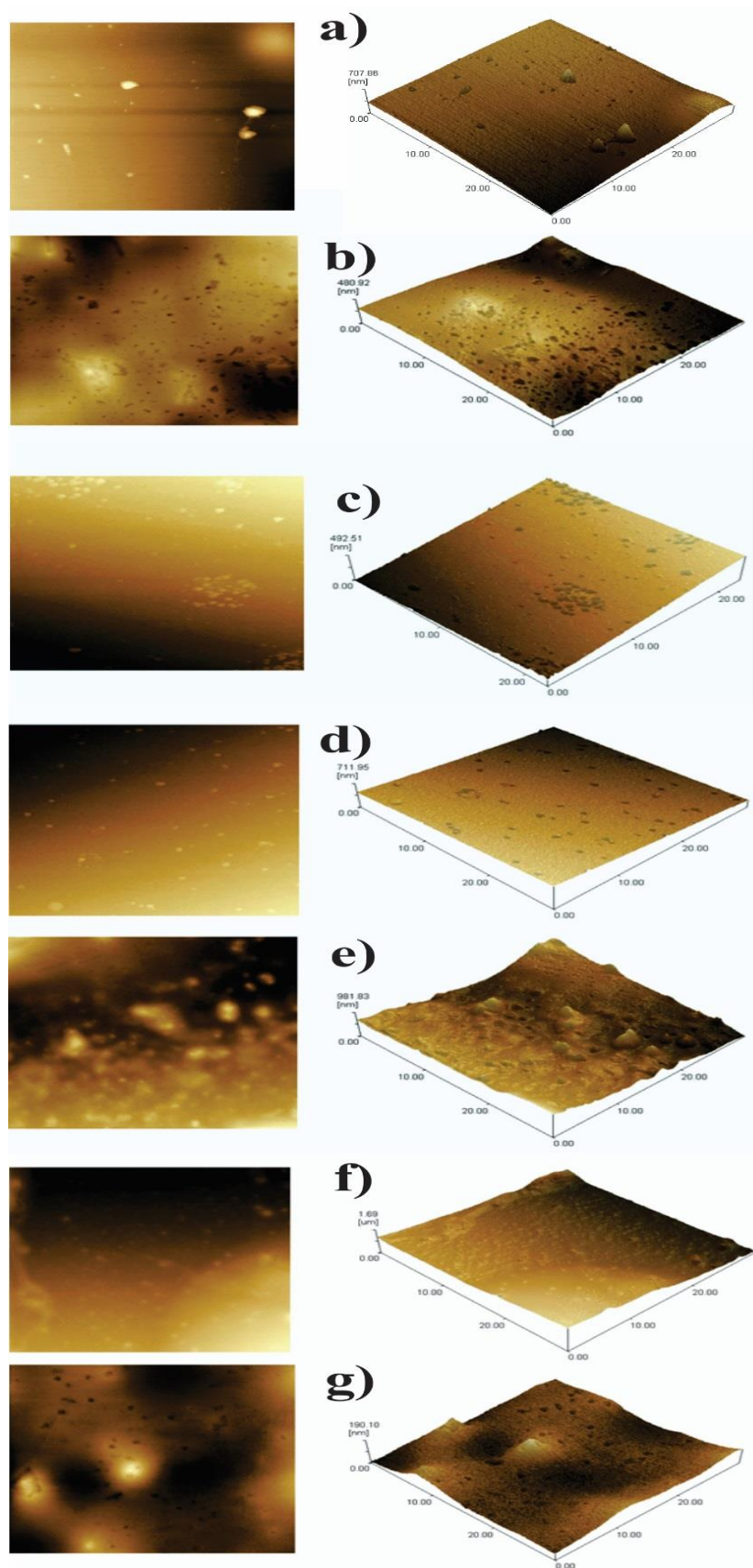


Figura 18 - Imagens da área 2D e 3D por AFM da amostra: a) PDMS, b) t_0 , c) $t_{1/4}$, d) $t_{1/2}$, e) $t_{3/4}$, f) t_f e g) t_{multi} . ($30 \times 30 \mu\text{m}^2$ área escaneada)

Pode-se observar que a superfície da amostra de PDMS puro apresenta algumas irregularidades superficiais, sendo algumas maiores e outras, bem pontuais. Em todos os casos, essas irregularidades apresentam-se como pontos mais claros nas imagens 2D e protuberâncias nas imagens 3D. Já a superfície do revestimento da amostra t_0 apresenta várias depressões e poucas protuberâncias, havendo um aumento gradativo destas protuberâncias para os revestimentos preparados pelo método de aplicação única, à medida que a aplicação da prata foi realizada em tempos de cura maiores. Na amostra t_f as depressões foram praticamente extintas e pode-se observar um grande número de protuberâncias. Uma vez que o PDMS apresenta-se relativamente menos viscoso no início da cura, a aplicação das AgNPs, provavelmente, provocou depressões na superfície do revestimento, como observado para a amostra t_0 .

Analisando as demais imagens, tem-se que a quantidade de irregularidades superficiais e pontos mais claros aumentou, à medida que o tempo de início das aplicações de AgNPs aumentou e também, para o revestimento preparado pelo método de múltiplas aplicações. Uma vez que o teor de AgNPs também aumenta seguindo essa mesma tendência, conforme previamente constatado por MEV/EDS e ICP/AES, os pontos mais claros, correspondentes às irregularidades na superfície do revestimento, também foram associados à presença de AgNPs. Assim a **Figura 18d**, amostra $t_{1/2}$, apresenta AgNPs bem dispersa e com apenas alguns aglomerados. Já na amostra $t_{1/4}$ (**Figura 18c**), a dispersão das AgNPs não é homogênea e há aglomerados isolados. No entanto, esses pontos mais claros e/ou irregularidades superficiais apresentam-se na sua maioria como depressões na amostra $t_{1/2}$ e como protuberâncias na amostra $t_{1/4}$, indicando que nessa última amostra, a prata estaria mais exposta na superfície do revestimento. Para as amostras $t_{3/4}$ (**Figura 18e**) e t_f (**Figura 18f**), a quantidade de protuberâncias aumentou significativamente, indicando ainda que as AgNPs também estariam mais expostas na superfície desses revestimentos.

Na amostra t_{multi} (**Figura 18g**), pode-se observar todos os comportamentos apresentados pelas outras amostras de forma simultânea, resultando num revestimento com superfície bem irregular e apresentando AgNPs com diferentes níveis de exposição superficial, em virtude das múltiplas aplicações de AgNPs em tempos variados ($t_0 - t_f$).

De acordo com as imagens de AFM obtidas para o método de única aplicação, as condições $t_{3/4}$ e t_f seriam as mais recomendadas para aplicação das AgNPs, pois apresentaram as AgNPs mais na superfície do revestimento, favorecendo assim o contato

dos micro-organismos com as nanopartículas. No entanto, o método de múltiplas aplicações seria o mais recomendado por possuir maior quantidade de prata (Tabela 4) e ter uma disposição das nanopartículas de prata intermediária em relação às de única aplicação.

6.3.5 – Determinação do ângulo de contato

As imagens e os resultados das medidas de ângulo de contato (em graus °) constam da **Tabela 5** e **Figuras 19 e 20**.

Tabela 5 - Valores do ângulo de contato para os revestimentos de PDMS puro e PMDS/AgNPs preparados pelos métodos de aplicação única e múltiplas

Amostra	Ângulo de contato (°)*
PDMS	(79,51 ± 0,45)
t ₀	(79,35 ± 0,98)
t _{1/4}	(81,92 ± 0,37)
t _{1/2}	(77,65 ± 0,40)
t _{3/4}	(86,79 ± 0,42)
t _f	(87,27 ± 2,91)

*Valores correspondentes a média e desvio padrão de 3 medidas.

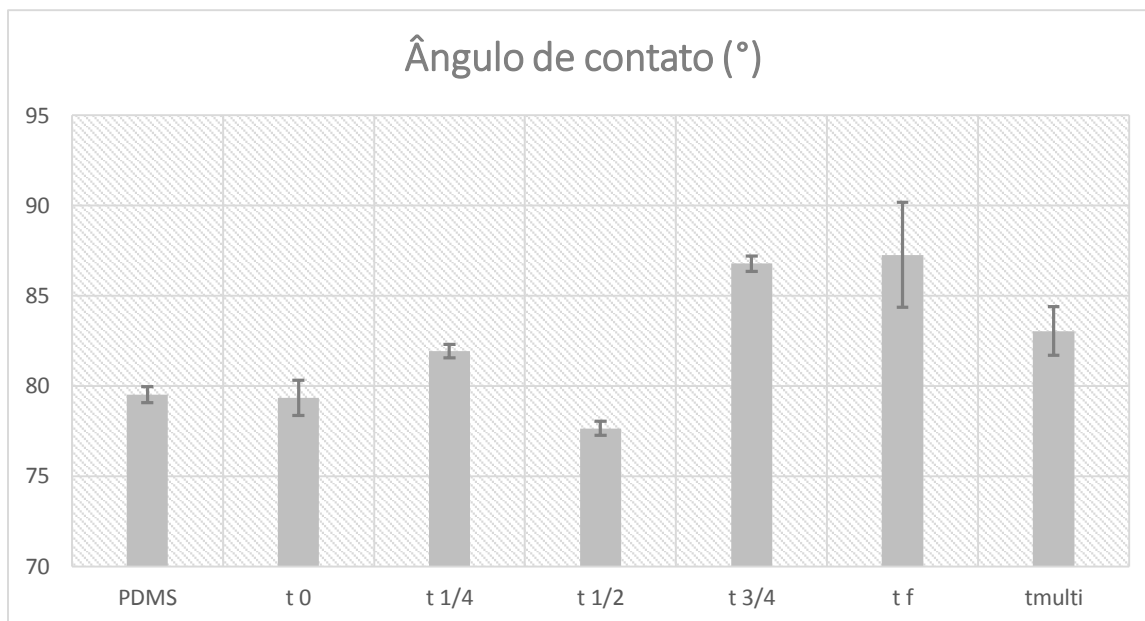


Figura 19- Gráfico do ângulo de contato das amostras em função do método e do tempo de início da aplicação das AgNPs.

De acordo com a **Figura 19**, o ângulo de contato das amostras aumentou com o aumento do tempo de início da aplicação das AgNPs, sendo a única exceção a amostra $t_{1/2}$ (55 min) que apresentou uma leve diminuição no seu ângulo de contato. Logo, as amostras analisadas tornaram-se relativamente mais hidrofóbicas com o aumento no grau de cura do silicone antes da aplicação das AgNPs, resultado semelhante foi obtido por YOKSAN *et al.* (2010).

Associando a hidrofobicidade com alterações na rugosidade do revestimento conforme exposto por SEO *et al.* (2006), esses resultados indicam que os revestimentos de PDMS/AgNPs tornaram-se mais rugosos, à medida que a aplicação da prata foi realizada em tempos de cura maiores. A deposição superficial e em maior quantidade das AgNPs na superfície externa do revestimento de PDMS com o início da aplicação das AgNPs em tempos de cura maiores, conforme previamente constatado por AFM, contribuíram para aumentar a rugosidade e consequentemente, o ângulo de contato dos revestimentos. Com ao aumento da hidrofobicidade com a aplicação das AgNPs nos tempos de cura maiores, temos um acréscimo de uma característica favorável a atividade antimicrobiana da AgNPs, conforme estudo de RADHESHKUMA *et al.* (2006), onde este aumento da hidrofobicidade favorece a formação de íons Ag^+ e a difusão dos mesmo para o meio.

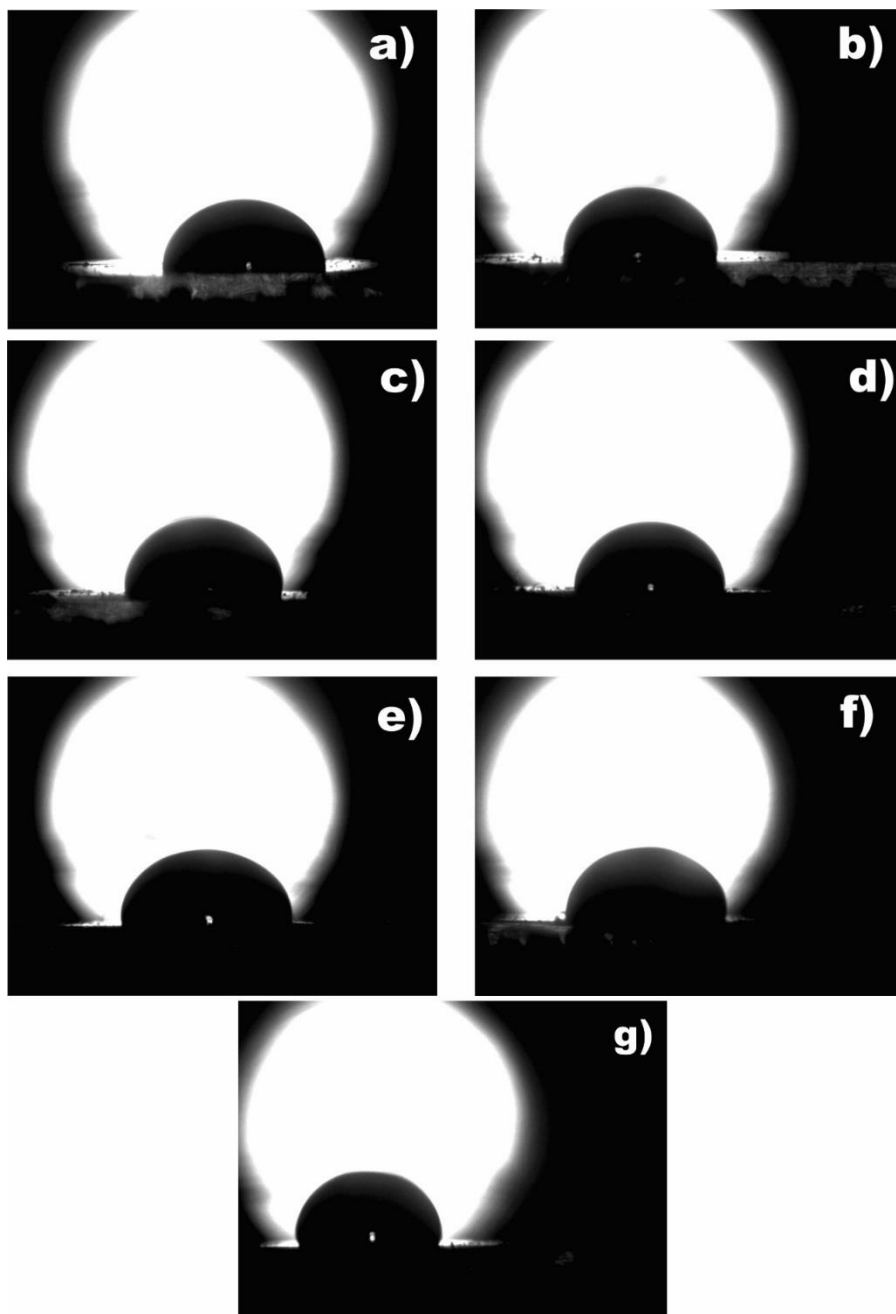


Figura 20 – Imagens do formato da gota durante a determinação de ângulo de contato dos revestimentos: a) PDMS b) t_0 c) $t_{1/4}$ d) $t_{1/2}$ e) $t_{3/4}$; f) t_f ; e g) t_{multi} .

Buscando avaliar o efeito da aspersão da solução aquosa de CMC sobre a rugosidade e consequentemente, na hidrofobicidade dos revestimentos, na **Tabela 6** e **Figura 21** estão apresentados os dados de ângulo de contato para os revestimentos de PDMS preparados nas mesmas condições de aplicação do SBSp utilizadas para a obtenção dos nanocompósitos, porém utilizando apenas a solução de água deionizada com CMC, sem AgNPs.

Tabela 6 - Valores do ângulo de contato para os revestimentos de PDMS puro e PMDS aspergido com solução aquosa de CMC preparados pelos métodos de aplicação única e múltiplas

Amostra	Ângulo de contato (°)*
PDMS	(69,16±0,83)
PDMS-t ₀	(68,32±1,17)
PDMS-t _{1/4}	(75,78±1,29)
PDMS-t _{1/2}	(71,3±1,23)
PDMS-t _{3/4}	(67,31±0,32)
PDMS-t _f	(65,98±0,41)
PDMS-t _{multi}	(66,88±0,37)

*Valores correspondentes a média e desvio padrão de 20 medidas.

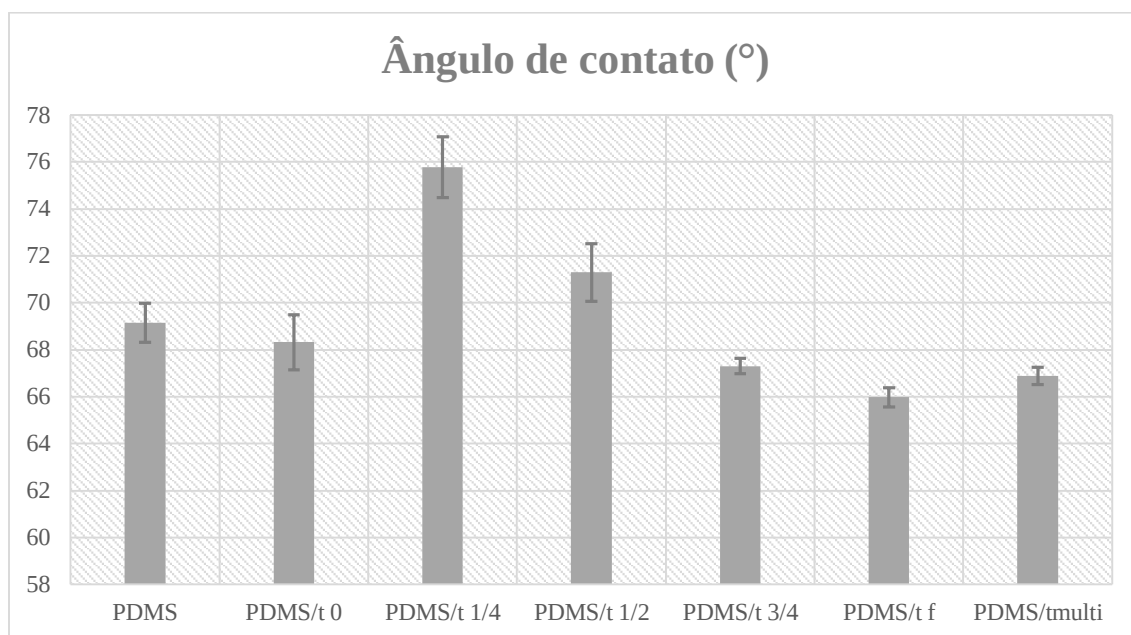


Figura 21 - Gráfico do ângulo de contato das amostras de PDMS puro em função do método e do tempo de início da aplicação da solução H₂O: CMC.

De acordo com esses resultados, o procedimento de aspersão da solução aquosa de CMC praticamente não alterou a hidrofobicidade do revestimento de PDMS, quando efetuado no início da cura do PDMS. Entretanto, tendeu a reduzir a hidrofobicidade dos revestimentos para tempos de cura maiores, ou seja, a rugosidade intrínseca do método de preparação do revestimento de PDMS por aspersão é relativamente reduzida com a

aspersão de solução aquosa de CMC para tempos equivalentes a $\frac{3}{4}$ e o final da cura do PDMS. Esse comportamento associa ainda mais o aumento do ângulo de contato dos revestimentos de PDMS/AgNPs (**Figura 21**) nesses tempos de aplicação, à maior quantidade das AgNPs na superfície externa do revestimento de PDMS.

A única exceção foi o revestimento PDMS- $t_{\frac{1}{4}}$ que apresentou um aumento no ângulo de contato, implicando numa rugosidade de superfície maior do revestimento de PDMS após aplicação da solução aquosa de CMC. Esse resultado corrobora com a topografia diferenciada observada nas imagens de AFM para esse tempo de aplicação das AgNPs em relação aos tempos t_0 e $t_{\frac{1}{2}}$ (**Figura 19**); assim como o maior ângulo de contato da amostra $t_{\frac{1}{4}}$ em relação à amostra $t_{\frac{1}{2}}$ (**Figura 21**). De acordo com os resultados de MEV/EDS e AFM, apesar do teor de AgNPs da amostra $t_{\frac{1}{2}}$ ser relativamente maior, as AgNPs não estão expostas o mais superficialmente possível nessa condição devido às depressões registradas na imagem de AFM (**Figura 18d**). Por fim, tem-se que a amostra preparada pelo método de múltiplas aplicações tem um comportamento híbrido e mais próximo das últimas condições de aspersão.

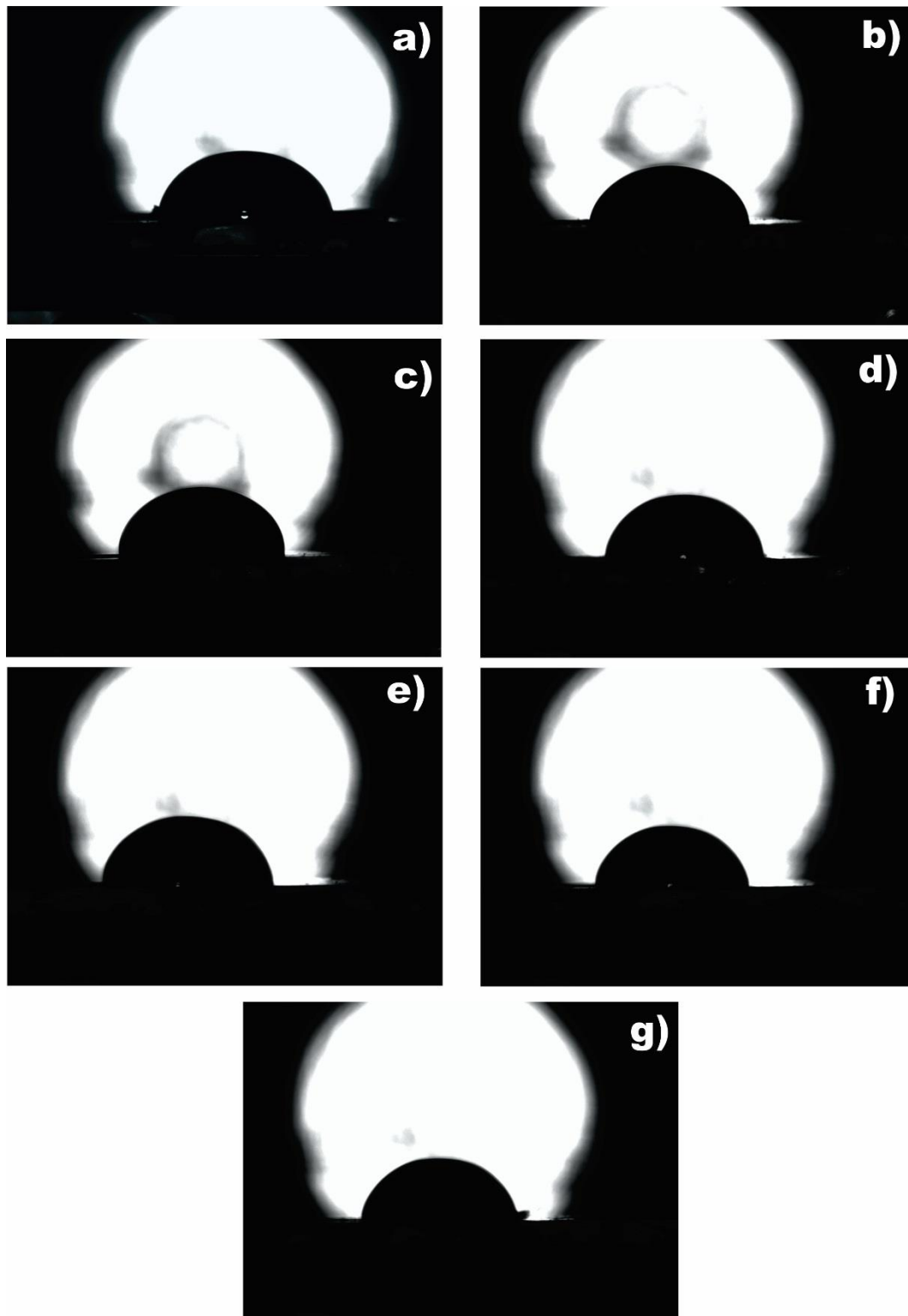


Figura 22-Imagens do formato da gota durante a determinação de ângulo de contato dos revestimentos: a) PDMS b) PDMS- t_0 c) PDMS- $t_{1/4}$ d) PDMS- $t_{1/2}$ e) PDMS- $t_{3/4}$; f) PDMS- t_f ; e g) PDMS- t_{multi} .

6.3.6- Análise de biofilme por fluorescência:

A **Figura 23** mostra porcentagens de células viáveis (com membrana celular intacta, e, portanto, com alguma capacidade de sobrevivência) aderidas à superfície (biofilme) dos discos em relação à Escala de McFarland (topo de 100%). Embora o erro estatístico seja muito grande (esperado nesse tipo de experimento) observa-se significância estatística em relação aos grupos estudados (com prata) e os controles negativos para cada bactéria isoladamente.

Tabela 7 - Média dos resultados obtidos pelo teste e desvio padrão

Amostras	% de células viáveis	
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
	Média $\pm \sigma$	Média $\pm \sigma$
t ₀	(37,82 $\pm$ 6,19)	(13,92 $\pm$ 2,03)
t _{1/4}	(30,45 $\pm$ 9,95)	(10,63 $\pm$ 2,07)
t _{1/2}	(35,00 $\pm$ 3,32)	(19,90 $\pm$ 5,39)
t _{3/4}	(24,21 $\pm$ 4,36)	(12,31 $\pm$ 2,67)
t _f	(19,58 $\pm$ 4,16)	(11,80 $\pm$ 6,35)
t _{multi}	(8,4 $\pm$ 2,95)	(1,54 $\pm$ 1,25)
PDMS	(75,51 $\pm$ 11,26)	(34,02 $\pm$ 10,66)

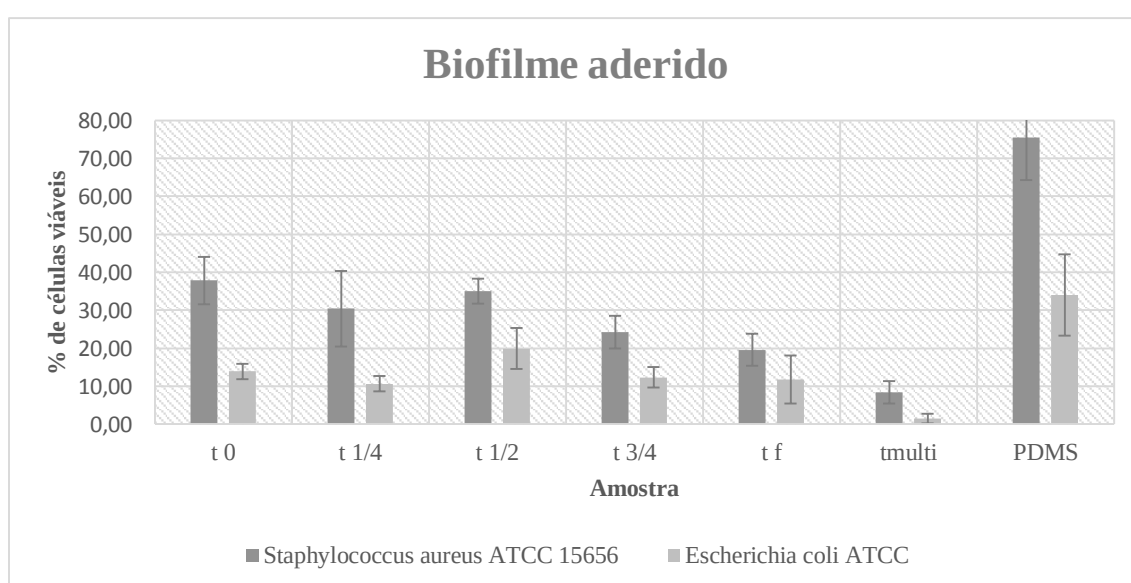


Figura 23 - Gráfico dos nº de biofilmes aderidos nas amostras.

De acordo com esses resultados, todos os revestimentos contendo AgNPs, independentemente do método e condições de preparação por SBSp, reduziram a adesão celular e formação de biofilme para *S. aureus* e *E. coli*. Em ambos os casos a ação antimicrobiana foi maior para o revestimento preparado pelo método de múltiplas aplicações, ou seja, amostra t_{multi} , que apresentou-se em média 3,85 e 6,4 vezes, respectivamente, maior que nos corpos de prova sem prata (19,58% e 11,80%, respectivamente, de células viáveis em relação à Escala de McFarland) Esse comportamento diferenciado se deve ao maior teor de AgNPs e à exposição superficial das nanopartículas no revestimento, conforme previamente evidenciado pelas demais caracterizações realizadas nesse trabalho.

Para as amostras preparadas pelo método de aplicação única, os melhores resultados foram obtidos pelas amostras $t^{3/4}$ e t_f , as quais apresentaram relativamente maior teor de AgNPs, imagens do mapa composicional da prata por MEV/EDS, e cujas nanopartículas se encontram posicionadas mais na superfície externa do revestimento, imagens de AFM, facilitando a interação com os microrganismos estudados. Este fato também explica, mas de forma contrária, os piores resultados obtidos pelas amostras de revestimentos, no caso, t_0 e $t^{1/2}$, onde as AgNPs estão presentes em menor concentração e menos expostas superficialmente no revestimento, dificultando o contato com os microrganismos. Um comportamento intermediário foi constatado para a amostra $t^{1/4}$ que apresentou concentração baixa de AgNPs, porém localizadas mais superficialmente no revestimento.

7.CONCLUSÕES:

Nos experimentos iniciais para obtenção de revestimentos por SBSp, constatou-se que os parâmetros que influenciaram a redução da espessura do revestimento foram a distância de trabalho e a rotação do coletor, onde a distância contribuiu para uma maior área de deposição de PDMS no substrato e a velocidade de rotação contribuiu com a uniformidade do revestimento, utilizando força centrífuga.

Para deposição das AgNPs, ou seja, formação do nanocompósito PDMS/AgNPs, verificou-se que para o método de uma única deposição de AgNPs, as amostras com AgNPs depositadas sobre o revestimento de PDMS com maior grau de cura, isto é, de t0 a t_f, apresentaram maior atividade antimicrobiana.

No caso das múltiplas aplicações foi observado um comportamento intermediário com relação à morfologia do revestimento, porém uma maior concentração de AgNPs, tendo em vista que este tem suas aplicações de AgNPs em todos os tempos das aplicações únicas. Logo, o melhor resultado de atividade antimicrobiana foi observado para esse revestimento, o que o torna o mais indicado para ser usado como revestimento em embalagens de alimentos, desde que atenda aos limites de migração específica da prata exigidos pela legislação.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de outros polímeros para a formação do revestimento.
- Estudo de outras rotas de síntese das AgNPs, visando reduzir o tamanho e o grau de dispersão do tamanho das nanopartículas.
- Caracterização por AFM dos revestimentos de PDMS sem AgNPs aspergidos com a solução de CMC.
- Utilizar rotas experimentais diferentes capazes de aumentar a concentração das AgNPs na dispersão coloidal e consequentemente, no revestimento.
- Modificação dos parâmetros do SBSp, buscando reduzir a espessura do revestimento.
- Estudo da taxa de difusão das AgNPs para simulantes de alimentos nas condições exigidas pela legislação para aplicações em diferentes tipos de alimentos.
- Estudo da atividade bactericida, utilizando um alimento inoculado com os microrganismos propostos.
- Estudo de conservação de um alimento altamente perecível.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, Z.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, GK.; - *Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential*. - Ind J Chest Dis Allied Sci; 48, 171–6, (2005).
- AHMADI T. S.; WANG Z. L.; GREEN T. C.; HENGLEIN A.; EL-SAYED M.- *Shape-Controlled Synthesis of Colloidal Platinum Nanoparticles*. *Science*, - 272, 1924-1926 (1996).
- ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. - *Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials*. - *Materials Science and Engineering*, 28, 1–63, (2000).
- AN, J.; ZHANG, M.; WANG, S.; TANG, J.; - *Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP*. - *LWT – Food Science and Technology*, 41(6), 1100–1107, (2008).
- ATKINS, P.W.; - *Physical chemistry*. - 5.ed, New York, Oxford University Press, (1994).
- AZEREDO H.M.C.; -*Review: Nanocomposites for food packaging applications* - *Food Research International* 42, 1240–1253, (2009).
- AZIZI, M. A. S.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A.; -*Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field* - *Biomacromolecules*, 6, 612–626, (2005).
- BAWA, R.; BAWA, S. R.; MAEBIUS, S.B.; FLYNN, T.; WEI, C. – *Protecting new inventions in nanomedicine with patents*, - *Nanomedicine*, v. 01, nº 2, p. 150-158, (2005).
- BRADLEY, E.L. *et al.* - *Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries*. -*Trends in Food Science & Technology* 22, 604-610, (2011).
- BREGGIN, L.; FALKNER, R.; JASPERS, N.; PENDERGRASS, J.; PORTER, R. - *Securing the Promise of Nanotechnologies*.- Royal Institute of International Affairs, (2009).
- BRODY, A.; STRUPINSKY, E.; KLINE, L.; - *Active Packaging for Food Applications* - Technomic Publishing Co., Lancaster, (2001).
- BRYDSON, J. A. *Plastics Materials*. 7th ed, Butterworth-Heinemann: Oxford, 1999.
- CAMILLOTO, G.P.; SOARES, N.F.F.; PAULA, F.S.; PIRES, A.C.S.; - *Desenvolvimento de filme plástico incorporado com triclosan para conservação de presunto fatiado*. - In: 24º Congresso Nacional de Microbiologia, Brasília. Anais. (2007).

- CARLSON, G.; GONSALVES, K.E.; Plastic Eng. 49, 769, (1998).
- CHA, D.S.; COOKSEY, K.; CHINNAN, M.S.; PARK, H.J.; - *Release of nisin from various heat-pressed and cast films.* - Lebensm-Wiss. u-Technology, 36,209-213, (2004).
- CHEN, M.; WANG, L.Y.; HAN, J.T.; ZHANG, J.Y.; LI, Z.Y.; QIAN, D.J.J.; - *Preparation and study of polyacryamide-stabilized silver nanoparticles through a one-pot process.* - The Journal of Physical Chemistry B, v. 110, p.11224-31, (2006).
- CHENG, Q.; LI, C.; PAVLINEK, V.; SAHA, P.; WANG, H.; - *Surfacemodified antibacterial TiO₂/Ag nanoparticles: preparation and properties.* - Applied Surface Science, 252, 4154-4160, (2006).
- CHO, K. H.; PARK, J. E.; OSAKA, T., PARK, S. G.; (2005). -*The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient.* - Electrochimica Acta, 51, 956–960, (2005).
- CHOONEE, K.; SYMSA, R.R.A.; AHMADA, M.M.;ZOUB, H.; - *Post processing of microstructures by PDMS spray deposition* -Sensors and Actuators. 155, 253–262, (2009).
- CHOONEE, K; SYMS, R.R.A.; AHMAD, M.M.; ZOU, H., - *Post processing of microstructures by PDMS spray deposition* - Sensors and Actuators A ,155 ,253–262, (2009).
- CHOPRA, I. - *The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?* - Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 59, p. 587-590, (2007).
- COLES, R.; MCDOWELL, D.; KIRWAN, M.J.; -*Food packaging technology.* - Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.; p. 65–94, (2003).
- CORNING, D. *Electronics Sylgard ® 184 Silicone Elastomer.* Product Datasheet, p. 1–3, (2013).
- COWAN, M. M. - *Antimicrobial Efficacy of Silver-Zeolite Matrix Coating on Stainless Steel.* J.-Ind. Microbiol. Journal of Biotechnology, 30, 102-106, (2003).
- DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SYROPOULOS, D.; - *Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns,* Trends in Food Science and Technology, 19:103-112-van den Beuken & Tobback P - 2008.
- DALMAS, F.; CAVAILLE, J. Y.; GAUTHIER, C.; CHAZEAU, L.; DENDIEVEL, R. - *Viscoelastic behavior and electrical properties of flexible nanofiber filled polymer*

nanocomposites. Influence of processing conditions. - Composites Science and Technology, 67, 829–839, (2007).

DAMM, C.; MÜNSTEDT, H.; RÖSCH, A. - *The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano and microcomposites.* In: Materials Chemistry and Physics, v. 108, n. 1, p. 61-66, (2008).

DAVID, B.H.; PATRICK, U.; JOHN, M. T.; - *Spin Coating of Thin and Ultrathin Polymer Films.* – Polymer Engineering and Science, Vol. 38, No. 12, (1998).

DAVIM, J.P.; CHARITIDIS, A.C; eds. - *Nanocomposites: Materials, Manufacturing and Engineering.* Hawthorne-, NY, USA, (2013).

DAVIS III, L.J.; BOGGESE, M.; KODPUAK, E.; DEUTSCH, M.; - *Modeling and numerical simulations of growth and morphologies of three dimensional aggregated silver film* - JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, 112, 094310, (2012).

DAWSON, P.L.; HIRT, D.E.; RIECK, J.R.; ACTON, J.C.; SOTTHIBANDHU, A.; - *Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method.* - Food Research International, 36,959-968, (2003).

DEL NOBILE, M. A.; CANNARSI, M.; ALTIERI, C.; SINIGAGLIA, M.; FAVIA, P.; IACOVIELLO, G.; *et al.* - *Effect of Ag-containing nanocomposite active packaging system on survival of Alicyclobacillus acidoterrestris.* - Journal of Food Science, 6, 379,383, (2004).

DREXLER, K.E. – *Engines of Creation 2.0: The coming era of nanotechnology,* - p. 646, (2007).

DUBIEF, D.; SAMAIN, E.; DUFRESNE, A. (1999). - *Polysaccharide microcrystals reinforced amorphous poly (b-hydroxyoctanoate) nanocomposite materials.* - Macromolecules, 32(18), 5765–5771, (1999).

DUNCAN, T.V.; - *Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors.* - Journal of Colloid and Interface Science, 363, 1–24, (2011).

DUNCAN, T.V.; - *Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors* - Journal of Colloid and Interface Science, 363, 1–24, (2011).

DUNN, K.; EDWARDS-JONES, V. (2004). -*The role of Acticoatt with nanocrystalline silver in the management of burns-*. Burns, 30(Suppl. 1), pp. S1– S9, (2004).

- DUNN, K.; EDWARDS-JONES, V.; - *The role of Acticoatt with nanocrystalline silver in the management of burns.* - Burns, 30(Suppl. 1), S1–S9, (2004).
- DURAN, N. et al. - *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.*- 1. ed. São Paulo: Artliber, (2006).
- EL BADAWY, A.M.; LUXTON, T.; SILVA, R.G.; SCHECKEL, K.; SUIDAN, M.; TOLAYMAT, T.; - *Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolytetype) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions.* - Environmental Science and Technology, v. 44, p. 1260-1266, (2010).
- EMAMIFAR, A.; KADIVAR, M.; SHAHEDI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; - *Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice.*- Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11, 742-748, (2010).
- FAYAZ, A. M.; BALAJI, K.; GIRILAL, M.; KALAICHELVAANT, P. T.; VENKATESAN, R.;-*Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation.* - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(14), 6246-6252, (2009).
- FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. - *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus.* In: Journal of Biomedical Materials Research, v. 52, p. 662-668, (2000).
- FINNEY, D. J. Probit Analysis. 2^a. ed. New York: Cambridge University Press, (1952).
- FORREST, M.; - *Food Contact Materials – Rubbers, Silicones, Coatings and Inks* - Smithers Rapra, Inglaterra, (2009).
- FRANCO, B. D. G. De M.; - *Microbiologia dos Alimentos*- Ed. Atheneu, São Paulo, (2005).
- FREEMAN, J. W.; WRIGHT, L. D.; LAURENCIN, C. T.; BHATTACHARYYA, S. In: GONSALVES, K.E.; HALBERSTADT, C. R.; LAURENCIN, C. T.; NAIR, L. S. *Biomedical Nanostructures.* New Jersey. John Wiley & Sons. (2008).
- GARCIA, M.V.D.; - *Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis.* - 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, (2011).
- GONÇALVES, A. A.; PASSOS, M. G.; BIEDRZYCKI, A. – *Percepção do consumidor com relação à embalagem de alimentos: tendências.* Estudos Tecnológicos, São Leopoldo, v. 4, n. 3, p. 271-283, set. /dez. 2008.

- GONG, P.; LI, H.; HE, X.; WANG, K.; HU, J.; TAN, W. *et al.* - *Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles.* - *Nanotechnology*: 18, 604–11, (2007).
- GORUP, L.F. *et al.* – *Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method,* - *Journal of Colloid and Interface Science*, 360, 355-358, (2011).
- GU, H.; HO, P.L.; TONG, E.; WANG, L.; XU, B.; - *Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities.* - *Nano Lett*: 3, (9):1261–3, (2003).
- GUO, L.; - *Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications.* - *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 439, 69– 83, (2013).
- GUZMÁN, M.G.; DILLE, J.; GODET, S. - *Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity.* *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*, v. 2, n. 3, p. 104-111,(2009).
- HAJIPOUR, M.J.; FROMM, K.M.; ASHKARRAN, A.A.; ABERASTURI, D.J.; LARRAMENDI, I.R.; ROJO, T.; SERPOOSHAN, V.; PARAK, W.J.; MAHMOUDI, M.; - *Antibacterial properties of nanoparticles* - *Trends in Biotechnology*, Vol. 30, No. 10, (2012).
- HOTCHKISS, J. H.; - *Safety considerations in active packaging.* - In: ROONEY, M. L.; - *Active food packaging.* - Blackie Academic & Professional, London, (1995).
- HUANG, H. *et al.* - *Preparation and characterization of metal–chitosan nanocomposites* - *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39, 31–37, (2004).
- ILJIMA, S. – *Helical microtubules of graphitic carbon,* - *Nature*, 354, 6348, 56-58, (1991).
- IPEN e EEB. *Nanotechnology and the environment: A mismatch between claim and reality.* 2009.
- JIANG, J.; OBERDORSTER, G.; BISWAS, P.;- *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies.*- *Journal of Nanoparticle Research*, v. 11, 77-89, (2009).
- JIN, R.; QIAN, H.; WU, Z.; ZHU, Y.; Zhu, M., MOHANTY, A.; GARG, N.; *J. Phys. Chem. Lett.*, 1, 2903. (2010).
- JORDAN, J.; JACOB, K.I.; TANENBAUM, R.; SHARAF, M.; JASIUK, I.; - *Experimental trends in polymer nanocomposites: a review.* - *Mater Sci Eng A*; 393,1–11, (2005).

- KAPOOR S.; LAWLESS D.; KENNEPOHL P.; MEISEL D.; SERPONE N.; - *Reduction and aggregation of silver ions in aqueous gelatin solutions.*- Langmuir, 10, 3018-3022, (1994).
- KENAWY, E.R.; WORLEY, S.D.; BROUGHTON, R.; - *The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review.* - Biomacromolecules; 8:1359–84, (2007).
- KESTER, J.J.; FENNEMA, O. R.; - *Edible films and coatings: a review.* - Food Technology. v. 40, 12. 47-59, (1986).
- KIM, J. S.; KUK, E.; NAM YU, K.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; *et al.* - *Antimicrobial effects of silver nanoparticles.* - Nanomedicine, 3, 95–101, (2007).
- KIMLING, J. *et al.* - *Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited.* - n. 95 mL, 15700–15707, (2006).
- KLABUNDE, K. J. – *Nanoscale materials in chemistry*- John Wiley & Sons, Inc., New York ; (2001).
- KLABUNDE, K. J. – *Nanoscale materials in chemistry*, -New York: John Wiley & Sons, Inc., (2001).
- KOMARNENI, S.; - *Nanocomposites* - J. MATER. CHEM., 2(12), 1219-1230, (1992).
- KROTO, H.W.; HEATH, J.R.; O'BRIEN, S.C.; CURL, R.E.; SMALLEY, R.E. – *C60-Buckminster fullerene*, - Nature, 318, 6042, 162-163, (1985).
- LAGARON, J.M.; LOPEZ, R. A.; OCIO, M. J.; - *Antimicrobial Polymers.* - Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, (2011).
- LIAU, S.; READ, D.; PUGH, W.; FURR, J.; RUSSELL, A.; - *Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions.* - Letters in Applied Microbiology, 25, 279–283, (1997).
- LISCHER, S.; KÖRNER, E.; BALAZS, D.J.; SHEN, D.; WICK, P.; GRIEDER, K.; HAAS, D.; HEUBERGER, M.; HEGEMANN, D.; - *Antibacterial burst-release from minimal Agcontaining plasma polymer coatings.* - J. R. Soc. Interface 8, 1019–1030, (2011).
- MATHUR, P.; APELIAN, D.; LAWLEY, A.; - *Analysis of the Spray Deposition Process* - Aria meralf. Vol. 31, No. 2, 429-443, (1989).
- MBHELE, Z. H.; SALEMANE, M. G.; VAN SITTEERT, C. G. C. E.; NEDELJKOVIC, DJOKOVIC, J. M.; LUYT, A. S. ; - *Fabrication and characterization of silver–polyvinyl alcohol nanocomposites.*- Chemistry of Materials, 15(26), 5019–5024, (2003).

- MEDEIROS, E. S.; GLENN, G. M.; KLAMCZYNSKI, A. P.; ORTS, W. J.; MATTOSO, L. H. C.; - *Solution blow spinning: a new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions*.- Journal of Applied Polymer Science, 113, 2322-2330, (2009).
- MILLS, K.L.; et al. - *The mechanical properties of a surface-modified layer on polydimethylsiloxane*- . J. Mater. Res., Vol. 23, No. 1, (2008).
- MODY, V.V.; NOUNOU, M.I.; BIKRAM, M. *Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies*. Adv Drug Deliv Rev.; 61:795–807. (2009).
- MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A.; - *Preparo e Caracterização de Proteínas Miofibrilares de Tilápia-Do-Nilo para Elaboração de Biofilmes*. - Pesquisa Agropecuária Brasileira, vol.35, 1, 179-189. (2000).
- MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.;YACAMAN, M. J. - *The bactericidal effect of silver nanoparticles* - Nanotechnology, v. 16, p. 2346-2353 - Bristol (2005).
- MUÑOZ, A.B.; FERNÁNDEZ, M.G.; - *Polymeric materials with antimicrobial activity*. - Prog. Polym. Sci., 37, 281–339, (2012).
- NETUSCHIL, L. et al.; - *Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms - which stain is suitable?* - BMC Oral Health, 14:2, (2014).
- NICOLAIS, L.; CAROTENUTO, G.; - *Nanocomposites: In Situ Synthesis of Polymer-Embedded Nanostructures*. - Somerset, NJ, USA: John Wiley & Sons, Incorporated, (2013).
- NICOLAU, D.E.; PHILLIMORE, J.; CROSS, R.; NICOLAU, D.V. – *Nanotechnology at the crossroad: the hard or the soft way?* - Microelectronics Journal, v. 31, (2000).
- OLIVEIRA, L.M. – *Revisão: Os principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas*, Brazilian J. Food Technology, v.7.nº2 p.161-165 – 2004.
- PAL S.; TAK Y.K.; SONG J.M.; - *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli* - Appl. Environ. Microbiol. 73, 1712–1720, (2007).
- PALZA, H.; - *Review: Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles*-.Int. J. Mol. Sci. 16, 2099-2116, (2015).
- PANACEK A.; KVITEK L.; PRUCEK R.; KOLAR M.; VECEROVA R.; N. PIZUROVA N.;SHARMA V.K.; NEVECNA T.; ZBORIL R.; - *Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity*-, J. Phys. Chem. B 110, (2006).

- PAUL, D.R.; ROBESON, L.M. - *Polymer nanotechnology: Nanocomposites*. - Polymer 2008, 49, 3187–3204, (2008).
- PENA, D.C.R.; TORRES, J.A.; - *Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid films: Water activity and pH effects*. - Journal of Food Science, 56,497-499, (1991).
- PENCHEVA, D.; BRYASKOVA, R.; KANTARDJIEV.; - *Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/Ag-NPs) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles*. - Material Science and Engineering: C, v. 32, p. 2048-2051, (2012).
- POPA, M.; PRADELL, T.; CRESPO, D.; CALDERON-MORENO, J.M.; - *Colloids Surfaces A*. - Physicochemical and Engineering Aspects, v. 303, p. 184, (2007).
- POPOK, V.N.; GROMOV, A.V.; NUZHIDIN, V.I.; STEPANOV, A.L.; - *Optical and AFM study of ion-synthesised silver nanoparticles in thin surface layers of SiO₂ glass* - Journal of Non-Crystalline Solids, 356, 1258-1261, (2010).
- PRABHU, S.; POULOSE, E.K.; - *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects* - International Nano Letters, 2:32, (2012).
- QUINA, F.H. - *Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos*. - Química Nova, v.27, n.6, p.1028-9, (2004).
- QUINTAVALLA, S.; VICINI, L.; - *Antimicrobial food packaging in meat industry*. - Meat Scienc, 62, 73–380, (2002).
- RADHESHKUMAR, C.; MUNSTEDT, H.; - *Antimicrobial polymers from polypropylene/silver composites—Ag⁺ release measured by anode stripping voltammetry* - Reactive & Functional Polymers, 66 ,780–788, (2006).
- RADHESHUKUMAR, C.; MUNSTEDT, H.; - *Antimicrobial polymers from polypropylene/silver composites - Ag⁺ release measured by anode stripping voltammetry*. - Reactive & Functional Polymers, 66, 780 – 788, (2006).
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A.; - *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. - Biotechnology Advances, 27(1), 76– 83, (2009).
- RAND R.B.; PEUMANS P.; FORREST S.R.;- *Long-range absorption enhancement in organic tandem thin-film solar cells containing silver nanoclusters*. - J. Appl. Phys. 96, 7519–7526 (2004).

- RATNER, M.; RATNER, D. - *Nanotechnology: A Gentle Introduction to the Next Big Idea*. - New Jersey, Pearson Education, (2002).
- RETCHKIMAN-SCHABES, O.S.; CANIZAL, G.; BECERRA-HERRERA, R.; ZORRILLA, C.; LIU, H.B. ASCENCIO, J.A.; - *Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles*. - Opt. Mater: 29, 95–9, (2006).
- RHIM, J.-W.; HONG, S.-I.; PARK, H.-M.; NG, P. K. W.; - *Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity*.- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 5814,5822, (2006).
- RIBEIRO, M. P. R. et al. *O marketing e a embalagem no desenvolvimento do produto “milhitos” elaborado na disciplina de projeto interdisciplinar em ciência e tecnologia de alimentos*. In: Simpósio de ensino de graduação, 2008, Piracicaba. Anais eletrônicos. Piracicaba: UNIMEP, 2008.
- RIET, M. – *Nano-engineering in science and technology: an introduction to the world of nano desing*, - in: Series on the Foundations of Natural Science and Technology, world scientific, (2003).
- ROBERTSON, G.L. - *Food packaging: Principles and practice*, CRC press, 3ªed. – New York 2013.
- ROONEY, M.; - *Active Food Packaging* - Blackie Academic and Professional, Glasgow, (1995).
- RUDRA, J. S.; DAVE, K.; HAVNIE, D. T.; - *Antimicrobial polypeptide multilayer nanocoatings*. - Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 17(11), 1301–1315, (2006).
- SALATA, O.V.; *J.Nanobiotechnology*, 2, 1-6, (2004).
- SANTANA, S.V. – *Nanopartículas de prata e Ag/Zn no nanoestruturado como agentes antimicrobianos obtidos por processo hidrotermal de microondas* – UFPB/CCEN – Dissertação de Mestrado – João Pessoa, (2012).
- SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N.F.S.; NOBREGA, J.E.; JUNIOR, M.A.W.; BARBOSA, K.B.F.; VOLP, A.C.P.; ZERDAS, E.R.M.A.; WURLITZER, N.J.; - *Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA_ 2351) on preservation of sliced ham*. - Food Control, 20, 85-89, (2009).
- SANTOS, O. K. -*Nanopartículas de prata estabilizadas pela polietilenoimina linear funcionalizada: formação, caracterização e aplicações catalíticas* - Qualificação de pós-doutorado em química, Universidade Federal de Santa Catarina, (2010).

- SAU, T.K.; ANDREY, L. - *Rogach. Complex-shaped Metal Nanoparticles: Bottom-Up Syntheses and Applications, First Edition*. By Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany (2012).
- SCHWEIZER, E.K.; EIGLER, D.M. - *Positioning single atoms with a scanning tunneling microscope*, - Nature, 344, 6266, 524-526, (1990).
- SEETHAPATHY, S.; GÓRECKI, T.; - *Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review*. - Analytica Chimica Acta. 750, 48– 62, (2012).
- SELKE, S.; CULTER, J.D.; HERNANDEZ, R.J.; - *Plastics packaging properties, processing, applications, and regulations*. - 2nd ed. Munich: Carl Hanser Verlag;(2004).
- SEO, J.; LEE, L.P.; - *Effects on wettability by surfactant accumulation/depletion in bulk polydimethylsiloxane (PDMS)* - Sensors and Actuators, B 119, 192–198, (2006).
- SILEIKA, T.S.; KIM, H.-D.; MANIAK, P.; MESSERSMITH, P.B.; - *Antibacterial performance of polydopamine-modified polymer surfaces containing passive and active components*. - ACS Appli. Mater. Interfaces 3, 4602–4610, (2011).
- SILVA, W.A.; - *Desenvolvimento e avaliação de embalagens ativas para a melhoria da segurança alimentar de amendoim (Arachis hipogaea L.)*. - Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 64 p.; (2008).
- SILVEIRA, M.F.A. - *Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação da massa de pastel*. - Viçosa, 2006, 64 p. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- SILVESTRE, C.; et al. - *Food packaging based on polymer nanomaterials Progress in* - Polymer Science 36, 1766–1782, (2011).
- SOARES, N.F.F. et al - *Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos*, Revista Ceres, v.56, p. 370-378 – 2009.
- SOARES, N.F.F.; ESPITIA, P.J.P.; PACHECO, J.J.R.; BOLAÑOS, D.G.; TEHERAN, J.E.D.; VILLADIEGO, A.M.D.; - *Desenvolvimento e avaliação de filmes de base celulósica incorporados com nano-compostos e antimicrobianos na carne bovina fresca*. - In: Anais do 24º Congresso Nacional de Microbiologia, Brasília. Anais, (2007).
- SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B.; - *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria*. - Journal of Colloids and Interface Science, 275, 177–182, (2004).
- SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B.; - *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria*. - J Colloid Interface, 275, 177–82, (2007).

- SUGIMOTO, Y.; YOSHIMOTO, A. M.; CUSTANCE, K. O.; MORITAS, Y. I. S. – *Non-contact atomic force microscopy study of the Sn/Si mosaic phase*, - Applied Surface Science, v.241, n.28, p. 23-27, (2005).
- SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W.; - *Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications* – Journal of Food Science. Vol. 68, Nr. 2, (2003).
- TAN Y, DAI Y, LI Y, ZHUA D. *Preparation of gold, platinum, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant–potassium bitartrate*. J Mater Chem; 13:1069-75 (2003).
- TAO, A.; SINSEMSUKSAKU, P.; YANG, P. - *Polyhedral silver nanocrystals with distinct scattering signatures*. - Angewandte Chemie, 45, 4597-4601, (2006).
- TAVARES, M.T.S.; SANTOS, A.S.F.; SANTOS, I.M.G.; SILVA, M.R.S.; BOMIO, M.R.D.; LONGO, E.; PASKOCIMAS, C.A.; MOTTA, F.V.; - *TiO₂/PDMS nanocomposites for use on self-cleaning surfaces* - Surface & Coatings Technology, 239, 16–19, (2014).
- TESSIER, P. M.; VELEV, O. D.; KALAMBUR, A. T.; RABOLT, J. F.; LENHOFF, A. M.; KALER, E. W.- *Assembly of gold nanostructured films template by colloidal crystals and use in surface-enhanced Raman spectroscopy*.- Journal of the American Chemical Society, 122, 9554-9555, (2000).
- THAKKAR, K.N.; MHATRE, S.S.; PARIKH, R.Y.; *Biological synthesis of metallic nanoparticles*. Nanomedicine: NBM 2010; 6:257-262. (2009).
- THOMAS, V.; YALLAPU, M.M.; SREEDHAR, B.; BAJIPAJ, S.K.;- *A versatile strategy to fabricate hydrogel-silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity*.- J. Colloid Int. Sci. ,315, 389–395, (2007).
- TISCHER, C. A.; VITORINO, J. C. - *Biotecnologia como Fonte de Fármacos e Excipientes de Importância Farmacêutica*. In: *Fármacos e Medicamentos - Uma Abordagem Multidisciplinar* – Bresolin, Tani Mari Belle; Cechinel Filho, Valdir, Org., Editora Santos, (2009).
- TURKEVICH, J.; STEVESON, P.C.; HILLIER, J. – *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*, Faraday Discussions, 11, 55-75, (1951).
- VERAS, T. N.; - *Desenvolvimento de composto a base de resina epoxi para aplicação em dutos de petróleo utilizando Solution Blow Spinning como técnica*. -85f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, (2015).

- VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. - *Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts*, Food Additives and Contaminants, 19, p.163-171 – London 2002.
- VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J.; - *Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts*. - Food Additives and Contaminants, London, 19, 163-171, (2002).
- WANG, D.; AN, J.; LUO, Q.; LI, X.; LI, M.; - *A Convenient Approach to Synthesize Stable Silver Nanoparticles and Silver/Polystyrene Nanocomposite Particles* - Journal of Applied Polymer Science, Vol. 110, 3038–3046, (2008).
- WILEY, B.; SUN, Y.; MAYERS, B.; XIA, Y.; - *Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: the case of silver*. - Chemistry - A European Journal, v.11, p.454-463, (2005).
- WILLIAMS, R.L.; DOHERETY, P.J.; VINCE, D.G.; GRASHOFF, G.J.; WILLIAMS, D.F.; - *The biocompatibility of silver*.- Crit Rev Biocompat; 5,221, (1989).
- YAM, K.L. - *Intelligent Packaging: Concepts and Applications*. Journal of Food Science, 70:R1-R10, Takhistov PT & Miltz J – 2005.
- YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S.; - *Silver nanoparticle-loaded chitosan–starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties* - Materials Science and Engineering C 30, 891–897, (2010).
- ZAPATA, P. A. et al. - *Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic “in situ” polymerization: synthesis, characterization, and antimicrobial behavior*. - Eur Polym J, (2011).
- ZEENA, S.; KAMAT, V.; - *What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?* - J. Phys. Chem. B, 108, 945-951, (2004).
- ZHAO, S. et al. - *Synthesis and layer-by-layer self-assembly of silver nanoparticles capped by mercaptosulfonic acid*. - Materials Letters, v.60, p.1215-8, (2006).
- ZHOU, L.; LV, S.; HE, G.; HE, Q.; SHI, B.; - *Effect of PE/Ag₂O nano-packaging on the quality of apple slices*. - Journal of Food Quality, 34, 171-176, (2011).

APÊNDICE

Apêndice – A

Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Na Figura 24 estão apresentadas as curvas de distribuição granulométrica das AgNPs utilizadas neste trabalho.



Delsa™ Nano

Overlay Graph (Normalized Intensity Distribution)

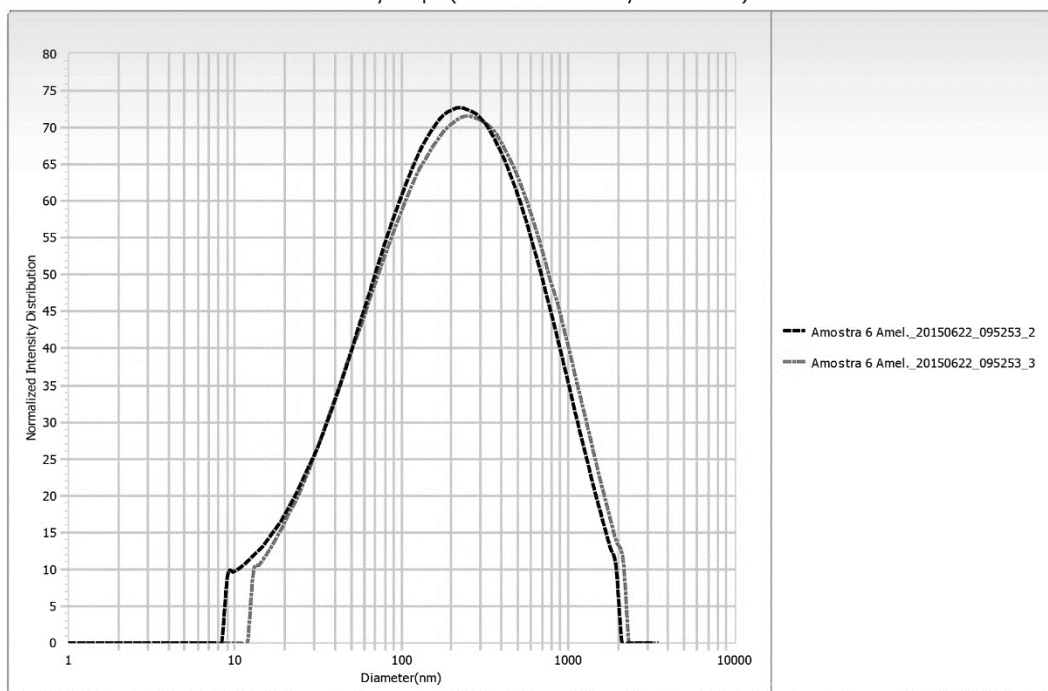
Common

Print Date : 6/22/2015

Print Time : 10:05:05

Version 3.73 / 2.30

Overlay Graph (Normalized Intensity Distribution)



No	Data	Repet. No	pH	Ave.Diameter(nm)	PD	Mean.(nm)	D (10%) (nm)	D (50%) (nm)	D (90%) (nm)
1	Amostra 6 Amel._20150622_095253_2	2	NA	160.6	0.300	328.6	33.4	185.9	793.8
2	Amostra 6 Amel._20150622_095253_3	3	NA	180.3	0.290	365.0	38.7	205.1	885.3
Average :				170.5	0.295	346.8	36.1	195.5	839.5

Figura 24 - Perfil de distribuição de tamanho das partículas de AgNPs