



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA E Ag/ZnO NANOESTRUTURADO
COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS OBTIDOS POR
PROCESSO HIDROTHERMAL DE MICRO-ONDAS**

Suelânio Viegas de Santana

João Pessoa-PB

Agosto/2012

SUELÂNIO VIEGAS DE SANTANA

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA E Ag/ZnO NANOESTRUTURADO
COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS OBTIDOS POR
PROCESSO HIDROTHERMAL DE MICRO-ONDAS**

Dissertação apresentada ao Corpo Docente do
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal da Paraíba, em
cumprimento às exigências para obtenção do
Título de mestre em Química.

Orientadores:

Prof. Dr. Dawy Keyson de Araújo Almeida
Profa. Dra. Iêda Maria Garcia dos Santos

João Pessoa-PB

Agosto/2012

S232n Santana, Suelânio Viegas de.
 Nanopartículas de prata e Ag/Zno nanoestruturado como
 agentes antimicrobianos obtidos por processo hidrotermal de
 micro-ondas / Suelânio Viegas de Santana.- João Pessoa,
 2012.
 86f. : il.
 Orientadores: Dawy Keyson de Araújo Almeida, Iêda Maria
 Garcia dos Santos
 Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
 1. Química. 2. Nanopartículas de prata. 3. Hidrotermal de
 micro-ondas. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Toxicidade.
 6. Citotoxicidade.

UFPB/BC

CDU: 54(043)

SUELÂNIO VIEGAS DE SANTANA

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA E Ag/ZnO NANOESTRUTURADO
COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS OBTIDOS POR
PROCESSO HIDROTERMAL DE MICRO-ONDAS**

Data da Aprovação: João Pessoa, 29 de agosto de 2012

Banca Examinadora

Prof. Dr. Dawy Keyson de Araújo Almeida
Orientador

Profa. Dra. Iêda Maria Garcia dos Santos
Orientadora

Prof. Dr. Jailson Machado Ferreira
Membro Externo

Prof. Dr. Ary da Silva Maia Filho
Membro Interno

**Quero trazer à memória aquilo
que me pode dar esperança.**

Lm 3:21

Ao meu pai e à minha mãe, pelo amor e carinho.

Ao meu filho Thales incondicionalmente amado.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha família, pelo incentivo e por compartilharem comigo a realização dos meus sonhos.

À Vanessa minha noiva e companheira, pelo incentivo, apoio, estando sempre ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu filho Thales que mesmo sem ter a compreensão total da importância desse trabalho aceitou a minha ausência retribuindo com amor e carinho.

Ao prof. Dr. Dawy Keyson de Araújo Almeida, meu orientador e fraterno amigo, pela inestimável orientação, incentivo e confiança, determinantes na execução deste trabalho.

À professora Dr^a Iêda Maria Garcia dos Santos, pelo acolhimento em seu grupo, pelas discussões, orientações e ensinamentos científicos.

Ao Professor Dr. Antônio Gouveia de Souza pelo apoio e colaboração;

À professora Dr. Edeltrudes de Oliveira Lima e Camilla Pinheiro pela orientação, paciência, apoio e imensa ajuda nos testes antimicrobianos.

Ao Prof. Dr. Marçal de Queiroz Paulo, pelas palavras de incentivo, conselhos, amizade e encorajamento na conclusão deste trabalho.

Aos professores Dr. Tibério Andrade Passos e Dr. Severino Jackson Guedes de Lima, pelas análises de MEV realizadas.

Aos colegas Guilherme e Kleber que, além de amigos, contribuíram de forma sempre presente para o término deste trabalho. A vocês a minha eterna gratidão.

Aos colegas, Lucia, João Jarlys, Jeferson, Jandilson, Arnayra, Ana Flavia, Sarah, Augusto, André, Fatima, Cristiano, Anderson, Marcia, Marco Aurelio, Fagner, Danniely, Rosa e a todos que fazem parte do LACOM pelo companheirismo e por todas as ajudas a mim dispensadas.

Aos Colegas do IFPB *campus*-picuí pela amizade e incentivo;

Aos amigos Aurilio Rossy e Thiago Lima sempre presentes ao meu lado nas alegrias e nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos professores que participaram da qualificação e banca examinadora, agradeço-lhes as contribuições, sugestões e críticas;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, pelos ensinamentos;

Aos secretários do LACOM e da coordenação de pós-graduação em química, Marcos Pequeno, pela ajuda e amizade;

A todos os colegas de mestrado da UFPB pelas horas agradáveis de estudo e pelo companheirismo que tiveram durante toda essa luta.

RESUMO

Título: Nanopartículas de prata e Ag/ZnO nanoestruturado como agentes antimicrobiano obtidos por processo hidrotermal de micro-ondas.

Autor: Suelânio Viegas de Santana

Orientadores: Prof. Dr. Dawy Keyson de Araújo Almeida;
Prof^a. Dr^a. Iêda Maria Garcia dos Santos.

Este trabalho consiste na obtenção, caracterização e avaliação antimicrobiana de nanopartículas de prata e Ag/ZnO nanoestruturado. As nanopartículas de prata foram obtidas através de uma nova rota utilizando AgNO_3 como sal precursor e citrato de amônio como agente redutor. Sobre óxido de zinco comercial foram impregnadas nanopartículas de prata por meio do método hidrotermal de micro-ondas em diferentes tempos de síntese. As amostras Ag/ZnO nanoestruturado foram caracterizadas através das técnicas de difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). As nanopartículas de prata coloidais obtidas durante os processos foram caracterizadas por meio da espectroscopia óptica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis). Ensaio de atividade antimicrobiana foram procedidos para o Ag/ZnO nanoestruturado e para as nanopartículas de prata coloidal. Foram incluídas seis espécies bacterianas e seis espécies fúngicas. Análises da atividade tóxica e citotóxica, foram procedidas para as nanopartículas de prata coloidal sobre alevinos de *Poecilia Reticulata* e sobre *Artemia salina*. Os resultados demonstram que método de síntese escolhido se mostrou eficaz para a síntese da prata, bem como no processo de impregnação das nanopartículas de prata sobre o óxido de zinco comercial. Os testes biológicos revelaram significativa atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre os micro-organismos analisados e a sua baixa toxicidade.

Palavras Chave: nanopartículas de prata, hidrotermal de micro-ondas, antimicrobiana, toxicidade, citotoxicidade.

ABSTRACT

Title: Silver nanoparticles and Ag / ZnO nanostructured as antimicrobial agents obtained by hydrothermal process of microwaves.

Author: Suelânio Viegas de Santana

Advisers: Prof. Dr. Dawy Keyson de Araújo Almeida;
Prof^a. Dr^a. Iêda Maria Garcia dos Santos.

Suelânio Viegas de Santana; orientadores: Prof. Dr. Dawy Keyson de Araújo Almeida; Prof^a. Dr^a. Iêda Maria Garcia dos Santos.

This study consists of the acquisition, characterization and evaluation of antimicrobial silver nanoparticles and nanostructured Ag/ZnO. The silver nanoparticles were obtained through a new route using AgNO₃ as precursor salt and ammonium citrate as reducing agent. Concerning the commercial zinc oxide, silver nanoparticles were impregnated using the microwave hydrothermal method at different synthesis times. Samples of Ag / ZnO nanostructured were characterized by using techniques of X-Ray Diffraction (DRX), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive Spectroscopy (EDS). The colloidal silver nanoparticles obtained during the processes were characterized through optical spectroscopy in the ultraviolet and visible (UV-Vis) regions. Antimicrobial activity assays were carried for the Ag / ZnO nanostructured and for colloidal silver nanoparticles. They were included six bacteria species as well as six fungal species. Analysis of toxic and cytotoxic activity was performed for colloidal silver nanoparticles on fingerlings of *Poecilia Reticulata* and *Artemia salina*. The results show that the chosen synthesis method is effective for silver synthesis, as well as for the process of impregnation of the silver nanoparticles on the commercial zinc oxide. The biological tests revealed significant antimicrobial activity of silver nanoparticles on the micro-organisms analyzed and their low toxicity.

Keywords: silver nanoparticles, microwave hydrothermal, antimicrobial, toxicity, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) imagens de fibras virgens, (b) Os tecidos revestidos com nanopartículas de Ag com uma ampliação baixa, (c) Os tecidos revestidos com Ag nanopartículas com uma ampliação elevada.....	22
Figura 2. Esquema ilustrativo demonstrando a síntese, funcionalização da superfície e redução do dendrímero PAMAM, juntamente com a formação das nanopartículas de ouro dendrimerizadas.....	29
Figura 3. Análise dos agentes estabilizantes relatados em estudos de síntese de nanopartículas de prata.....	30
Figura 4. Espectro eletrônico de absorção no UV-Vis da solução de prata coloidal.....	31
Figura 5. Espectro UV-Vis de nanopartículas de prata coloidal preparadas em diferentes quantidades de sementes.....	32
Figura 6. Espectros de UV-visível de nanopartículas de prata em diferentes da oncentrações de AgNO_3 . $[\text{AgNO}_3] = 0,5$ (1c), $1,5$ (2c), 2 (3c), $2,5$ (4c) mmol/l.....	33
Figura 7. Espectro de absorção do UV-Vis de nanopartículas de prata estabilizadas com AOT em diferentes potencias de micro-ondas.....	34
Figura 8. Faixa de abrangência das ondas eletromagnéticas.....	37
Figura 9. Reator hidrotermal de micro-ondas.....	40
Figura 10. Partes que compõem o reator hidrotermal de micro-ondas.....	41
Figura 11. Fluxograma da síntese de nanopartículas de prata.....	42
Figura 12 - Fluxograma do processo de síntese/impregnação de nanopartículas de prata sobre o óxido de zinco.....	44
Figura 13. Difratomogramas da prata em diferentes tempos de síntese.....	52
Figura 14. Difratomogramas Ag/ZnO e do ZnO.....	54
Figura 15. Dados da prata suportada sobre ZnO em 5 min de síntese: a) imagem de MEV; b) Mapeamento da Ag; c) Espectro de EDS.....	55
Figura 16. Dados da prata suportada sobre ZnO em 15 min de síntese: a) Imagem de MEV; b) Mapeamento da Ag; c) Espectro de EDS.....	56
Figura 17. Dados da prata suportada sobre ZnO em 30 min de síntese: a) imagem de MEV; b) Mapeamento da Ag; c) Espectro de EDS.....	57

Figura 18. Espectro de absorção do UV-VIS das amostras das soluções sobrenadantes diluídas na proporção 1:2.....	59
Figura 19. Fotografia das soluções sobrenadantes sintetizadas no RHM em diferentes tempos de síntese (min): a = 5; b = 15; c = 30.....	60
Figura 20. Espectro de absorção do UV-VIS das amostras das soluções sobrenadantes obtidas durante a síntese/impregnação de nanopartículas sobre o óxido de zinco em diferentes tempos de processamento.....	61
Figura 21. Fotografia das soluções sobrenadantes obtidas durante a síntese/impregnação de nanopartículas de prata no RHM em diferentes tempos de processamento (min): a = 5; b = 15; c = 30.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição de alguns curativos comerciais que utilizam a prata como agente antimicrobiano.....	24
Tabela 2. Correlação de tamanhos de nanopartículas de prata e o comprimento de onda na análise por espectroscopia por UV-vis.....	32
Tabela 3. Precursores utilizados nas sínteses nanoestruturadas de prata	40
Tabela 4. FWHM, tamanho de cristalito, parâmetros de rede e volume da célula unitária das amostras sintetizadas pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas.....	53
Tabela 5. Massa de prata metálica nos diferentes tempos de síntese.....	62
Tabela 6. Massa das nanopartículas de prata coloidal nos diferentes tempos de síntese.....	63
Tabela 7 Rendimento percentual (em massa) das fases obtidas na síntese em diferentes tempos de processamento.....	64
Tabela 8. Resultados dos ensaios de atividade biológica das soluções contendo NPC-5 sobre bactérias e leveduras do gênero <i>cândida</i>	66
Tabela 9. Resultados dos ensaios de atividade biológica das soluções contendo NPC-15 sobre bactérias e leveduras do gênero <i>cândida</i>	67
Tabela 10. Resultados dos ensaios de atividade biológica das soluções contendo NPC-30 sobre bactérias e leveduras do gênero <i>cândida</i>	68
Tabela 11. Resultado dos ensaios de atividade biológica da solução original de AgNO ₃ diluída inicialmente na proporção 1:1 sobre bactérias e leveduras do gênero <i>cândida</i>	70
Tabela 12. Resultados dos ensaios de atividade biológica das soluções NPC-30 sem a presença de íons Ag ⁺ residuais sobre bactérias e leveduras do gênero <i>cândida</i>	71
Tabela 13. Resultados dos ensaios de atividade biológica do Ag/ZnO sintetizados em 5 minutos.....	73
Tabela 14. Resultados dos ensaios de atividade biológica do Ag/ZnO sintetizados em 15 minutos.....	74

Tabela 15. Resultados dos ensaios de atividade biológica do Ag/ZnO sintetizados em 30 minutos.....	75
Tabela 16. Resultados dos ensaios de atividade biológica dos sólidos obtidos nas sínteses e para o ZnO.....	77
Tabela 17. Resultados dos testes citotóxicos das soluções de nanopartículas de prata coloidal em <i>Artemia salina</i> , após 24 horas.....	78
Tabela 18. Resultados dos testes toxicológicos de uma solução contendo íons Ag ⁺ em alevinos de <i>Poecilia reticulata</i> , após 24 horas.....	79
Tabela 19. Resultados dos testes toxicológicos das soluções coloidais de nanopartículas de prata em alevinos de <i>Poecilia reticulata</i> , após 24 horas.....	79

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Å – angstroms.

a, b, c – parâmetros de cela unitária.

Ag – Prata.

AOT – bis(2-etil hexil) sulfossuccinato de sódio.

ATCC – American Type Culture Collection.

CFC – cúbica de face centrada.

CIM – concentração inibitória mínima.

CTAB – Brometo de cetil trimetil amônio.

DRX – difração de raios-X.

DL₅₀ – Dose letal capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste.

EDL – Electrical double layer.

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

g – grama.

GHz – GigaHertz.

Hz – Hertz.

INLAB – investigação laboratorial.

JCPDS – Joint Committee on Powder Diffraction Standards.

LACOM – Laboratório de combustíveis e materiais.

LM – Laboratório de micologia.

m – metro.

MPC-5 – nanopartículas de prata sintetizadas durante 5 minutos

MPC-15 – nanopartículas de prata sintetizadas durante 15 minutos

MPC-30 – nanopartículas de prata sintetizadas durante 30 minutos

MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

mg – miligrama.

MHz – MegaHertz.

min – minuto.

mm – milímetro.

nm – nanômetro.

NPC – nanopartículas de prata coloidal

PAMAM – Poliamidoamina.

PEG – poliestearato de etilnoglicol.

pH – potencial hidrogeniônico.

ppm – partes por milhão.

PVA – polivinil álcool.

PVP – Polivinilpirrolidona

RHM – Reator hidrotermal de micro-ondas.

ROS – Reactive oxygen species.

SDS – Dodecil sulfato de sódio.

SPR – Surface plasmon resonance.

UFC – unidade formadora de colônia.

UV – Ultra violeta.

UV-Vis – Ultravioleta e visível.

μL – microlitro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1 Atividade antimicrobiana.....	22
3.2 Síntese e caracterização de nanopartículas de prata.....	26
3.2.1 Nanopartículas de prata em sistemas coloidais.....	27
3.2.2 Caracterização de nanopartículas de prata coloidal.....	31
3.3 Óxido de zinco.....	35
3.4 Tecnologia de micro-ondas.....	37
4.METODOLOGIA.....	40
4.1 Reagentes.....	40
4.2 Síntese.....	41
4.2.1 Síntese da prata pelo método hidrotermal de micro-ondas.....	41
4.2.2 Impregnação de nanopartículas de prata sobre o óxido de zinco micrométrico pelo método hidrotermal de micro-ondas.....	43
4.3 Técnicas de caracterização.....	45
4.3.1 Difração de raios X (DRX).....	45
4.3.1.1 Tamanho de cristalino (TC) e largura a meia altura.....	45
4.3.1.2 Parâmetros de rede (PR) e volume da célula unitária (VCU).....	46
4.3.2 Espectroscopia óptica nas regiões ultravioleta e visível (UV-vis).....	47
4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	47
4.3.4.Gravimetria.....	48
4.3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	48
4.3.5.1 Produtos testados.....	48
4.3.5.2 Antimicrobianos sintéticos.....	49
4.3.5.3 Micro-organismos.....	49
4.3.5.4 Meios de cultura.....	49
4.3.5.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	50

4.3.6 Análise da atividade tóxica e citotóxica de nanopartículas de prata coloidal.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Difração de raios-X.....	52
5.1.1 Largura a meia altura (FWHM), tamanho de cristalino e parâmetros de rede.....	53
5. 2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	55
5. 3 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)	59
5.4 Gravimetria.....	62
5.5 Testes biológicos.....	64
5.5.1 Ensaios de atividade antimicrobiana.....	64
5.5.2 Ensaios de atividade citotóxica e tóxica de nanopartículas de prata coloidal.....	78
6 CONCLUSÕES.....	80
7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	81
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia amiúde vem sendo tratada de maneira transdisciplinar por químicos, físicos, biólogos, engenheiros e farmacêuticos, entre outros profissionais (FERNANDES, 2008) com o intuito de desenvolver novos materiais alicerçados em quatro fundamentos básicos: (I) síntese/preparação, (II) caracterização, (III) estudo de propriedades e relação estrutura-propriedade e (IV) aplicações (ZARBIN, 2007). Recentemente a preparação de nanopartículas tem recebido uma grande atenção por parte da comunidade acadêmica devido às propriedades catalíticas, ópticas, eletrônicas, magnéticas e bactericidas (SIFONTES, 2010).

As propriedades diferenciadas que muitos materiais apresentam quando em escala nanométrica, comparadas aos de dimensões micrométricas, têm como um dos motivos principais a alta relação entre superfície e volume, fazendo com que ocorra um aumento do número de átomos que estão localizados na superfície do material ao se comparar ao número de átomos que estão na região interna das partículas. Por outro lado, muitas propriedades físicas e químicas de materiais nanoestruturados emergem dos defeitos presentes em suas superfícies, como é o caso do nível de ordem e desordem a curto alcance, como por exemplo elétron/buraco e vacância de oxigênios (OLIVEIRA, 2005).

O método escolhido para obtenção de um determinado material em dimensão nanométrica tem um papel crucial nas suas propriedades magnéticas, ópticas e elétricas. De modo que um material obtido por método diferente pode apresentar mudanças sensíveis nas suas propriedades, na sua morfologia bem como na sua estrutura cristalina e composição (OLIVEIRA, 2009). Portanto no desafio de obtenção de novos materiais, várias metodologias e técnicas de preparação vêm sendo desenvolvidas com o intuito de se controlar a fase, a morfologia e o tamanho de partícula, como consequência, melhorar e maximizar suas propriedades. Diferentes métodos de síntese para obtenção de nanopartículas são descritos na literatura, incluindo-se os métodos hidrotermais, co-precipitação, microemulsão, o método sol-gel dentre outros (KEYSON, 2006).

Recentemente, o uso da tecnologia de micro-ondas tem sido explorado como uma promissora técnica para a síntese de nanoestruturas. A radiação de micro-ondas gera locais de nucleação muito rapidamente na solução aumentando assim significativamente a cinética da reação em relação ao aquecimento convencional (ASWATHY *et al.*, 2011). Sínteses químicas vêm sendo conduzidas em aparelhos de micro-ondas modificados que possibilitam o controle da temperatura e pressão, de modo que esses reatores de micro-ondas têm se tornado mais eficientes do ponto de vista energético e garantindo uma maior reprodutibilidade de processo (SANSEVERINO, 2002).

No âmbito tecnológico, materiais de ordem de grandeza nanométrica podem apresentar as mais diversas aplicações em diferentes áreas, como por exemplo, na optoeletrônica, condutores transparentes, sensores de gás, fotocatalise e fotoluminescência (OLIVEIRA, 2009). Na área médica, as nanopartículas metálicas e de seus óxidos têm se mostrado promissoras na sua utilização como fármacos, principalmente, na ação contra micro-organismos (GARCIA, 2011).

As propriedades antimicrobianas da prata são conhecidas há séculos, o seu uso para fins medicinais tem se expandido com o tempo, sendo utilizada em uma variedade de materiais na área de saúde e bem-estar humano, como por exemplo o seu uso em cateteres com a finalidade de evitar infecções (SMETANA *et al.*, 2008). Com o aparecimento e crescimento de organismos microbianos resistentes a múltiplos antibióticos, diferentes formas de nanomateriais de prata estão entre os mais promissores agentes antimicrobianos que vêm sendo desenvolvidos a partir da nanotecnologia (ASHARANI *et al.*, 2009; MARAMBIO-JONES e HOEK, 2010).

Uma área que tem crescido rapidamente na nanotecnologia tem sido a concepção e fabricação de novos materiais, neste sentido tem se tornado um campo de interesse a interação de nanopartículas metálicas sobre determinadas superfícies, como no caso de fibras têxteis impregnadas com nanopartículas metálicas (PERELSHTEIN *et al.*, 2008). A incorporação de nanopartículas metálicas se dá principalmente via dois métodos: por dopagem (ou substituição) ou ainda por impregnação do metal (SAHA, WANG e PAL, 2008).

Assim sendo, o presente trabalho tem como foco a obtenção de nanopartículas de prata e a sua impregnação sobre óxido de zinco micrométrico, para aplicações antimicrobianas, através de uma nova rota de síntese utilizando o processo hidrotermal de micro-ondas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar, caracterizar nanopartículas de prata e nanopartículas de prata impregnadas sobre óxido de zinco comercial e avaliar sua atividade antimicrobiana.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Propor uma nova rota de síntese para obtenção de nanopartículas de prata;
- ❖ Sintetizar nanopartículas de prata através do método hidrotermal de micro-ondas;
- ❖ Caracterizar as nanopartículas de prata;
- ❖ Impregnar as nanopartículas de prata sobre óxido de zinco comercial de tamanho micrométrico através do método hidrotermal de micro-ondas;
- ❖ Caracterizar o material obtido na impregnação da prata sobre o óxido de zinco;
- ❖ Avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata coloidal.
- ❖ Avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata impregnadas em óxido de zinco micrométrico.
- ❖ Avaliar a toxicidade e citotoxicidade das nanopartículas de prata coloidal e dos íons Ag^+ .

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Atividade antimicrobiana

Ao longo do século 20, a redução dos índices de mortalidades por doenças infecciosas foi atribuída à utilização de agentes antimicrobianos. Entretanto a resistência aos antibióticos tem atingido, atualmente, um nível crítico e, em alguns casos, tornando ineficaz o seu uso clínico. A contínua evolução da resistência antimicrobiana ameaça a saúde humana, comprometendo de forma expressiva a capacidade de tratar infecções graves (HUH e KWON, 2011).

Um caminho para se resolver a resistência bacteriana às drogas antimicrobianas tem sido a descoberta de novos antibióticos e a modificação química de antimicrobianos já existentes. Uma nova rota que vem sendo explorada é a da utilização de nanomateriais antimicrobianos, em que agentes patogênicos não desenvolvam resistência. Materiais nanoestruturados como óxido de titânio, prata e óxido de zinco, entre outros, têm apresentado um amplo potencial antibacteriano sobre fibras têxteis por exemplo. (HUH e KWON, 2011; DASTJERDI e MONTAZER, 2010). Novos produtos na indústria de vestuário vêm sendo desenvolvidos utilizando a imobilização de materiais nanoestruturados em seus tecidos. Através de um processo denominado sonoquímica, que consiste na impregnação de nanopartículas, foi possível preparar tecidos tais como: nylon, poliéster e algodão revestidos com nanopartículas de prata com propriedades antibacteriana, como visto na Figura 1.

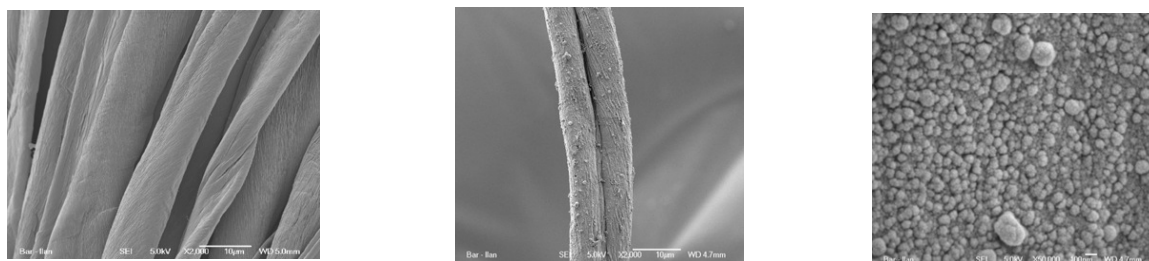


Figura 1 - (a) Imagens de fibras virgens, (b) Os tecidos revestidos com nanopartículas de Ag com uma ampliação baixa, (c) Os tecidos revestidos com Ag nanopartículas com uma ampliação elevada (PERELSHTEIN, 2008).

Entre as propriedades apresentadas em produtos têxteis tratados com nanomateriais podem ser citadas a: repelência à água, resistência ao amarelecimento, retardantes de chama, sistemas bactericidas, proteção UV etc (GARCIA, 2011).

Desde a antiguidade, a prata metálica vem sendo aplicada e estudada como agente bactericida, devido a sua eficiência e baixa toxicidade para as células humanas (DASTJERDI e MONTAZER, 2010). A prata metálica, nitrato de prata e sulfadiazina de prata já foram utilizados no tratamento de queimaduras e no controle bacteriano, mas o seu uso se tornou impopular com a descoberta da penicilina na década de 1940. Diante do surgimento de bactérias resistentes a antibióticos, reacendeu-se o interesse na utilização clínica da prata (HUH e KWON, 2011).

As propriedades antimicrobianas de nanopartículas de prata são bem estabelecidas e têm se mostrado eficazes contra bactérias, como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, entre outras (MARAMBIO *et al.*, 2010).

Diversos produtos usando prata, seja ela na forma metálica ou iônica, administrada de forma tópica, como agente bacteriano têm sido lançados no mercado e vêm ganhando popularidade diante da propagação de bactérias resistentes a antibióticos como é o caso da *Staphylococcus aureus* resistente. Vários curativos, com ação antimicrobiana, para o tratamento de feridas estão sendo comercializados pela indústria farmacêutica, a Tabela 1 mostra alguns curativos disponíveis no mercado e o conteúdo de prata presente.

Tabela 1- Descrição de alguns curativos comerciais que utilizam a prata como agente antimicrobiano (GARCIA, 2011).

Nome do produto	Fabricante	Conteúdo de Ag (mg/100 cm ²)	Descrição resumida do medicamento
Silverlon ®	Argentum Medical	546	É um tecido contendo prata depositada pelo processo de oxirredução catalítica de metalização onde cada fibra do tecido é revestida totalmente com prata, resultando numa liberação de prata iônica muito abrangente.
Calgitrol®	Biomedical Technologies Inc	141	Formado por espuma absorvente, revestido na superfície por uma matriz de alginato e prata iônica.
Acticoat®	Smith and Nephew	105	É formado por malhas de tecidos onde a prata é aplicada a uma malha de polietileno por deposição a vapor que resulta na formação de cristais microscópico de prata metálica.
Contreet Foam®	Coloplast	85	Constituído de uma espuma de poliuretano que contém prata iônica que é liberada com a absorção do exsudato da ferida pela espuma.
Contreet Hydrocolloid ®	Coloplast	32	Baseado na tecnologia de hidrocoloides que libera prata iônica enquanto absorve líquidos oriundos da ferida.
Aquacel Ag®	ConvaTec	8,3	Constituído de uma carboximetilcelulose sódica contendo 1,2% de prata iônica.
SilvaSorb ®	Medline	5,3	É composto de uma matriz de poliacrilato hidrofílico na qual partículas de prata micrométrica são suspensas.
Actisorb Silver 220®	Johnson & Johnson	2,7	É constituído basicamente de um tecido impregnado de carvão ativado e partículas de prata micrométrica.

A utilização de forma tópica da prata possibilita o combate direto à infecção, aumentando a velocidade do processo de cicatrização de doenças cutâneas com pobre irrigação sanguínea onde há um aumento da proliferação de bactérias em feridas crônicas, sendo de difícil tratamento com antibióticos que apresentam dificuldades de acesso às lesões (GARCIA, 2011).

Apesar do estudo do mecanismo de efeito antimicrobiano ainda estar parcialmente indefinido, é de conhecimento da comunidade científica que as diferentes formas da prata, metálica em tamanho micrométrico, íons de prata e prata nanométrica apresentam mecanismos de ação diferentes (MARAMBIO *et al.*, 2010).

Estudos recentes do mecanismo de ação dos íons de prata (Ag^+) em micro-organismos parcialmente conhecidos (DIBROV *et al.*, 2002) relatam que o efeito inibitório do Ag^+ está diretamente relacionado com a atração eletrostática entre a parede celular dos micro-organismos carregada negativamente e a carga positiva dos íons de prata (KIM *et al.*, 2007). No entanto, íons de prata têm apenas uma utilização antimicrobiana limitada devido à sua elevada toxicidade e baixa estabilidade. Estas limitações podem ser minimizadas utilizando-se nanopartículas de prata estáveis, em vez de íons de Ag^+ (MOHANTY *et al.*, 2011).

Embora o mecanismo de ação das nanopartículas de prata sobre as bactérias ainda não esteja completamente elucidado, os três mecanismos mais comuns que tentam esclarecer a bioatividade são os seguintes:

- 1) Captação de íons de prata gerados através da dissolução oxidativa de nanopartículas de prata. Células bacterianas expostas a íons de prata poderiam sofrer alterações morfológicas como por exemplo o deslocamento da membrana celular permitindo assim o vazamento do conteúdo intracelular (ASHARANI *et al.*, 2008).
- 2) Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). As espécies reativas de oxigênio, tais como H_2O_2 e $\text{OH}^\cdot$, entre outras são subprodutos do metabolismo natural dos organismos. As nanopartículas de prata poderiam agir como catalisadores na produção das ROS em excesso gerando assim um estresse oxidativo na célula provocando uma ruptura da membrana celular (SU *et al.*, 2009).

- 3) Prejuízo direto à membrana celular. As nanopartículas poderiam interagir diretamente com membrana bacteriana aderindo e penetrando no interior da célula induzindo a formação de “enormes buracos” na membrana celular e, como consequência, o vazamento do conteúdo celular (SMENTANA *et al.*, 2008)

Diante do caráter não conclusivo dessas hipóteses abordadas, há de se considerar que a prata pode apresentar uma ação sinérgica e não um só modo de atuação na atividade antibacteriana (MOHANTY *et al.*, 2011).

3.2 Síntese e caracterização de nanopartículas de prata

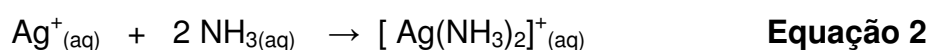
Muitos métodos de obtenção de nanopartículas de prata têm sido descritos pela literatura, rotas de preparação e condições experimentais, tais como reagentes, estabilizantes, pH, temperatura e até mesmo a taxa de adição dos agentes redutores são parâmetros importantes de controle do tamanho das partículas e de sua morfologia (KHAN *et al.*, 2011). Entre os modos de preparação de partículas nanométricas de prata, um dos mais difundidos consiste na utilização do citrato de sódio como agente redutor e tendo como precursor soluções de nitrato de prata. Devido às características não tóxicas do citrato, o método Turkevich (TURKEVICH, STEVENSON e HILLIER, 1951) tem recebido uma ampla aplicação na obtenção de prata nanométrica. Embora esse método seja abordado de várias maneiras em relação ao tempo de reação, tempo de agitação e de aquecimento e resfriamento, a sua reprodutibilidade consiste basicamente na utilização de soluções aquosas de sais de prata e citrato de sódio mantidos sob agitação, aquecimento e posterior resfriamento (GORUP, 2011).

A reação global envolvida no processo ainda não está totalmente elucidada. A literatura propõe, dentre outras, a seguinte equação:

Equação1: Equação química global de redução de Ag^+ a Ag^0 (YANG, 2010)



Estudos recentes demonstram a possibilidade da utilização da amônia como moderador na obtenção de coloides de nanopartículas de prata. O ponto crucial para a obtenção de núcleos pequenos de nanopartículas de prata coloidal é a formação de um número grande de núcleos no início do processo, mas apenas uma fração dos íons de prata disponíveis seria reduzida. Havendo disponibilidade de Ag^+ , portanto, os novos núcleos iriam se formar e os núcleos já formados continuariam a crescer. Adição de amônia pode levar a formação de um complexo segundo a equação:



A presença da amônia no meio reacional pode impedir “momentaneamente” a formação de novos núcleos e o crescimento das nanopartículas já formadas, acarretando assim na geração de nanopartículas de tamanho muito pequeno (GORUP *et al.*, 2011).

3.2.1 Nanopartículas de prata em sistemas coloidais

O objeto de investigação dos coloides está relacionado com o estudo dos sistemas nos quais pelo menos um dos componentes da mistura apresenta uma das suas dimensões características no intervalo de 1 a 1000 nanômetros, dispersos homogeneamente em um meio contínuo que pode ser um gás, um líquido ou até mesmo um sólido. As partículas dispersas podem apresentar tamanhos diferentes (sistemas polidispersos) ou o mesmo tamanho (sistemas monodispersos). Devido à elevada área superficial em virtude do pequeno tamanho das partículas, as propriedades da interface entre as fases disperso e dispersante determinam o comportamento dos diferentes sistemas coloidais (JAFELICCI e VARANDA, 1999).

A síntese de coloides nanoparticulados envolve, simultaneamente, os processos de nucleação, crescimento e aglomeração das partículas. A etapa de nucleação começa quando inúmeros núcleos de cristais são inicialmente

formados, mas estes tendem a se agregar (etapa de crescimento) para formar cristais termodinamicamente mais estáveis. A etapa de aglomeração é favorecida pela maximização da razão superfície/volume das nanopartículas formadas. Além disso, há entre elas uma força de atração mútua que tende a condensá-las em grandes aglomerados a fim de minimizar a área superficial e com isso baixar a tensão de superfície do sistema (ATKINS, 1994; OLIVEIRA, 2005).

Para a formação de nanopartículas dispersas em um sistema coloidal por uma reação de precipitação, é fundamental que na etapa final da reação ocorra o término do crescimento e a estabilização das nanopartículas formadas. De um modo geral, existem dois mecanismos básicos de estabilização de dispersos em sistemas coloidais. O primeiro baseia-se na dispersão por repulsão eletrostática das nanopartículas formadas resultante da interação entre a camada dupla elétrica (*electrical double layer* - EDL) que cerca as partículas, pelo fato de haver uma distribuição desigual de cargas entre o solvente e a superfície da partícula. A estabilização eletrostática se efetiva quando as forças atrativas de Van der Waals são superadas pelas forças eletrostáticas repulsivas. A camada dupla elétrica é uma estrutura que surge na superfície da partícula quando colocada em contato com solvente líquido. Ela é formada por duas camadas: uma é chamada carga de superfície, podendo ser positiva ou negativa, que coincide com a superfície da partícula; a outra está na superfície do líquido e é eletricamente oposta à primeira camada, sendo chamada de camada difusa, pois é formada de íons livres (GARCIA, 2011).

No segundo mecanismo possível para a estabilização, é utilizada uma camada protetora com o emprego de outro material, formando assim uma camada passivadora, onde a sua ação baseia-se no aproveitamento do efeito estérico, evitando assim a aproximação entre as nanopartículas formadas (HENGLEIN, 1989; MATIJEVIC, 1993). As nanopartículas revestidas com camada passivadora ao se aproximarem uma das outras têm sua mobilidade dificultada por um efeito de natureza entrópica. O composto usado como camada passivadora é chamado de passivante. A escolha adequada dele depende basicamente da composição química das partículas a serem estabilizadas no sistema coloidal. Para nanopartículas metálicas, vários

compostos vêm sendo utilizados como estabilizadores a exemplo dos polímeros ou moléculas contendo grupos terminais $-SH$, $-NH_2$, $-CN$ entre outros. Coloides nanoparticulados estabilizados apresentam inúmeras vantagens, são estáveis por mais tempo em solução, podendo ser ainda precipitados, secos ou redissolvidos sem perder suas características de estabilidade (OLIVEIRA, 2005; TOLAYMAT *et al.*, 2010).

Um exemplo interessante na estabilização de partículas metálicas em escala nanométrica é a utilização de dendrímeros como passivantes. Huang e Tomalia (2005) sintetizaram nanopartículas de ouro e o dendrímero poli(amidoamina) (PAMAM), contendo núcleo disulfeto e possuindo grupos terminais carboxílicos ou hidroxílicos. O PAMAM foi utilizado como passivante. Na Figura 2 o esquema da síntese do PAMAM é ilustrado juntamente com a formação das nanopartículas de ouro passivadas pelo dendrímero.

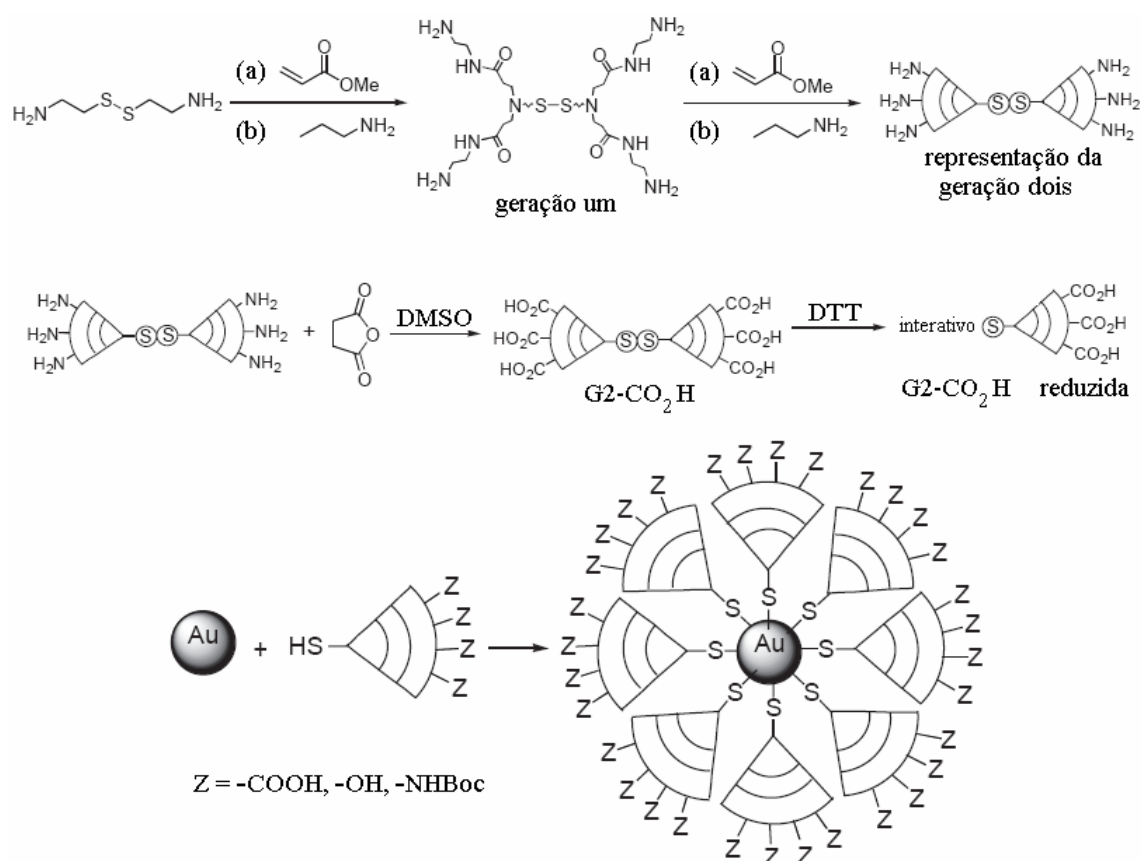


Figura 2 - Esquema ilustrativo demonstrando a síntese, funcionalização da superfície e redução do dendrímero PAMAM, juntamente com a formação das nanopartículas de ouro dendrimerizadas (HUNG e TOMALIA, 2005).

O íon citrato também exerce a função de estabilizante protegendo os recém-formados núcleos de prata, que apresentam uma preferência intrínseca de crescimento de seus cristais. A concentração de citrato também influencia a morfologia das nanopartículas de prata formadas (YANG *et al.*, 2010). Além do citrato, outras espécies também vêm sendo usadas como estabilizadores e/ou direcionadores podendo ser o PVP (polivinilpirrolidona), PVA (polivinilálcool), PEG (poliestearato de etilenoglicol), entre outros.

A seleção do estabilizante depende da aplicação das nanopartículas formadas, além de estarem diretamente relacionadas com a estabilidade, reatividade, tamanho e forma dessas partículas em escala nanométrica. Como ilustrado na Figura 3 em uma revisão da literatura Tolaymat *et al.*(2010) mostram que o íon citrato tem sido, para aplicações em geral, o estabilizante mais empregado para nanopartículas de prata.

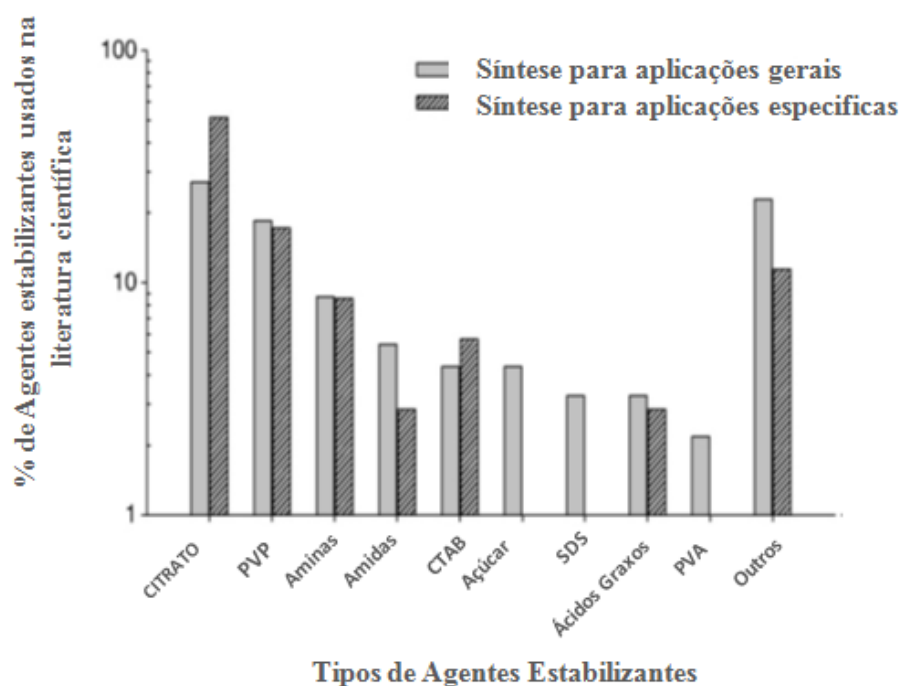


Figura 3 - Análise dos agentes estabilizantes relatados em estudos de síntese de nanopartículas de prata (TOLAYMAT *et al.*, 2010).

3.2.2 Caracterização de nanopartículas de prata coloidal

Nos últimos anos, um dos métodos mais difundido para caracterizar nanopartículas de prata coloidal tem sido a espectroscopia UV – Visível. O comportamento de absorção surge devido à ressonância plasmon de superfície, *surface plasmon resonance* (SPR), que se origina decorrente das oscilações dos elétrons da banda de condução das nanopartículas induzidos pelo campo eletromagnético. Nanopartículas de prata apresentam uma SPR na região do visível, suas propriedades ópticas e fototérmicas surgem das oscilações ressonantes dos seus elétrons livres. Na Figura 4 é apresentado um espectro de absorção UV – Vis de prata coloidal. Observa-se que a absorção do plasmon de superfície dá origem a uma banda larga, com um pico de absorção em torno de 408 nm. O ponto máximo de absorção no espectro UV-Vis de soluções coloidais de nanocristais está relacionado ao tamanho médio das partículas, por outro lado a largura da banda de absorção está relacionada com a dispersão das partículas (GARCIA, 2011; DE SANTANA, 2006).

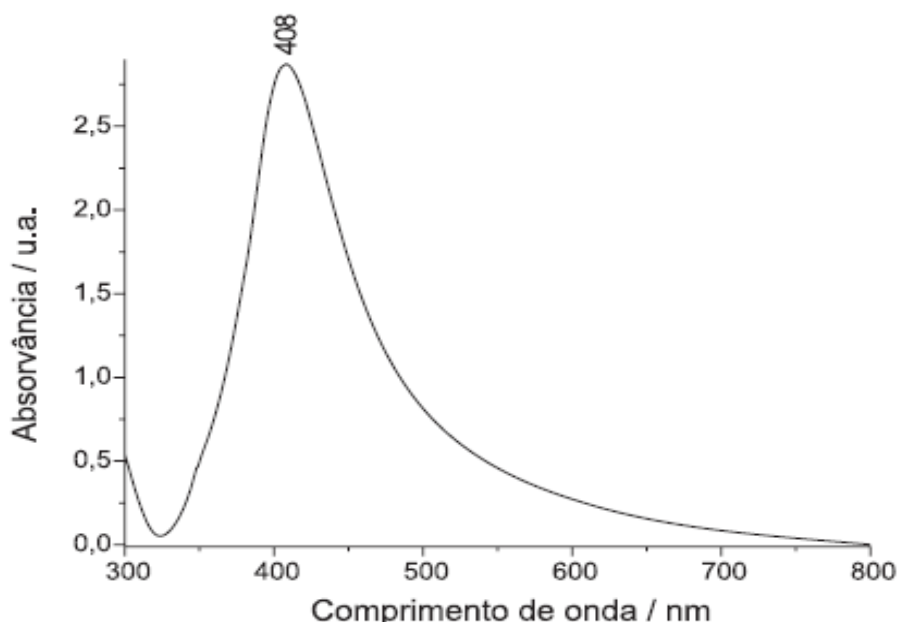


Figura 4 - Espectro eletrônico de absorção no UV-Vis da solução de prata coloidal (DE SANTANA, 2006).

Estudos recentes demonstram um forte impacto do tamanho das partículas na dispersão da luz de modo que dispersões coloidais de

nanopartículas de prata de tamanhos diferentes apresentam cores diferentes, além de bandas características de UV-Vis. Samanta *et al.* (2012) utilizaram a técnica de crescimento mediado por “semeadura” para obtenção de nanopartículas de prata de tamanhos variados relacionando-os com o comprimento de onda da banda de absorção, conforme ilustrada a Figura 5.

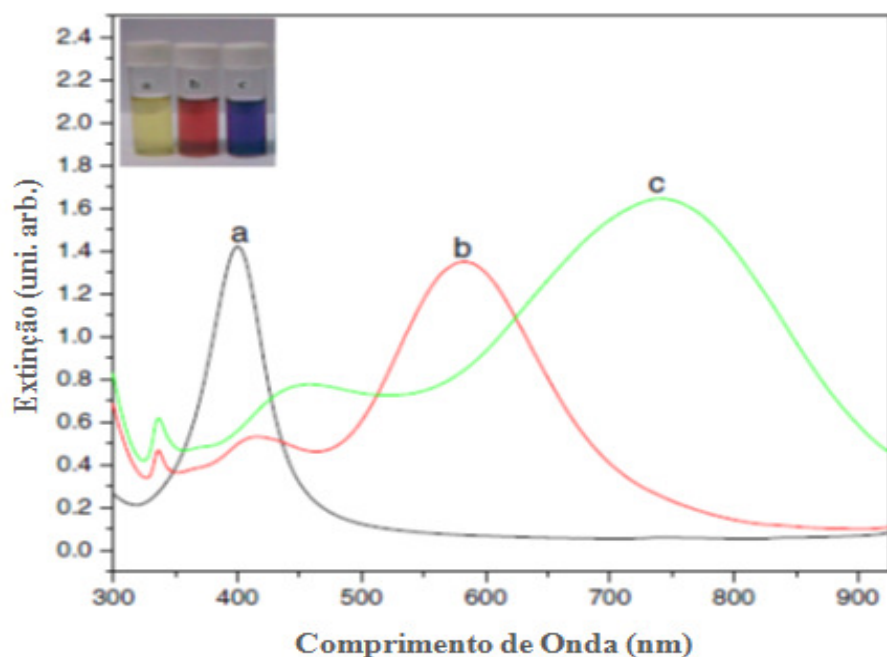


Figura 5 - Espectro UV-Vis de nanopartículas de prata coloidal preparadas em diferentes quantidades de sementes (SAMANTA *et al.*, 2012).

Estudos correlatos (SOLOMON, 2007) associam o diâmetro médio das nanopartículas de prata a um padrão de absorbância e comprimento de onda, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Correlação de tamanhos de nanopartículas de prata e o comprimento de onda na análise por espectroscopia por UV-vis (SOLOMON, 2007).

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

Nos processos de obtenção de nanopartículas de prata em solução coloidal, pela redução de íons Ag^+ durante o progresso da reação, um maior número de íons de prata é reduzido resultando no aumento do tamanho das nanopartículas; com isso as transições multipolares de superfície *plasmon* tornam-se mais proeminentes refletindo no aumento da intensidade da banda de absorção (GARCIA, 2011).

El-Shishtawy, Asiri e Al-Otaibi (2011) sintetizaram nanopartículas de prata em solução coloidal utilizando AgNO_3 como precursor em diferentes concentrações, glicose como agente redutor e brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), como estabilizante. Durante o estudo analisaram o efeito da concentração do AgNO_3 na banda de absorção do UV-Vis.

Os resultados encontrados na Figura 6 demonstraram uma relação entre a altura do pico com a concentração de nanopartículas de prata na solução coloidal, onde o aumento da concentração de prata provocou um aumento da intensidade da banda de absorção.

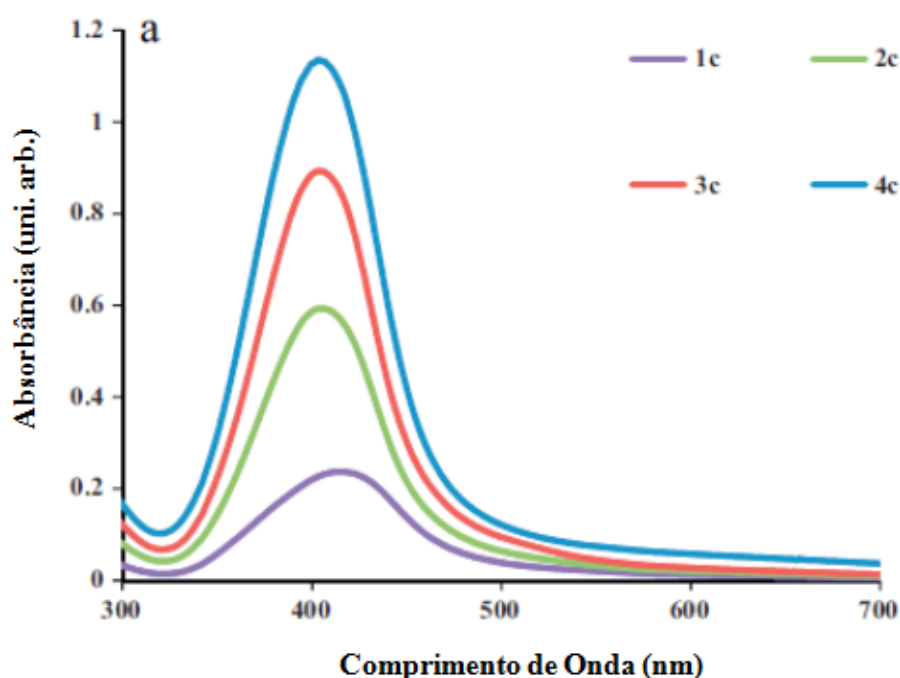


Figura 6 - Espectros de UV-visível de nanopartículas de prata em diferentes da oncentrações de AgNO_3 . $[\text{AgNO}_3] = 0,5$ (1c), 1,5 (2c), 2 (3c), 2,5 (4c) mmol/l (EL-SHISHTAWY, ASIRI e AL-OTAIBI, 2011).

Aswathy *et al.* (2011) obtiveram, através da síntese assistida por micro-ondas, uma solução coloidal de nanopartículas de prata por meio da redução de Ag^+ proveniente do AgNO_3 , com a vanilina ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) como agente redutor e dodecilsulfato de sódio (SDS) ou o bis(2-etil hexil) sulfossuccinato de sódio (AOT) como estabilizantes.

A análise do espectro de absorção na região do UV-Vis mostrou a formação de uma banda de absorção centrada em 385 nm e um ombro em 430 nm. A presença de uma banda larga constituída de dois picos pode ser atribuída à formação de uma fina camada de Ag_2O formada na superfície das nanopartículas de prata. O pico fino em torno de 385 nm indicou a formação de prata nonométrica sem camadas de Ag_2O . Já a banda de absorção em 430 nm sugeriu a existência de $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{O}$, numa estrutura conhecida como *core-sheer/* (núcleo-concha). A Figura 7 mostra o espectro do UV-Vis de nanopartículas de prata em diferentes potencias de micro-ondas.

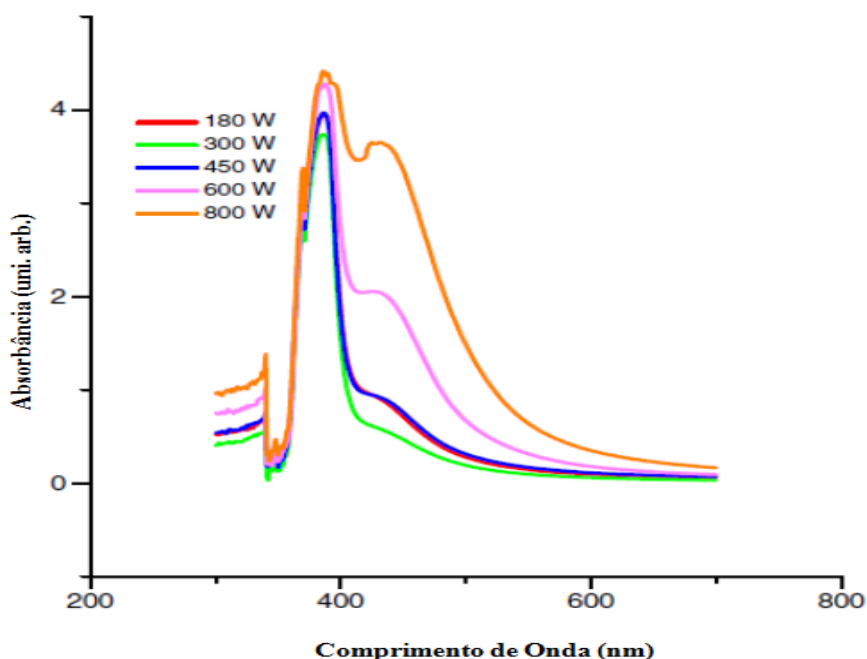


Figura 7 - Espectro de absorção do UV-Vis de nanopartículas de prata estabilizadas com AOT em diferentes potencias de micro-ondas (ASWATHY *et al.*, 2011).

3.3 Óxido de zinco

O óxido de zinco cristaliza-se em estruturas cúbicas do tipo wurtzita, sal de rocha e blenda de zinco. Sob condições ambientes a forma wurtzita é a estrutura mais estável enquanto a blenda de zinco é uma estrutura metaestável, podendo ser estabilizada por crescimento em substratos cúbicos. Por outro lado, a forma sal de rocha é geralmente estável apenas sob condições extremas de pressão.

A estrutura do tipo wurtzita apresenta uma célula unitária hexagonal com dois parâmetros de rede $a = b \neq c$ e $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$, sendo $a = 3,25 \text{ \AA}$ e $c = 5,12 \text{ \AA}$, onde a razão de $c/a = (8/3)^{1/2} = 1,633$ pertencendo ao grupo espacial $P6_3mc$ e faz parte da classe cristalográfica $6mm$. Essa estrutura é formada por duas sub-redes hexagonais compactas, tendo camadas ocupadas por átomos de zinco alternados com camadas ocupadas por átomos de oxigênio em torno do eixo c . Cada sub-rede é formada por quatro átomos por célula unitária onde cada átomo de zinco está coordenado por quatro átomos de oxigênio e vice-versa. Logo 50% dos sítios tetraédricos são ocupados por átomos de zinco. Sendo assim, pode-se afirmar que estrutura hexagonal do tipo wurtzita é relativamente aberta sendo, portanto, facilitada a incorporação de dopantes externos na célula do ZnO. Outra característica importante do óxido de zinco, em função da sua estrutura, é a sua superfície polar: as cargas positivas de zinco e as negativas do oxigênio resultam em um momento dipolar normal e uma polarização espontânea ao longo do eixo c . (ÖZGÜR *et al.*, 2005).

Em uma perspectiva econômica, os processos sintéticos, para a produção do óxido de zinco, podem ser divididos em dois grupos: os de baixo custo em escala industrial e os métodos laboratoriais de alto custo. As diferenças tecnológicas entre os métodos de produção de ZnO envolve principalmente os precursores de zinco, as temperaturas de processamento e as operações unitárias utilizadas. Industrialmente, a maioria do ZnO é produzido por métodos pirometalúrgicos, hidrometalúrgicos ou como subproduto de outros processos. Cada processo produz quantidades de ZnO

com relativas diferenças de propriedades e, conseqüentemente, aplicações distintas (MOEZZI, MCDONAGH e CORTIE, 2012).

O óxido de zinco tem sido um importante material industrial durante muito tempo e atualmente vem sendo objeto de interesse considerável, por apresentar uma combinação de propriedades físicas (relativa condutividade elétrica e térmica, absorção óptica no ultravioleta e estabilidade em temperaturas elevadas), químicas (estabilidade em pHs neutros) e biológicas (ação antibacteriana). O tamanho de partícula bem como a morfologia são relatados como um grande desafio na investigação das propriedades do ZnO, tanto em escala micrométrica como também em escala nanométrica. (FELTRIN, 2010).

ZnO tem se destacado por suas propriedades antibacterianas e antifúngicas e pela capacidade de destruição seletiva de células tumorais por nanopartículas de ZnO e seu potencial no desenvolvimento de agentes anticancerígenos (MISHRA *et al.*, 2011). As Propriedades específicas das nanopartículas de ZnO, tais como a sua toxicidade inerente contra células tumorais, pelo menos, para as células de origem linfóide, sua habilidade para induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) do interior da célula levando à morte por meio de um mecanismo de apoptose, e as suas propriedades físico-químicas que conduzem à captação celular e facilidade de funcionalização, têm tornado o ZnO um candidato atraente para aplicações biomédicas (RASMTSEN *et al.*, 2010).

Zhang *et al.* (2011) investigaram a atividade antibacteriana de suspensões contendo ZnO em tamanhos nano e micrométricos, verificando que ambas apresentam a capacidade de inibir o crescimento de bactérias, tendo as suspensões de ZnO em tamanho nano uma eficiência claramente superior em relação às de tamanhos micro. O mecanismo proposto para a atividade antibacteriana do óxido de zinco sugere três possíveis caminhos: 1) interação química entre o ZnO e componentes da membrana celular da bactéria, 2) Interação física entre as nanopartículas de ZnO e a membrana celular da bactéria, 3) Combinação da interação química e física (ZHANG *et al.*, 2010).

O óxido de zinco faz parte do grupo dos agentes inorgânicos antimicrobianos mais seguros e extremamente estáveis em relação aos

agentes antimicrobianos orgânicos. No entanto, o verdadeiro mecanismo para a inibição de micróbios ainda não é claramente compreendida (AMORNPIITOKSUK *et al.*, 2011).

Nas mais diversas especialidades odontológicas, cimentos de óxido de zinco e eugenol têm sido amplamente utilizados, não somente na sua forma original mas também em formulações diversas (LEONARDI *et al.*, 2009). Na dentística são utilizados para restauração e cimentação provisória; na endodontia, na obturação de canais radiculares; na periodontia como curativo periodontal cirúrgico, entre outras aplicações (STANKIEWICZ *et al.*, 2000).

3.4 Tecnologia de micro-ondas

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas compreendidas em uma ampla faixa de frequência que vai de 300 MHz a 30 GHz. Já o intervalo do comprimento de onda varia de 1mm a 1m (SANSEVERINO, 2002), estando, portanto, entre a radiação infravermelho e as ondas de rádio.

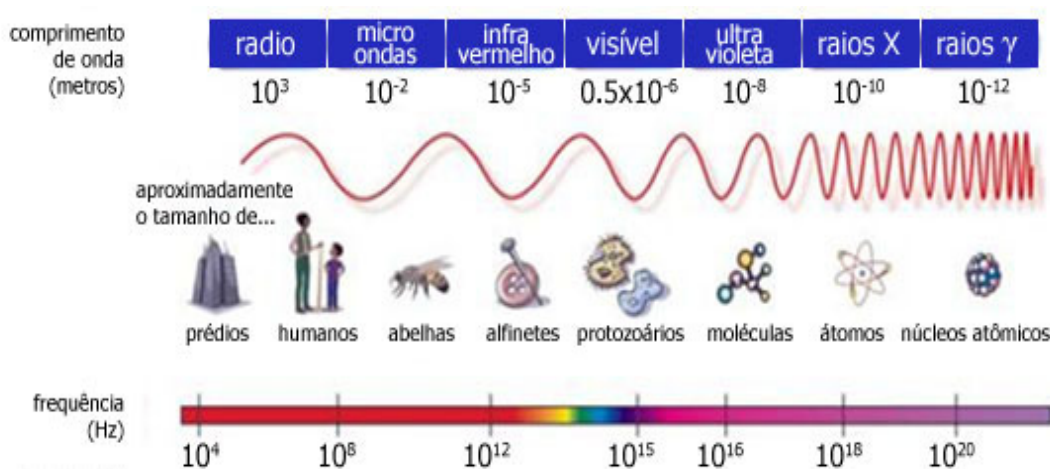


Figura 8 – Faixa de abrangência das ondas eletromagnéticas. Disponível em: http://www.ced.ufsc.br/men5185/trabalhos/63_lampadas/incand/funciona03.htm acesso em 21 de abril de 2012 às 12:00h.

Em virtude da sua extensa faixa espectral, as micro-ondas apresentam grande multiplicidade de aplicações podendo ser refletidas, irradiadas ou utilizadas para aquecimentos; sendo, portando, possível o seu uso em radares, aparelhos celulares e em fornos domésticos (KEYSON, 2006).

Certas substâncias possuem a capacidade de transformar energia eletromagnética em energia térmica através da interação dos átomos e moléculas. Os princípios relacionados ao aquecimento por micro-ondas envolvem os conceitos físico-químicos tais como: temperatura, capacidade calorífica, ligação química, estrutura molecular, momento dipolo, constante dielétrica, etc. A utilização das micro-ondas para o aquecimento de matérias ocorre pela transferência de energia diretamente para dentro do material onde é transformada em calor pela influência dos átomos e moléculas com o campo elétrico, em processos que envolvem condução elétrica, relaxação dipolar e interação fóton – fóton (OLIVEIRA, 2009).

Nas últimas décadas, o uso da tecnologia de micro-ondas em laboratório tem se tornado uma técnica bem estabelecida e vantajosa, surgindo como uma fonte de energia alternativa para a realização de transformações químicas. Uma das principais vantagens é a melhoria cinética das sínteses mediadas por micro-ondas em comparação aos métodos convencionais de aquecimento. Essa melhora se deve ao fato das micro-ondas provocarem um rápido aquecimento interno, trazendo assim benefícios econômicos e tecnológicos. (ASWATHY *et al.*, 2011).

No campo da síntese de nanomateriais, o mais relevante são as propriedades desses materiais influenciados basicamente pela forma e tamanho. O controle da metodologia sintética se torna um grande desafio, visto que o crescimento em nanoescala depende em grande parte da termodinâmica e da cinética do processo. As técnicas convencionais de aquecimento são baseadas em condução de radiação, em que o recipiente onde ocorre a reação atua como um intermediário, para a transferência de energia, entre a fonte de aquecimento e o solvente e, finalmente, as moléculas dos reagentes. Isto pode gerar gradientes térmicos ineficientes e não uniformes em toda a reação. Essa problemática tem se tornado um ponto crítico para a qualidade do material (DARMANIN *et al.*, 2012).

Os métodos de aquecimento por micro-ondas podem resolver esses problemas de elevação da temperatura não uniforme, baseados numa cinética rápida com o consumo rápido dos materiais de partida e rendimentos mais elevados. Com a escolha judiciosa dos solventes, reagentes e estabilizantes e com um aquecimento seletivo, é possível a produção de nanoestruturas específicas, o que torna o método de aquecimento por micro-ondas eficiente e economicamente viável na produção de nanomateriais (KEYSON, 2006; NAGOUDA, SPETH e VARMA, 2010).

Khan *et al.* (2011) sintetizaram nanopartículas de prata, em curto espaço de tempo (15 s), utilizando a técnica de aquecimento por micro-ondas de uma solução de AgNO_3 com glicose como agente redutor suave na presença de microgel. A síntese foi realizada por aquecimento “diluído” em soluções alcalinizadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Na preparação das nanopartículas de prata e na sua impregnação sobre o óxido de zinco pelo método hidrotermal de micro-ondas, foram utilizados os seguintes reagentes:

Tabela 3 - Precursores utilizados nas sínteses nanoestruturadas de prata.

Reagente	Fórmula	Grau de pureza	Fornecedor
Nitrato de Prata	AgNO_3	99,8%	Vetec
Óxido de zinco	ZnO	99,0%	Synth
Hidróxido de amônio	NH_4OH	99,9 %	Sigma
Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	99,5 %	Cargill

Para as sínteses realizadas empregando o método hidrotermal de micro-ondas, foi utilizado um reator de micro-ondas modelo i9TEC RHM do fabricante INOVE PRODUTOS E TECNOLOGIA (i9TEC) ilustrado nas Figuras 9 e 10.



Figura 9 - Reator hidrotermal de micro-ondas.



Figura 10 – Partes que compõe a célula do reator hidrotermal de micro-ondas.

4.2 SÍNTESE

4.2.1 Síntese da prata pelo método hidrotermal de micro-ondas.

As soluções para a síntese das nanopartículas de prata foram preparadas em meio aquoso, onde a concentração da solução de AgNO_3 apresentava concentração igual a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Para a preparação do citrato de amônio, foi preparada uma solução aquosa de ácido cítrico 1 mol.L^{-1} e neutralizado com hidróxido de amônio até a solução atingir um pH aproximadamente igual a 7,0. Após o preparo das soluções, uma alíquota de 50 mL de cada reagente foi transferida para um o copo de teflon que compõe o reator hidrotermal de micro-ondas (RHM), sendo hermeticamente fechado e em seguida levado para o aparelho de micro-ondas. No reator sob o efeito das micro-ondas e do aumento da temperatura e da pressão, ocorreu o fornecimento de energia suficiente para a formação das nanopartículas de prata.

As reações foram realizadas a uma temperatura de $150 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5, 15 e 30 minutos com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{minuto}$ e submetida a uma pressão aproximadamente igual a $5 \text{ Kg}/\text{cm}^2$. Após esse processo, formaram-se uma solução alaranjada com intensidades diferentes para cada temperatura e um precipitado cinza escuro. A solução sobrenadante foi recolhida e o precipitado foi lavado várias vezes com água destilada em temperatura

ambiente. Posteriormente, o precipitado cinza foi seco em uma estufa convencional a 60 °C durante 6 horas, obtendo-se um pó da mesma cor. Após as sínteses, a solução sobrenadante e o pó foram submetidos à caracterização e o sólido obtido teve sua massa medida. O método de obtenção de nanopartículas de prata está representado na forma de fluxograma, na Figura 11.

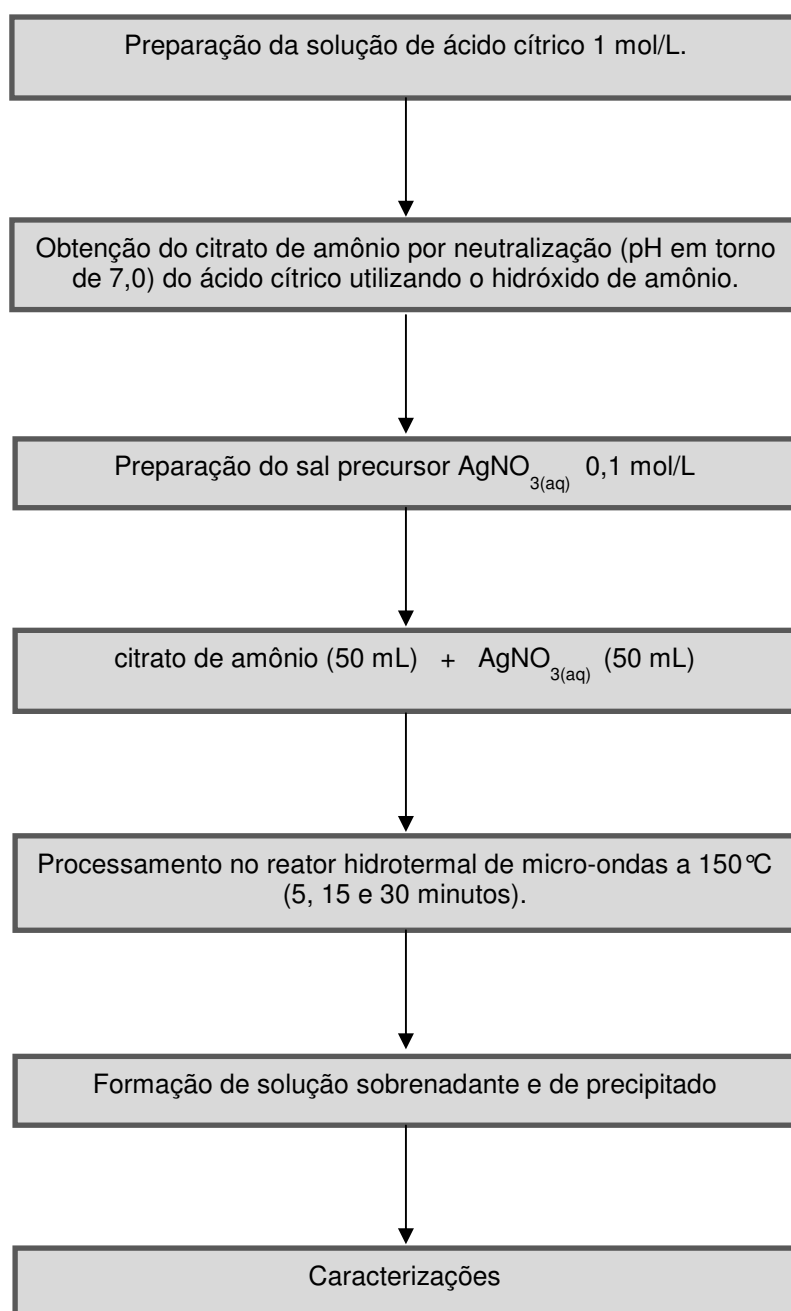


Figura 11 – Fluxograma da síntese de nanopartículas de prata.

4.2.2 Impregnação de nanopartículas de prata sobre óxido de zinco micrométrico pelo método hidrotermal de micro-ondas

No copo de teflon que compõe o reator hidrotermal de micro-ondas foram transferidos 50 mL da solução de AgNO_3 , 50 mL da solução de citrato de amônio com pH aproximadamente igual a 7,0 e 10,7g de óxido de zinco micrométrico. O percentual de prata disponível no sistema reacional correspondia a 5% em massa em relação ao óxido de zinco.

A mistura reacional foi levada ao RHM, sendo hermeticamente fechado e submetido a um aquecimento de 150 °C durante 5, 15 e 30 minutos sob pressão de aproximadamente igual a 5 Kgf/cm^2 . Após esse procedimento, formaram-se uma solução amarela com intensidades diferentes para cada temperatura e um precipitado bege. A solução sobrenadante foi recolhida e o precipitado foi lavado várias vezes com água destilada a temperatura ambiente e centrifugado em uma centrífuga convencional. Em seguida, o precipitado foi seco em uma estufa convencional a 60 °C durante 6 horas obtendo-se um pó com a mesma coloração. Posteriormente as sínteses, o sobrenadante e o pó foram submetidos à caracterização e avaliação antimicrobiana. O método de síntese/impregnação de nanopartículas de prata sobre o óxido de zinco está representado na forma de fluxograma, na Figura 12.

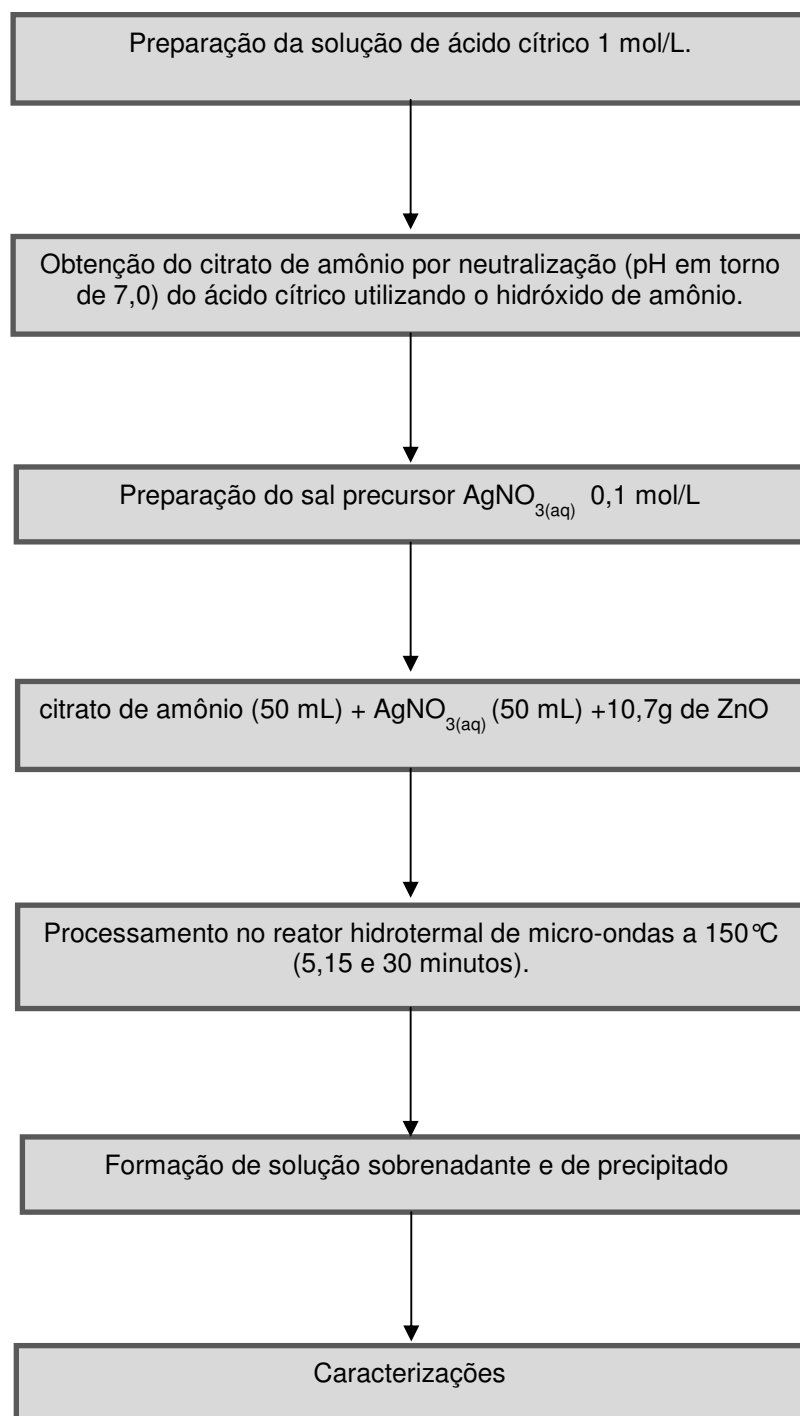


Figura 12 - Fluxograma do processo de síntese/impregnação de nanopartículas de prata sobre o óxido de zinco.

4.3 Técnicas de caracterização

4.3.1 Difração de raios X (DRX)

Essa técnica foi utilizada principalmente para a identificação de fases cristalinas do material. Os difratogramas de raios X foram obtidos utilizando um difratômetro, marca Siemens, modelo D – 5000, na faixa de $2\theta = 20 - 80^\circ$, com um passo de $0,02^\circ$ e tempo de passo de 2 segundos, utilizando como fonte de radiação monocromática a radiação $K\alpha$ de cobre. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os resultados obtidos pelos ensaios de difração de raios X foram comparados com os padrões do arquivo JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) de número 89-1397 para o ZnO e 87-0720 para a Ag.

4.3.1.1 Tamanho de cristalito (TC) e largura a meia altura (FWHM).

Para a prata, os cálculos para a determinação do tamanho de cristalito foram realizados a partir do pico (111), utilizando-se o quartzo como padrão externo e a equação de Scherrer.

$$TC = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

TC: tamanho de cristalino

λ : comprimento de onda da radiação incidente

θ : ângulo de difração

β : largura a meia altura (FWHM) do pico de difração, onde β é expresso por:

$$\beta = \sqrt{(A_{obs}^2 - a^2)} \quad \text{Equação 4}$$

onde:

A é a largura a meia altura (FWHM) relacionada à amostra e a é FWHM do padrão de quartzo.

A equação de Scherrer é deduzida considerando as interferências construtivas e destrutivas quando a diferença entre os ângulos difratados ($\Delta 2\theta$) é muito pequena no cristalito, em relação ao próprio ângulo 2θ . Através da largura dos picos de difração, a equação de Scherrer permite a determinação de características de uma fase cristalina.

4.3.1.2 Parâmetros de rede (PR) e volume da célula unitária (VCU)

Segundo a equação de Braag, para uma dada família de planos (h k l), a reflexão de radiação monocromática ocorre exclusivamente em um plano (θ) e que pode ser encontrado pela distância entre os planos adjacentes (d) e pelo comprimento de onda dos raios X (λ).

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

Equação 5

Onde:

n é a ordem de reflexão (n = 1, 2, 3,...);

λ é o comprimento de onda da radiação eletromagnética;

d é a distância entre os planos (h k l).

O ângulo (θ) formado pela direção do feixe dos raios X com os planos cristalinos é denominado ângulo de Bragg. Com os valores de d das fichas cristalográficas JCPDS 87-0720, para a prata e com os dados experimentais de 2θ e respectivos índices (h k l) dos planos, foi dada entrada para o programa Rede 93, desenvolvido na Unesp - Araraquara, baseado no método dos mínimos quadrados, para se obter os valores experimentais dos parâmetros de rede a e b e do volume da célula unitária segundo a Equação 6

$$V_{cu} = \frac{\sqrt{3} a^2 c}{2} \quad \text{Equação 6}$$

4.3.2 Espectroscopia óptica nas regiões ultravioleta e visível (UV-Vis)

A análise por espectroscopia óptica nas regiões das radiações ultravioleta e visível (UV-Vis) é bastante importante para estudos de bandas eletrônicas, neste trabalho, com objetivo de confirmar o estado reduzido da prata.

O equipamento utilizado foi um espectrômetro UV-vis - NIR (Cary) modelo 5G, que possui 400 W para medidas de reflectância (no intervalo de 190 a 900 nm).

As análises utilizando a espectroscopia UV-Vis foram realizadas para as soluções sobrenadantes obtidas na síntese da prata dos tempos 5, 15 e 30 minutos e nas soluções sobrenadantes obtidas na impregnação da prata sobre óxido de zinco também nos tempos de 5, 15 e 30 minutos.

4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para análise da morfologia das partículas e das características microestruturais dos pós, após a síntese e impregnação de prata sobre o óxido de zinco comercial, fez-se uso de um microscópio eletrônico de varredura, marca ZEISS DSM, modelo – 940 A. As amostras foram prensadas em vácuo para obtenção de pastilhas e recobertas com uma fina camada de ouro, com o objetivo de garantir uma melhor condutividade dos elétrons. As análises foram realizadas no Laboratório de Solidificação Rápida (LSR) no Departamento de Engenharia Mecânica/CT da UFPB.

4.3.4 Gravimetria

Os rendimentos das sínteses foram determinados por meio de gravimetria clássica. Para a síntese da prata metálica, mediu-se a massa do precipitado formado. Sobre a solução sobrenadante, foi adicionado KCl suficiente para precipitar todo Ag^+ residual na forma de AgCl que foi lavado com água destilada e seco em estufa durante 6 horas sob temperatura de 60 °C sendo, em seguida, efetuada a pesagem do precipitado.

4.3.5 Avaliação da atividade Antimicrobiana

Os testes referentes à atividade antimicrobiana foram realizados no laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (Centro de Ciências da Saúde) da Universidade Federal da Paraíba.

4.3.5.1 Produtos testados

Os produtos testados foram: Prata metálica obtida nos três tempos de síntese 5, 15 e 30 minutos, o óxido de zinco, os sólidos obtidos na síntese de impregnação da prata sobre óxido de zinco em três tempos diferentes de síntese, 5, 15 e 30 minutos e suas respectivas soluções sobrenadantes. Os mesmos produtos foram dispersos em TWEEN 80 (MERCK/Germany) e dimetilsufóxido, numa proporção, respectivamente, de até 10 % e 1%, para não interferir sobre os microrganismos (ALLEGRIINI *et al.*, 1976).

As amostras da solução sobrenadante obtidas no processo de impregnação nos tempos de 5, 15 e 30 minutos foram testadas na sua forma “in natura” em diluições seriadas na razão de 1:2, partindo de 100µL até 1,6µL.

Para a solução sobrenadante obtida na síntese de 30 minutos, foi também realizada a avaliação antimicrobiana, sem a presença de íons Ag^+ residuais, que foram retirados da solução na forma de AgCl precipitado após a adição de KCl.

4.3.5.2 Antimicrobianos sintéticos

Para o controle de atividade antimicrobiana, foram usados cloranfenicol (50 µg/mL) para bactérias e nistatina (100 µl/mL) para as leveduras.

4.3.5.3 Micro-organismos

Nos ensaios microbiológicos foram incluídas as espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Escherichia coli* (ATCC 8733). E as espécies fúngicas: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida albicans* (LM-105), *Candida krusei* (ATCC 6538), *Candida krusei* (LM-12C), *Candida tropicalis* (LM 14), *Candida tropicalis* (ATCC 13803).

As cepas foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal da Paraíba. As mesmas bactérias foram mantidas em meios de cultura apropriados, conservadas a 4 °C e a 30 °C.

A suspensão dos micro-organismos foi preparada conforme a escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), correspondendo, aproximadamente, a 10⁶ UFC/mL (NCCLS 2000; HADACECK e GREEGER, 2000; CLEELAND e SQUIRES, 1991).

4.3.5.4 Meios de cultura

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados, respectivamente, em caldo Mueller-Hinton (Merck/USA) e caldo Sabouraud dextrose – ASD (Difco Lab./USA/France) para bactérias e fungos. Os mesmos foram preparados e usados conforme as instruções do fabricante.

4.3.5.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados pelo método de diluição seriada em meio líquido, técnica de microdiluição (ELOFF, 1987; CLEELAND; SQUIRES, 1991; BAWER et al., 1996; HADACECK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2000).

A determinação da CIM dos compostos em estudo foi realizada através da técnica de microdiluição, utilizando-se microplacas contendo 96 poços com fundo chato e tampa (DISPOPETRI/INTERLAB). Inicialmente, adicionou-se, aos poços, 100 µL de caldo nutriente (para bactérias) e caldo Sabouraud (para leveduras) duplamente concentrados. Em seguida, foram inoculados 100µL da dispersão dos sólidos obtidos no processo de impregnação e foram feitas as diluições seriadas à razão de um para dois, nas concentrações de 1024 a 16 µg/mL. Em se tratando da solução sobrenadante obtida também no processo de impregnação, foram inoculados 100 µL, “in natura”, e realizadas diluições seriadas de 1:2, partindo de 100 µL até 1,6 µL. Então, nas primeiras e sétimas filas de cavidades, os compostos se encontravam nas maiores concentrações e nas menores concentrações. Posteriormente, 10 µL da suspensão dos microrganismos foram inoculados em todas as cavidades da placa. Em paralelo, foi feito controle do crescimento das espécies bacterianas e de leveduras, como também com os antimicrobianos padrão: cloranfenicol (50 µg/mL) para bactérias e nistatina (100 µL/mL) para leveduras. O sistema foi incubado a 35 °C/24-48 horas (VILJOEN *et al.*, 2003; SAHIN *et al.*, 2004).

Após o tempo de incubação adequado, foi feita a primeira leitura dos resultados para determinação da CIM dos compostos frente aos dois grupos de microrganismos ensaiados: a determinação da CIM dos compostos sobre os microrganismos foi determinada através de observação visual, tomando como base o fato de que o crescimento nos poços da placa de microdiluição ocorreu através da formação dos chamados botões de crescimento - aglomerado de células (ESPINEL INGROFF *et al.*, 1991; ESPINEL INGROF *et al.*, 1992).

Em seguida, foi utilizado o seguinte procedimento: adicionou-se 20µL de solução do corante resazurina a 0,01 % (INLAB), o qual é reconhecido como um indicador colorimétrico de oxirredução (MANN e MARKAN, 1998;

BURT e REINDERS, 2003). Assim, quando ocorreu mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanecesse azul, significaria a ausência de crescimento microbiano. E foi considerada como CIM a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento da cepa ensaiada, verificado pela não mudança da coloração do corante indicador.

4.3.6 Análise da atividade tóxica e citotóxica de nanopartículas de prata coloidal.

Utilizaram-se alevinos de *Poecilia reticulata* para o teste toxicológico, sendo estes aclimatados em laboratório por um período de 48 horas e, em seguida, usados nos testes. As concentrações usadas foram as seguintes: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 ppm. O preparo das soluções para os testes foi feito a partir de uma solução de nanopartículas de prata coloidal, sintetizadas em 30 minutos. Por meio de uma diluição em água destilada obteve-se, então, a concentração de 200 ppm. Para analisar a toxicidade dos íons Ag^+ foi preparada uma solução de 200 ppm de AgNO_3 .

O ensaio de citotoxicidade com *Artemia salina* foi baseado na metodologia de FONTENELE com algumas adaptações (FONTENELE *et al.*, 1988). Numa cuba de vidro com capacidade para 1.000mL, foi adicionada água salina devidamente tratada e 50g de ovos de *A. salina*. O sistema foi submetido à luz artificial e temperatura ambiente ($29^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) até o período de eclosão das microlarvas, que se completou após 48 horas do início do experimento. As concentrações utilizadas para o ensaio foram: 200, 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 ppm. Ambos os testes foram realizados em duplicata, contendo dez animais em cada solução, com tempo de exposição de 24 horas, usando também um grupo controle preparado nas mesmas condições, sem a presença das nanopartículas de prata (teste em branco). Após 24h de exposição, foi realizada a verificação da mortalidade dos animais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Difração de raios-X

As amostras de prata sintetizadas a 150 °C em diferentes intervalos de tempo, 5, 15 e 30 minutos foram analisadas por difração de raios-X, sendo os difratogramas apresentados na Figura 13.

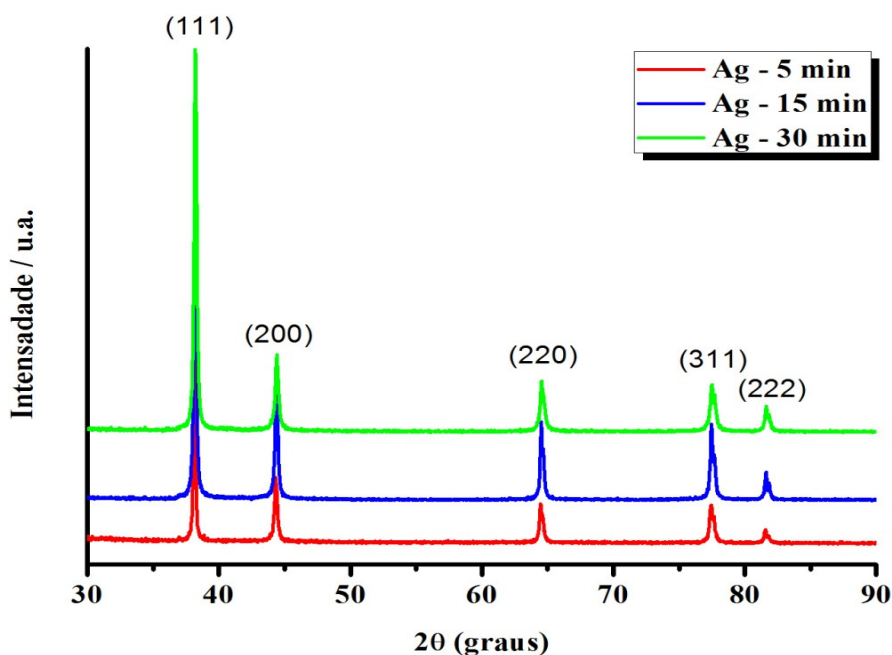


Figura 13 – Difratogramas da prata em diferentes tempos de síntese.

Todos os difratogramas indicam a formação de fase cristalina de prata metálica para todos os tempos indicados com características de estrutura cúbica de face centrada de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS 87-0720 para a prata. Todos os picos de difração são bem definidos indicando a formação da fase cristalina com elevada organização a longo alcance. Esse resultado indica que a prata pode ser obtida facilmente em uma única etapa num baixo intervalo de tempo pelo método hidrotermal de micro-ondas.

5.1.1 Largura a meia altura (FWHM), tamanho de cristalito e parâmetros de rede.

Para se ter uma melhor discussão dos resultados de DRX e observar e avaliar os efeitos de organização do material a longo alcance, foi calculado o tamanho de cristalito, o parâmetro de rede e a largura a meia altura (FWHM) dos picos de maior intensidade (plano (111)) dos difratogramas de raios-X, mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – FWHM, tamanho de cristalito, parâmetros de rede e volume da célula unitária das amostras de prata sintetizadas pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas.

Amostras	FWHM DRX ₍₁₁₁₎	Tamanho de cristalito (nm)	Parâmetro de rede (Å)	Volume da célula unitária (Å ³)
Ag 5 min.	16,60	5,06	4.08	67,91
Ag 15 min.	17,67	4,75	4.08	67,91
Ag 30 min.	20,01	4,20	4.08	67,91
Padrão	-----	-----	4,07	67,78

Observa-se nos resultados obtidos que o tempo de síntese exerce uma influência na organização dos cristais a longo alcance. O alargamento do pico de difração no plano (111) em função do aumento do tempo de exposição à hidrotermização em micro-ondas pode ser relacionado à desorganização do material a longo alcance influenciado pelo decréscimo do tamanho de cristalito demonstrado nos valores obtidos.

A diminuição do tamanho do cristalito pode ter sido provocada pelo processo de cristalização e recristalização das nanopartículas de prata formadas, influenciada pelas micro-ondas.

Em relação aos parâmetros de rede e ao volume da célula unitária, não ocorreu mudanças significativas quando comparadas aos valores teóricos demonstrando que o material apresenta-se altamente cristalino.

Os difratogramas da prata impregnada sobre o óxido de zinco Ag/ZnO sintetizado em diferentes intervalos de tempo e do ZnO são mostrados na Figura 14.

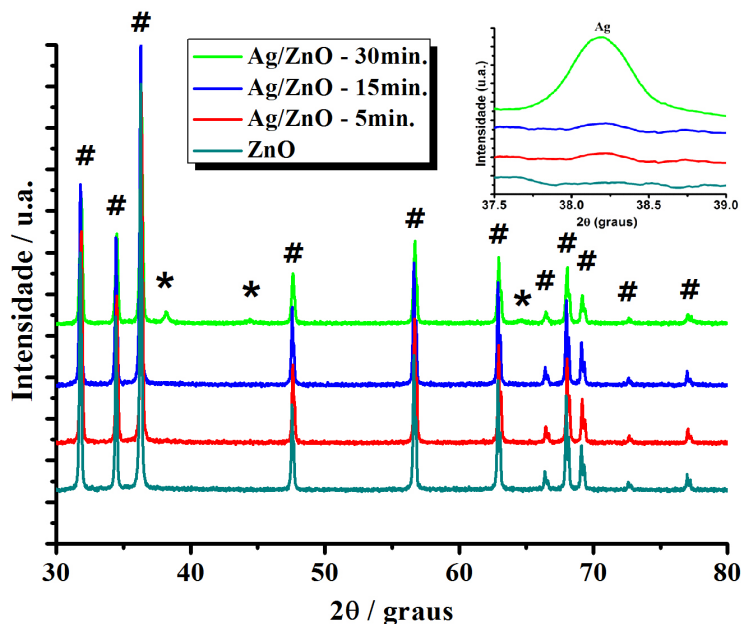


Figura 14 – Difratogramas do Ag/ZnO e do ZnO (# ZnO; * Ag)

Comparando com os dados das fichas cristalográficas para o Ag (87-0720) e ZnO (89-1397), com o DRX da prata suportada sobre ZnO comercial (Ag/ZnO), observou-se a presença dos picos mais proeminentes característicos de prata metálica (Ag^0) em torno de $2\theta = 38,01$ e $64,12$ graus. Para o tempo de processamento de 30 minutos, esses picos são mais intensos, devido à presença de uma maior quantidade de prata metálica provocada pela maior exposição à hidrotermização em micro-ondas. Para as demais sínteses, o menor tempo de processamento provocou, provavelmente, uma diminuição na quantidade de prata formada acarretando uma diminuição na intensidade dos seus picos característicos. Todos os outros picos são característicos da estrutura hexagonal de ZnO.

Todavia, a efetiva impregnação da prata metálica pode ser observada também para o material obtido após processamento de 5, 15 e 30 minutos conforme micrografias de MEV com EDS conforme mostra as Figuras 15 a 17.

5. 2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A micrografia da prata impregnada sobre o óxido de zinco obtido em diferentes tempos e o mapeamento e o espectro obtido por EDS estão representados nas Figuras 15, 16 e 17.

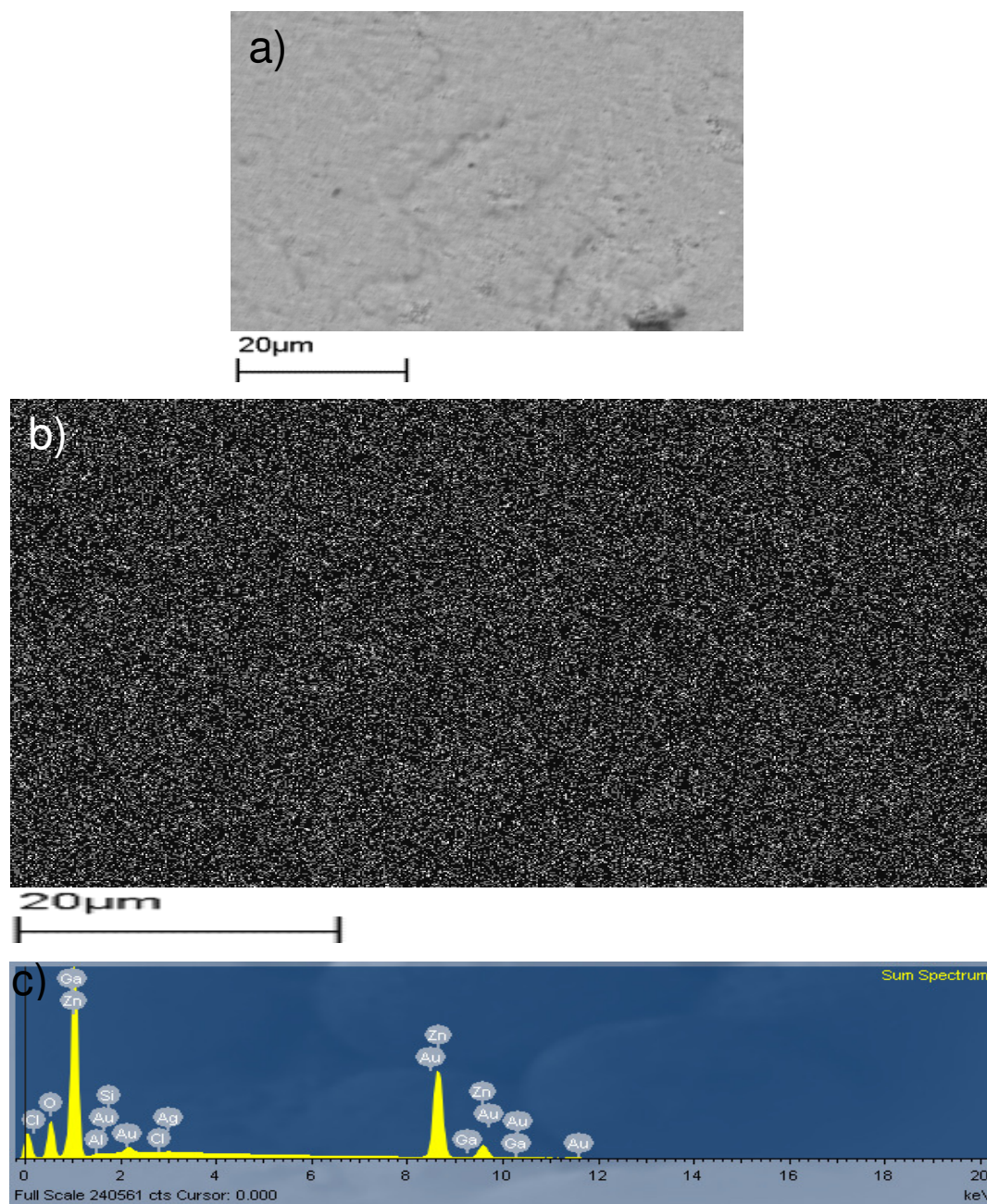


Figura 15 – Dados da prata suportada sobre ZnO em 5 min de síntese: a) imagem de MEV; b) Mapeamento da Ag; c) Espectro de EDS.

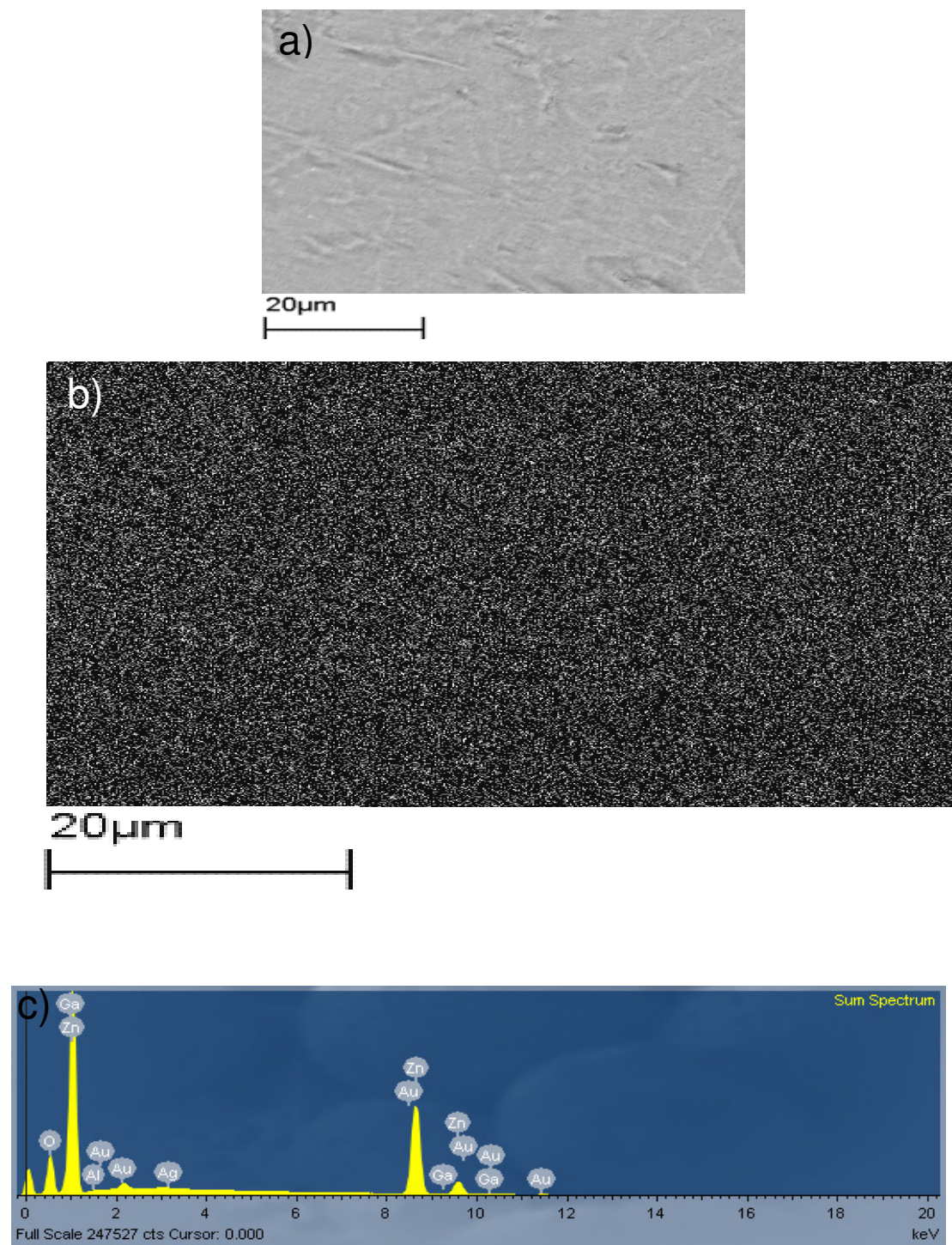


Figura 16 – Dados da prata suportada sobre ZnO em 15 min de síntese: a) imagem de MEV; b) Mapeamento da Ag; c) Espectro de EDS.

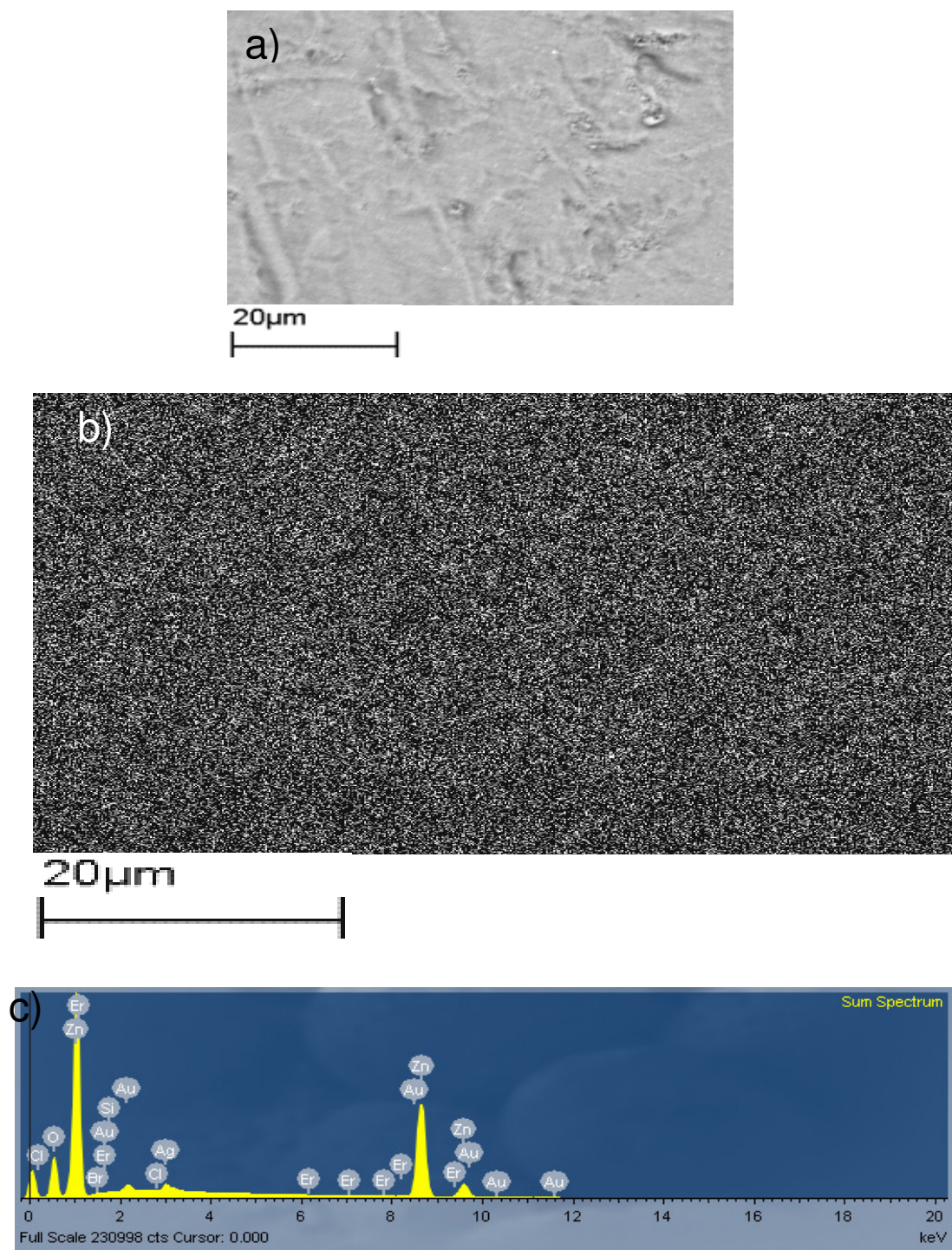


Figura 17 – Dados da prata suportada sobre ZnO em 30 min de síntese: a) imagem de MEV; b) Mapeamento da Ag; c) Espectro de EDS.

As micrografias *15.a*, *16.a* e *16.a* demonstram que o material obtido possui expressiva homogeneidade em sua superfície, ainda que não tenha sido possível identificar nestas micrografias, as nanopartículas de prata metálica presentes sobre a superfície majoritária do ZnO. Isto se dá pelo fato das partículas de prata apresentarem-se sob dimensões estimadas de não mais do que poucas dezenas de nanômetros, invisíveis para esta magnitude de ampliação.

Uma análise de mapeamento da prata por técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) realizada, conforme observado nas Figuras *15.b*, *16.b* e *17.b* respectivamente em relação aos MEVs das figuras *15.a*, *16.a* e *17.a* indicaram a presença, em todas elas, de nanopartículas de prata metálica impregnadas e uniformemente distribuídas sobre toda superfície do ZnO. Além disto, por aumento de densidade dos “pontos brancos”, que caracterizam a prata metálica, observou-se que o aumento do tempo de processamento promove o aumento da quantidade de prata metálica depositada/impregnada sobre o ZnO comercial.

Os espectros de EDS das Figuras *15.c*, *16.c* e *17.c* confirmam a presença da prata em torno de 2,6 keV. Todas as impregnações foram realizadas pelo método hidrotermal de micro-ondas indicando que a referida técnica de síntese/processamento é eficiente, mesmo a curtos períodos de processamento em uma única etapa, para a impregnação de prata metálica sobre óxido de zinco comercial. Estes resultados sinalizam que este método pode prestar-se igualmente para a impregnação sobre outros óxidos gerando uma gama de possibilidades para estudo e aplicação industrial.

5. 3 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

As curvas de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis) possibilitaram a caracterização de nanopartículas de prata coloidal (NPC). A Figura 18 mostra as curvas de absorbância do UV-vis para a solução sobrenadante da síntese da prata em diferentes tempos de processamento.

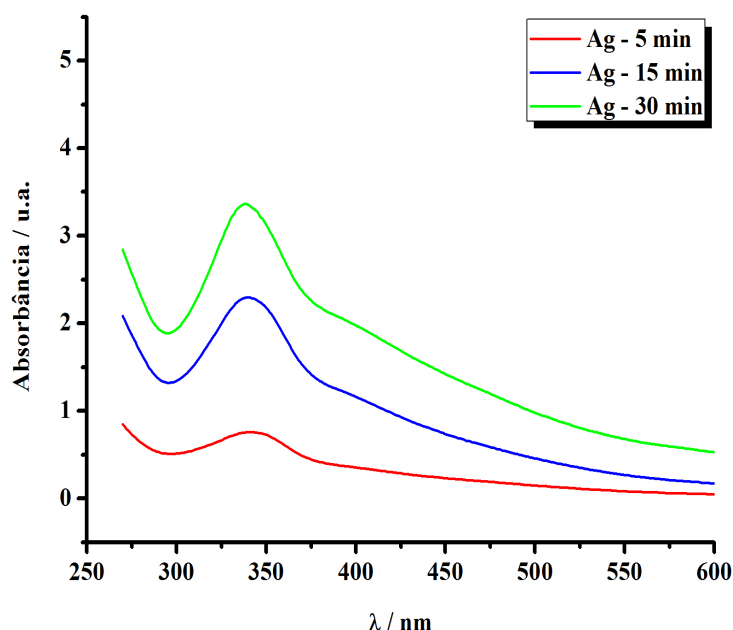


Figura 18 – Espectros de absorção do UV-VIS das amostras das soluções sobrenadantes diluídas na proporção 1:2.

A partir do espectro de absorção do UV-vis de uma solução, é possível retirar informações importantes como por exemplo a própria banda de absorção óptica que é característica dos plasmons superficiais das nanopartículas de prata. Coloides de nanopartículas de prata podem apresentar coloração amarelada, que corresponde ao espectro de absorção de fótons com comprimento de onda em torno de 400 nm, podendo variar dependendo da rota de síntese usada e do tamanho das nanopartículas existentes no meio (ANDRADE, 2008).

A análise dos espectros de absorção do UV-vis (Figura 18) mostrou curvas com perfis semelhantes com picos de comprimento de onda em torno

de 340 nm caracterizando nanopartículas de prata em um sistema coloidal com tamanho de partícula, possivelmente, menor do que 5 nm (SOLOMON, 2007).

O valor máximo de absorbância é um indicativo do número de nanopartículas presentes na solução coloidal. O aumento na absorbância no UV- vis em função do tempo de síntese demonstra um acréscimo gradativo da concentração de nanopartículas de prata na solução coloidal. Observa-se que o maior pico de absorção ocorre quando o tempo de síntese é de 30 minutos, ou seja, um maior tempo de síntese possibilitou um maior número de nanopartículas de prata formadas. É importante ressaltar que essas soluções coloidais foram diluídas na proporção de duas partes de água destilada para uma parte da solução coloidal, portanto os picos de absorbância das soluções originais são cerca de duas vezes maiores do que observado na Figura 16. A diferença de tonalidade, das soluções, de amarelo dourado para um alaranjado intenso, observada na Figura 19 é um indicativo que ocorreu uma pequena mudança na agregação das partículas visto que não ocorreram mudanças significativas nos valores dos comprimentos de onda.

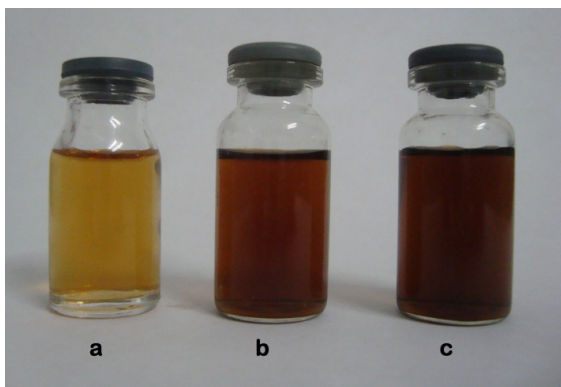


Figura 19 – Fotografia das soluções sobrenadantes sintetizadas no RHM em diferentes tempos de síntese (min): a = 5; b = 15; c = 30.

No processo de síntese/impregnação de nanopartículas de prata sobre o óxido de zinco foram obtidas, também, soluções sobrenadantes com as quais realizaram-se caracterizações utilizando a espectroscopia UV- vis. As curvas de absorbância (Figura 20) das soluções também seguem praticamente o mesmo padrão de comportamento observado na síntese da prata, ou seja, picos de comprimento de onda em torno de 340 nm e acréscimo do valor da absorbância em função do tempo, onde o maior valor da banda de absorção ocorre quando o tempo de processamento é de 30 minutos.

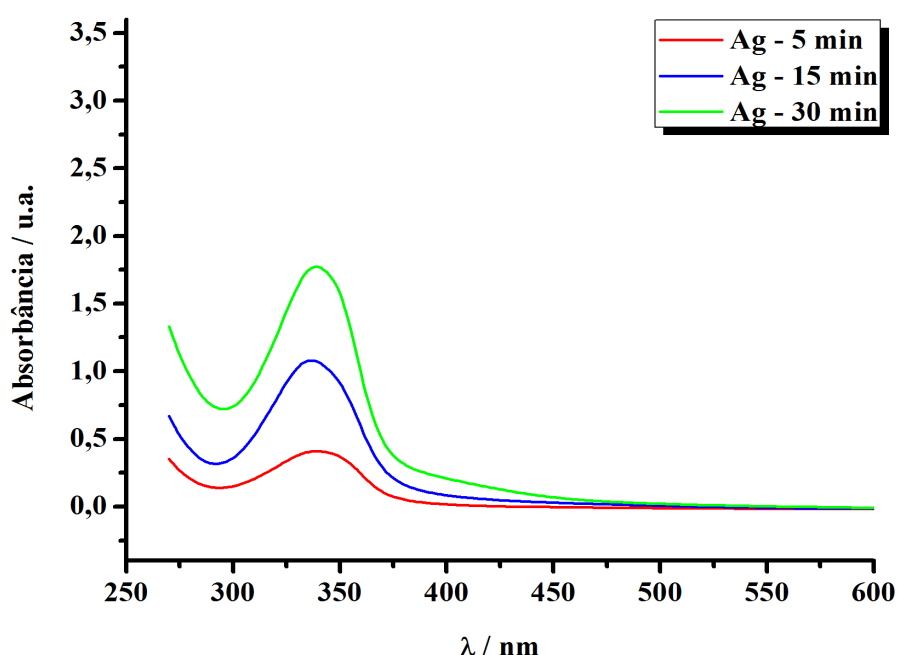


Figura 20 - Espectros de absorção do UV-VIS das amostras das soluções sobrenadantes obtidas durante a síntese/impregnação de nanopartículas de prata sobre o óxido de zinco em diferentes tempos de processamento.

Já os valores de absorbância obtidos nesse caso foram menores do que os observados no processo de síntese de nanopartículas de prata. Esse comportamento pode ser justificado pela diminuição na concentração de partículas de prata em escala nanométrica na solução coloidal. Possivelmente, a presença de partículas de ZnO no meio favorece a ancoragem das partículas de Ag^0 recém nucleadas, que, por descompensações de carga superficial, preferem impregnar-se sobre o ZnO do meio para diminuição da sua energia

superficial. Assim, as partículas de ZnO funcionam como retiradores de Ag^0 da solução coloidal.

Na Figura 21 observa-se também uma mudança na tonalidade das soluções provocada possivelmente por uma leve mudança na agregação das partículas, mas sem mudanças significativas no tamanho médio das partículas, pois os valores do comprimento de onda não sofreram grandes variações em função do tempo de processamento.

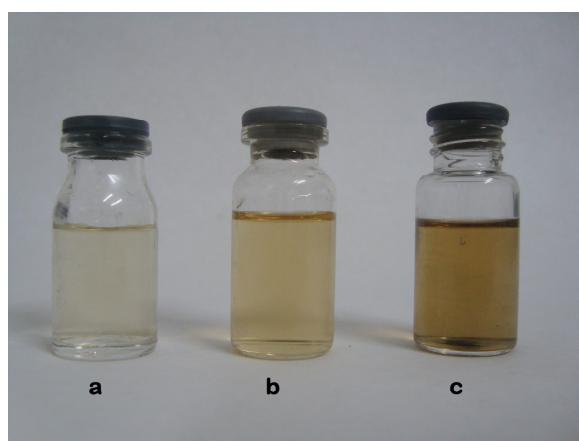


Figura 21 – Fotografia das soluções sobrenadantes obtidas durante a síntese/impregnação de nanopartículas de prata no RHM em diferentes tempos de processamento (min): a = 5; b = 15; c = 30.

5.4 Gravimetria

No processo de síntese de nanopartículas de prata obteve-se prata em solução coloidal (pseudo solução de cor amarela) e prata metálica precipitada na forma de pó cinza escuro ao término da síntese. O pó de prata metálica precipitada foi seco, cujas quantidades obtidas estão na Tabela 5.

Tabela 5. Massas de prata metálica obtidas nos diferentes tempos de síntese.

Tempo de síntese (min)	Massa de prata metálica obtida (g)
5	0,1263
15	0,3064
30	0,3431

Para os resultados obtidos na Tabela 5, observa-se que a quantidade de produto obtido ou rendimento da síntese depende do tempo de processamento. Para tempos maiores de síntese e consequentemente maiores exposições à pressão, temperatura e micro-ondas, implicaram em maiores quantidades de prata precipitada.

O rendimento de nanopartículas de prata coloidal foi obtido considerando a Equação 7 por meio de gravimetria indireta. Conhecendo-se a quantidade de íons de prata de partida (AgNO_3), determinou-se a quantidade de prata coloidal em solução e da prata metálica precipitada. A prata metálica precipitada foi recolhida, seca e pesada. Enquanto que a determinação da prata coloidal se deu por meio de gravimetria indireta. Para tal, adicionou-se KCl em excesso que precipitou a totalidade de íons Ag^+ na forma de AgCl insolúvel. O AgCl foi então seco e pesado para que se conhecesse a quantidade de Ag^+ que restava em solução. O total de prata presente na solução de partida menos a prata metálica Ag^0 precipitada e menos a prata na forma de Ag^+ confere a quantidade de nanopartículas de prata na forma coloidal.

Equação 7: Equação Geral da obtenção de prata coloidal e precipitada

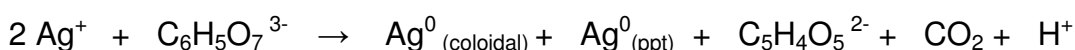


Tabela 6: Massa das nanopartículas de prata coloidal nos diferentes tempos de síntese.

Tempo de síntese (min)	Massa das NPC (g)
5	0,1240
15	0,1576
30	0,1725

Para os resultados obtidos na Tabela 6, observa-se que a quantidade de prata coloidal obtida depende do tempo de processamento. Para tempos maiores de síntese e consequentemente maiores exposições ao processo

hidrotermal de micro-ondas, ocorreu maior formação gradativa de nanopartículas de prata na forma de solução coloidal.

A partir dos dados obtidos, verifica-se que os resultados gravimétricos corroboraram com os valores de absorbância encontrados na Figura 16, ou seja, ocorre o aumento gradativo da concentração das NPC em função do tempo de síntese quando expostas a pressão, temperatura e emissão de micro-ondas. De posse dos valores encontrados, calculou-se o rendimento (em massa) da síntese para as duas fases formadas, bem como o rendimento total.

Tabela 7 Rendimento percentual (em massa) das fases obtidas na síntese em diferentes tempos de processamento.

Tempo de síntese (min)	Rendimento percentual para a prata metálica precipitada (%).	Rendimento percentual para as NPC (%).	Rendimento total (%).
5	22,41	22,99	46,40
15	56,81	29,22	86,03
30	63,61	31,98	95,59

5.5 Testes biológicos

5.5.1 Ensaios de atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana das amostras contendo nanopartículas de prata coloidal obtidas em diferentes tempos de síntese (NPC-5, NPC-15 e NPC-30) mostraram uma considerável ação antimicrobiana, Tabelas 7, 8 e 9. Verifica-se que as soluções contendo NPC-5, NPC-15 e NPC-30 provocaram inibição do crescimento das espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus Epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Escherichia coli* (ATCC 8733) até a quarta diluição.

Para as espécies fúngicas, as NPC-5 e NPC-15 provocaram inibição de crescimento para as espécies *Candida krusei* (LM- 12C) e *Candida krusei* (ATCC 6538) até a terceira diluição enquanto que nas demais NPC-5 provocaram inibição de crescimento até a primeira diluição e as NPC-15 impediram o crescimento até a quarta diluição (Tabelas 8 e 9).

A solução coloidal NPC-30 provocou a inibição de crescimento de todos os organismos testados (Tabela 10) até a quarta diluição.

Considerando que a ação antimicrobiana é produzida pelas nanopartículas de prata, estes resultados estão em concordância com o que foi obtido na gravimetria. Ou seja, as soluções que foram processadas por mais tempo tiveram maior quantidade de NPC formada e por isso apresentaram mais significativa atividade em relação às NPC obtidas em tempos inferiores.

Tabela 8 - Resultados dos ensaios de atividade biológica das soluções contendo NPC-5 sobre bactérias e leveduras do gênero *candida*.

Microrganismos	Volumes (μL)							Controle do microrganismo	Controle: Clorafenicol/ Nistatina
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,6		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Staphylococcus. epidermidis</i> (ATCC 12228)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i> (ATCC 25853)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i> (ATCC 9027)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli.</i> (ATCC 10536)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli.</i> (ATCC 8733)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Cândida krusei</i> (LM- 12C)	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6538)	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> (LM-14)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 13803)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (LM-105)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	-	-	+	+	+	+	+	+	+

(+): Crescimento do microrganismo

(-): Inibição do crescimento do microrganismo

Tabela 9 - Resultados dos ensaios de atividade biológica das soluções contendo NPC-15 sobre bactérias e leveduras do gênero *candida*.

Microrganismos	Volumes (μL)							Controle do microrganismo	Controle: Clorafenicol / Nistatina
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,6		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Staphylococcus. epidermidis</i> (ATCC 12228)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i> (ATCC 25853)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i> (ATCC 9027)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli.</i> (ATCC 10536)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli.</i> (ATCC 8733)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i> (LM- 12C)	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6538)	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> (LM-14)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 13803)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (LM-105)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	-	-	-	+	+	+	+	+	+

(+): Crescimento do microrganismo

(-): Inibição do crescimento do microrganismo

Tabela 10 - Resultados dos ensaios de atividade biológica das soluções contendo NPC-30 sobre bactérias e leveduras do gênero *Candida*.

Microrganismos	Volumes (μL)							Controle do microrganismo	Controle: Clorafenicol/ Nistatina
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,6		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> . (ATCC 12228)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (ATCC 25853)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (ATCC 9027)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> . (ATCC 10536)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> . (ATCC 8733)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i> (LM- 12C)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6538)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> (LM-14)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 13803)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (LM-105)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	-	-	-	-	-	+	+	+	+

(+): Crescimento do microrganismo

(-): Inibição do crescimento do microrganismo

Os resultados obtidos demonstram que a concentração das nanopartículas de prata na solução coloidal exerceu uma fundamental influência sob os micro-organismos, visto que as NPC-30 são as que apresentam uma maior concentração de nanopartículas de prata como observado na análise gravimétrica.

É amplamente conhecida a ação antimicrobiana da prata iônica, possuindo esta alguns inconvenientes. Dentre eles o fato de ser muito instável dada sua alta reatividade (forte agente oxidante). Sendo comum o escurecimento da pele e de superfícies que entram em contato com este agente químico.

Como parte dos íons de prata oriundos do AgNO_3 permaneceram em solução após a síntese, logo ação antimicrobiana pode ser influenciada pela presença dos íons Ag^+ residuais. Nas Tabelas 11 e 12 são apresentados os testes para uma solução original de AgNO_3 diluída na proporção de 1:1 com água destilada e a solução de NPC-30 sem a presença de íons Ag^+ .

Os resultados encontrados na Tabela 11 demonstram a notável atividade antimicrobiana dos íons Ag^+ , entretanto os resultados da Tabela 12, onde está explicitada a atividade de nanopartículas de prata coloidal livres de Ag^+ residual demonstram que NPC-30 possui relevante atividade antimicrobiana com o conveniente de ser mais estável (mais durável) e menos reativa do que os íons de Ag^+ .

Tabela 11 Resultado dos ensaios de atividade biológica da solução original de AgNO_3 diluída inicialmente na proporção 1:1 sobre bactérias e leveduras do gênero *Candida*.

Microrganismos	Volumes (μL)							Controle do microrganismo	Controle: Clorafenicol/ Nistatina
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,6		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> . (ATCC 12228)	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (ATCC 25853)	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (ATCC 9027)	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> . (ATCC 10536)	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> . (ATCC 8733)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i> (LM- 12C)	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6538)	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> (LM-14)	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 13803)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (LM-105)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	-	-	-	-	+	+	+	+	+

(+): Crescimento do microrganismo

(-): Inibição do crescimento do microrganismo

Tabela 12 Resultados dos ensaios de atividade biológica das soluções NPC-30 sem a presença de íons Ag^+ residuais sobre bactérias e leveduras do gênero *candida*.

Microrganismos	Volumes (μL)							Controle do microrganismo	Controle: Clorafenicol/ Nistatina
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,6		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> . (ATCC 12228)	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (ATCC 25853)	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (ATCC 9027)	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> . (ATCC 10536)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> . (ATCC 8733)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i> (LM- 12C)	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6538)	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> (LM-14)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 13803)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (LM-105)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	-	-	-	-	+	+	+	+	+

(+): Crescimento do microrganismo

(-): Inibição do crescimento do microrganismo

Os resultados da atividade antimicrobiana da prata impregnada sobre o óxido de zinco Ag/ZnO (Tabelas 13, 14 e 15) obtido em diferentes tempos de síntese, sobre bactérias e leveduras do gênero *Cândida* mostraram pouco ou nenhum efeito, com exceção da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) que foi sensível aos materiais obtidos em 5 minutos e 15 minutos, com CIM igual a 256 µg/mL. Para o Ag/ZnO obtido em 30 minutos de síntese, verificou-se nenhum efeito antimicrobiano.

Os resultados das Tabelas 13 a 15 foram explicitadas a rigor, entretanto pode ser concluído que a mesma metodologia de teste de atividade antimicrobiana aplicada para as NPCs não se mostrou eficaz para avaliar a atividade de sólidos insolúveis, como é o caso do Ag/ZnO.

Entretanto, apesar do Ag/ZnO ser insolúvel e não promover sua difusão sobre o meio de cultura, pode-se observar inibição de crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) utilizando o Ag/ZnO sintetizado em 5 e 15 minutos.

Tabela 13 Resultados dos ensaios de atividade biológica do Ag/ZnO sintetizado em 5 minutos.

Microrganismos	Concentrações (µg/mL)							Controle do microrganismo	Controle: Clorafenicol / Nistatina
	1024	512	256	128	64	32	16		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25853)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8733)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i> (LM- 12C)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6538)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> (LM-14)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 13803)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (LM-105)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): Crescimento do microrganismo

(-): Inibição do crescimento do microrganismo

Tabela 14 Resultados dos ensaios de atividade biológica Ag/ZnO sintetizado em 15 minutos.

Microrganismos	Concentrações (µg/mL)							Controle do microrganismo	Controle: Clorafenicol / Nistatina
	1024	512	256	128	64	32	16		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25853)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8733)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i> (LM-12C)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6538)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> (LM-14)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 13803)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (LM-105)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): Crescimento do microrganismo

(-): Inibição do crescimento do microrganismo

Tabela 15 Resultados dos ensaios de atividade biológica do Ag/ZnO sintetizado em 30 minutos.

Microrganismos	Concentrações (µg/mL)							Controle do microrganismo	Controle: Clorafenicol/ Nistatina
	1024	512	256	128	64	32	16		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Staphylococcus. epidermidis</i> (ATCC 12228)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i> (ATCC 25853)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i> (ATCC 9027)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli.</i> (ATCC 10536)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli.</i> (ATCC 8733)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i> (LM- 12C)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6538)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> (LM-14)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 13803)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (LM-105)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): Crescimento do microrganismo

(-): Inibição do crescimento do microrganismo

Para uma melhor compreensão do comportamento dos sólidos frente aos micro-organismos, também foram realizados testes antimicrobianos para a prata metálica obtida em diferentes tempos de síntese, o óxido de zinco (como branco) e os sólidos obtidos no processo de impregnação nos diferentes tempos de síntese, encontrados na Tabela 16.

Os resultados encontrados demonstram que as partículas de prata metálica sintetizada em 30 minutos apresentaram uma notável capacidade antimicrobiana, para todos os micro-organismos testados. O seu relevante desempenho, quando comparado às partículas de prata metálica sintetizada em 5 e 15 minutos, pode ter sido influenciado pela diminuição do cristalito, no processo de cristalização e recristalização. A partícula formada em um tempo maior de síntese pode apresentar um número expressivo de defeitos que possivelmente pode gerar a atividade antimicrobiana.

Para o sólido obtido no processo de impregnação da prata sobre o óxido de zinco (Ag/ZnO), sintetizado em 5 minutos, a atividade antimicrobiana é praticamente a mesma do ZnO puro. Como para esse tempo de síntese há uma menor quantidade de prata disponível em relação aos demais tempos, a ação antimicrobiana pode ter sido influenciada pelo próprio óxido de zinco.

Já o produto (Ag/ZnO) obtido no tempo de síntese de 15 minutos, apresenta uma ação antimicrobiana diferenciada em relação ao ZnO e seletiva visto que a sua efetiva atividade ocorreu apenas nas espécies bacterianas.

No caso do Ag/ZnO obtido no tempo de síntese de 30 minutos, ocorreu uma diminuição da atividade antibacteriana, tanto em relação ao ZnO puro como ao Ag/ZnO sintetizado em 15 minutos.

Tabela 16. Resultados dos ensaios de atividade biológica dos sólidos obtidos nas sínteses e para o ZnO.

Microrganismos	Concentração 2000 µg/mL (Produtos)							Controle do microrganismo	Controle: Clorafenicol / Nistatina
	1	2	3	4	5	6	7		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Staphylococcus. epidermidis</i> (ATCC 12228)	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i> (ATCC 25853)	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i> (ATCC 9027)	+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli.</i> (ATCC 10536)	+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli.</i> (ATCC 8733)	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Candida krusei</i> (LM- 12C)	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6538)	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> (LM-14)	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 13803)	+	+	-	-	-	+	-	+	+
<i>Candida albicans</i> (LM-105)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	-	+	-	+	+	+	-	+	+

(+): Crescimento do microrganismo

(-): Inibição do crescimento do microrganismo

1= Ag sintetizado em 5 min;

2 = Ag sintetizado em 15 min;

3 = Ag sintetizado em 30 min;

4 = ZnO;

5 = Ag/ZnO sintetizado em 5 min;

6 = Ag/ZnO sintetizado em 15. min;

7= Ag/ZnO sintetizado em 30min.;

5.5.2 Ensaio de atividade citotóxica e tóxica de nanopartículas de prata coloidal.

A solução contendo nanopartículas de prata coloidal não apresentou citotoxicidade em *Artemia salina* (Tabela 17). Em relação ao teste de citotoxicidade da solução de AgNO_3 , não foi possível verificar a atividade do Ag^+ , pois o ensaio ocorreu em solução salina havendo portanto presença de íons cloreto o que possibilitou a precipitação de AgCl .

Tabela 17 - Resultados dos testes citotóxicos das soluções de nanopartículas de prata coloidal em *Artemia salina*, após 24 horas.

Concentração (ppm)	Extrato por decocção - percentual de mortalidade de <i>Artemia Salina</i> (%)
200	0
100	0
50	0
25	0
12,5	0
6,25	0
3,125	0

No teste toxicológico, encontrado na Tabela 18, da solução de AgNO_3 , observou-se a mortalidade de alevinos até a concentração 12,5 ppm, o que demonstra um considerável efeito tóxico, provocado pela presença dos íons Ag^+ em solução.

Para o teste toxicológico da solução de NPC, Tabela 19, observou-se a mortalidade de alevinos até a concentração de 50 ppm. O que indica uma menor toxidade das NPC em relação aos íons de prata.

Tabela 18 Resultados dos testes toxicológicos de uma solução contendo íons Ag^+ em alevinos de *Poecilia reticulata*, após 24 horas.

Concentração (ppm)	Extrato por decocção - percentual de mortalidade de <i>alevinos</i> (%)
200	100
100	100
50	100
25	70
12,5	50
6,25	0
3,125	0

Tabela 19 Resultados dos testes toxicológicos das soluções coloidais de nanopartículas de prata em alevinos de *Poecilia reticulata*, após 24 horas.

Concentração (ppm)	Extrato por decocção - percentual de mortalidade de <i>alevinos</i> (%)
200	100
100	100
50	70
25	0
12,5	0
6,25	0
3,125	0

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que as soluções de NPC não possuem citotoxicidade de acordo com os testes realizados com a *Artemia Salina*, nas concentrações de 200 á 3,125 ppm. Frente aos alevinos de *Poecilia reticulata* observou-se que a DL_{50} foi maior do que 25 ppm. Sendo assim, propõe-se uma melhor investigação das propriedades tóxicas do composto em estudo.

6 CONCLUSÕES

O estudo do processo de síntese de nanopartículas de prata pelo método hidrotermal de micro-ondas, utilizando AgNO_3 como sal precursor e citrato de amônio como agente redutor, mostrou-se extremamente eficaz, pois possibilitou a formação de nanopartículas de prata coloidal com tamanhos possivelmente menores do que 5 nm, e prata metálica na forma de precipitado, via uma única etapa de síntese sob diferentes tempos de processamento da ordem de minutos, com rendimentos bastantes significativos.

O domínio do processo de obtenção de uma solução coloidal estável de nanopartículas de prata coloidal remete para diversas aplicações tecnológicas em potencial.

Os resultados de atividade biológica obtidos remetem para corroborar com o fato de que novos produtos à base de nanopartículas de prata podem ser desenvolvidos, de modo especial no campo da saúde humana.

O tempo de síntese tanto no processo de obtenção da prata como no processo de impregnação da prata sobre o óxido de zinco exerceu influências consideráveis, principalmente na quantidade de produto obtido e no comportamento das partículas nos testes biológicos, visto que a prata metálica sintetizada em 30 minutos apresentou notável atividade antimicrobiana, na concentração testada. O sólido obtido no processo de impregnação da prata sobre o óxido de zinco sintetizado em 15 minutos exerceu ação antimicrobiana seletiva para bactérias testadas.

As nanopartículas de prata, na forma de solução coloidal, apresentaram relevante atividade antimicrobiana com uma menor toxicidade quando comparada à prata iônica.

7 SUGESTÃO E TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da morfologia e tamanho das partículas de prata precipitada e impregnada sobre o ZnO.

- Estudo da atividade antimicrobiana do Ag/ZnO sobre bactérias presentes na flora bucal e que são causadoras de cárie, já que o óxido de zinco é um clássico material usado como curativo odontológico.

- Estudo das propriedades mecânicas da prata suportada Ag/ZnO visando a estabelecer se este material pode apresentar-se com propriedades superiores ao do ZnO puro em aplicações odontológicas.

- Estudo da influência química de agentes estabilizantes e/ou templates como polietilenoglicol sobre o tamanho e sobre a morfologia das partículas.

- Estudo da influência da variação da concentração dos componentes de partida da reação no produto final.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEGRINI, J.; BOUCHBERG, M. S.; MAILLOLS, H. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et applications in microbiologia. **Society Pharmacy Montpellier**, v. 33, n. 1, p. 73- 86, 1973.

AMORNPITOKSUK, P. et al. Synthesis, photocatalytic and antibacterial activities of ZnO particles modified by diblock copolymer. **Powder Technology**, n. 212, p. 432–438, 2011.

ASHARANI, P. V. *et al.*, Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **American Chemical Society nano**, v. 3, n. 2, p. 279 – 290. 2009.

ASHARANI, P. V. *et al.*, Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, n. 19, p. 255102 (8pp). 2008.

ASWATHY, B. *et al.* Microwave assisted synthesis and UV–Vis spectroscopic studies of silver nanoparticles synthesized using vanillin as a reducing agent. **Journal of Molecular Liquids**, n. 159, p. 165–169, 2011.

ASWATHY, B. *et al.*, 2011. Microwave assisted synthesis and UV–Vis spectroscopic studies of silver nanoparticles synthesized using vanillin as a reducing agente. **Journal of Molecular Liquids**, n. 159, p.165–169, 2011.

BAWER, A.W.M.M.; KIRBY, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, n.3, p.162-167, 2003.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

DARMANIN, Thierry *et al.*, Microwave-assisted synthesis of silver nanoprisms/nanoplates using a “modified polyol process”. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering**, n. 395, p. 145– 151, 2012.

DASTJERDI, Roya e MONTAZER, Majid. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 79, p. 5–18, 2010.

DE SANTANA Henrique, *et al.*, Preparação e caracterização de substratos SERS ativos: Um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. **Química nova**, v. 29, n. 2, 194-199, 2006.

DIBROV, P. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholera*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2668–2670. 2002.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713, 1988.

EL-SHISHTWYA, Reda M; ASIRI Abdullah M e AL-OTAIBIA, Maha M. Synthesis and spectroscopic studies of stable aqueous dispersion of silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta**, n. 79, p. 1505– 1510, 2011.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.*, Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.6, p.1089-10945, 1991.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.*, Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **Journal of Clinical Microbiology**., v.30, n.12, p.3128-3145, 1992.

FELTRIN, Carlos Willian. **Síntese e propriedades do ZnO: Correlação entre propriedades estruturais e atividade fotocatalítica**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

FERNANDES, Maria Fernanda Marques; FILQUEIRAS, Carlos, A. L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macro- desafios). **Química nova**, v. 31, n. 8, p. 2205 – 2213, 2008.

FONTENELLE, A F. *et al.*, Avaliação da Toxicidade de Extratos de Plantas Medicinais através de Bioensaios com *Artemia salina* Leach. **Ciência e cultura**, v.40, n.11, p.1109-11,1998.

GARCIA, Marcus Vinicius Dias. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GORUP, Luiz 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**, n. 360, p. 355–358, 2011.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HENGLEIN, Arnim, Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles, **Chemical Reviews**, v. 89, p. 1861, 1989.

HUANG, B., TOMALIA, D. A., “Dendronization of gold and CdSe/CdS (core-shell) quantum dots with tomalia type, thiol core, functionalized poly(amidoamine) (PAMAM) dendrons”, **Journal of Luminesc.**, v. 111, p. 215, 2005.

HUH, A e Jung, KWON, Young Jik. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, n.156, p. 128-145, 2011.

JALELICCI, Miguel junior e VARANDA, Laudemir Carlos. O Mundo dos Colóides, **Química nova na escola**, n. 9, p. 9-13. 1999.

KEYSON, Dawy de Araújo Almeida. **Nanoestruturas de óxido de cobre obtidas por novo método hidrotermal de micro-ondas**. 2006. 121 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

KHAN, Aslam *et al.*, Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using poly-N-isopropylacrylamide/acrylic acid microgel particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, n. 377, p. 356–360, 2011.

KIM, Jun Sung *et al.*, Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, n. 3, p. 95– 101, 2007.

LEONARDI, Denise Piotto *et al.*, Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana de alguns cimentos endodônticos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 4, p. 367-373. 2009.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 84, n. 4, p. 538–544, 1998.

MARAMBIO-JONES, Catalina e HOEK, Eric M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, n.12, p. 1531–1551, 2010.

MATIJEVIC, Egon, Preparation and properties of uniform size colloids. **Chemistry of materials**, v. 5, p. 412, 1993.

MISHRA, Yogendra Kumar *et al.*, Virostatic potential of micro–nano filopodia-like ZnO structures against herpes simplex virus-1. **Antiviral Research**, n. 92, p. 305–312, 2011.

MOEZZI, Amir; MCDONAGH, Andrew; CORTIE, Michael B. Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications **Chemical Engineering Journal**, p. 1– 22, 2012.

MOHANTY, Soumitra, *et al.*, An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2011

NADAGOUDA, Mallikarjuna N.; SPETH, Thomas F. e VARMA, Rajender S. Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanostructures. **Accounts of Chemical Rserch**, v. 44, n. 7, p. 469–478, 2010.

OLIVEIRA, Marcela Mohallem. **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades**. 2005. 149 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

OLIVEIRA, Andre Luiz Menezes de. **Nanoestruturas de Óxido de Zinco obtidas pelo Método Hidrotermal de Microondas Doméstico**. 2009. 124 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

ÖZGÜR, Ü. *et al.*, comprehensive review of ZnO materials and devices. **Journal of Applied Physics**, n. 98, p. 1–103, 2005.

PERELSHTAIN, Ilana *et al.*, Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. **Nanotechnology**, n. 19, p. 245705 (6pp), 2008.

RASMUSSEN, John W. *et al.* Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. **Expert Opin Drug Deliv**, n. 9, p. 1063–1077, 2010.

SAHA, Sndip. WANG, J. M. e PAL, Anjali. Nano silver impregnation on commercial TiO₂ and a comparative photocatalytic account to degrade malachite green. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 147–159. 2012.

SAHIN, F. *et al.*, Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549-557, 2004.

SAMANTA, Sadhan *et al.*, Synthesis of silver nanodiscs and triangular nanoplates in PVP matrix: Photophysical study and simulation of UV–vis extinction spectra using DDA method. **Journal of Molecular Liquids**, n. 165, p. 21–26, 2012.

SANSEVERINO, Antonio Manzolilo. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 660-667, 2002.

SIFONES, Ángela B. *et al.*, Preraración de nanopartículas de prata em ausencia de polímeros esestabilizates. **Química nova**, v. 33, n. 6, p. 1266-1269, 2010.

SMETANA, Alexander B. *et al.*, Biocidal Activity of Nanocrystalline Silver Powders and Particles. **Langmuir**, v. 24, p. 7457-7464, 2008.

SOLOMOM, S. D. et al., Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322 – 235, 2007.

STANKIEWICZ, Andréia et al. Avaliação das propriedades do cimento de óxido de zinco e isoeugenol. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v.42, n. 2, p. 14-20. 2000.

SU, Hong-Lin *et al.*, The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. **Biomaterials**, n. 30, p. 5979–5987, 2009.

TOLAYMAT, Tjabet M. *et al.*, An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific paper. **Science of the Total Environment**, n. 408, p. 999–1006. 2010.

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

VILJOEN, A. *et al.*, *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) – the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2-3, p.137-143, 2003.

YANG, Zhiqiang *et al.*, One-pot hydrothermal synthesis of silver nanowires via citrate reduction. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 352, p. 285–291, 2010.

ZARBIN, Aldo J. G. Química de (nano)materiais. **Química nova**, V. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZHANG, Lingling *et al.*, Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli. **Journal of Nanoparticle Research**, n. 12, p. 1625–1636, 2010.