

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

DOUGLAS SANTOS DA SILVA

**PREPARAÇÃO DE FILMES DE CELULOSE CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS EM MEIO DE
LÍQUIDO IÔNICO**

DIADEMA

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

DOUGLAS SANTOS DA SILVA

**PREPARAÇÃO DE FILMES DE CELULOSE CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS EM MEIO DE
LÍQUIDO IÔNICO**

Dissertação apresentada ao programa
de Ciência e Tecnologia da
Sustentabilidade da Universidade
Federal de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências

Prof^a. Dr^a. FERNANDA FERRAZ
CAMILO
Orientadora

DIADEMA

2018

Silva, Douglas Santos

Preparação de filmes de celulose contendo nanopartículas de prata produzidas em meio de líquido iônico / Douglas Santos da Silva. – Diadema, 2018.

79 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2018.

Orientador: Fernanda Ferraz Camilo

1. Celulose. 2. Nanopartículas. 3. Prata. 4. Filmes. 5. Líquido iônico.
I. Título

CDD 661.802

*Dedico este trabalho à Deus,
meus pais, Jeane e Reginaldo, meu
irmão, Matheus, meus avós, Maria
de Lourdes e Manoel, minha
madrinha, Betânia, meu tio,
Fernando e minhas tias, Alba e
Angela, e meus primos-irmãos
Andresa, Davi, Victor, Rafael,
Bruno e Caroline, todos que me
deram força, garra, fé, conforto e
muito incentivo, acreditando,
aconselhando e lutando ao meu lado
para que eu conseguisse chegar a
um futuro de sucesso. Obrigado por
serem meus alicerces.*

À minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda Ferraz Camilo, por ter sido mãe, amiga, professora e orientadora diante o processo de desenvolvimento deste trabalho. Por ter tirado parte da sua vida para se dedicar a me passar ensinamentos, se reunir para realizar correções e aprendizados da vida. Obrigado pela confiança, carinho, dedicação e principalmente por ter sido minha maior fonte de inspiração profissional e pessoal. Nunca terei palavras para expressar minha gratidão e admiração.

À grande amiga Camila Rodrigues, que me auxiliou com seus conhecimentos, estudou comigo durante todo o desenvolvimento deste trabalho, tirou parte de seu tempo para revisar ao meu lado, e foi também uma das pessoas que mais me deu força em momentos de adversidades. Obrigado por ser tão especial para mim e por ter se tornado uma das maiores e melhores pessoas que adquiri durante a vida. Saiba que você mudou minha vida pra melhor, e me fez uma pessoa mais evoluída e mais realizada com as coisas que a vida me proporcionou. Sem você eu não teria conseguido chegar até aqui.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Suzan Pantaroto Vasconcellos que gentilmente colocou-se à disposição frente a toda infraestrutura do seu laboratório e colaborou com a execução dos ensaios biológicos realizados neste trabalho. Agradeço também por se prontificar em participar da avaliação deste trabalho.

Às Profa. Dra. Carolina Vautier Teixeira Giongo e Profa. Dra. Elaine Pavini Cintra, por participarem da banca examinadora e se prestarem solícitas.

Ao mestre e colega Vitor Ferrari que ensinou, auxiliou e dedicou parte de seu tempo nos ensaios biológicos apresentados neste trabalho.

À amada amiga Flávia Tavares, que mal sabe, mas foi mais do que apenas amiga, mas também fonte de inspiração como pesquisadora, por ser mostrar guerreira, e sempre prestativa. Sem dúvidas você merece mais do que uma citação, mas também um agradecimento que eu jamais conseguirei fazer. Obrigado por ter se tornado umas das pessoas mais incríveis que ganhei na pós-graduação. Espero levar sua amizade pro resto da minha vida.

Às grande amigas Roselaine Oliveira e Larissa Oliveira por terem sido colegas de trabalho, conselheiras e terem prestado ajuda em diversos momentos.

Ao grande amigo Vinícius Cavalheiro por ter prestado o máximo de ajuda em cada momento que precisei durante a realização deste trabalho. Obrigado por sua amizade e companheirismo.

À grande amiga e companheira de matérias Carla Regina, que além de batalhar ao meu lado, foi parceira, conseguindo trazer grandes êxitos e muitos momentos de risada.

Aos meus amigos/irmãos de coração, Nathan, Paola, Denise, Pam, Iran, Léo Francisco, Pol, Lucas, Tauani, Carol Andrade, Rodrigo, Gabriel, Dani, Bru Ballerini, Patty Yani, Camila, Nando, Teph, Anderson, Edu, Agnes, Léo Yudi, Gui, Patty Suzuki, Fê Carli, Andy, Thalita, Nick, Breno, Flavi, Letícia, Bruninha, Pam Zanatto, Taly, Mune, Isa, May, Jé, Radhi, Carol Rabelo, Math, Vic, por terem contribuído com minha formação pessoal, sendo mais do que amigos, mas também conselheiros e parceiros que ganhei da vida.

Aos colegas Arthur, Marconi, Sinval, Leonardo, Mariana, Alessandra, Rebeca, Giovana, Guilherme, Lister, Danilo, Felipe e demais colegas do laboratório de materiais híbridos pelo companheirismo e força durante estes dois anos de pesquisa.

Aos colegas Oscar, Bruna, Kelly, Débora, Guilherme e demais colegas do laboratório de biologia pela companhia nos experimentos finais e amizade.

À FAPESP (2014/23065-3) pelo trabalho de pesquisa.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

E a todos que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, sempre me cercando de carinho: Muito obrigado!

“Somehow, I can't believe that there are any heights that can't
be scaled by a man who knows the secret of making dreams
come true.”

Walt Disney

ABREVIATÓES

AgNPs: Nanopartículas de prata
ATR: Refletância total atenuada
BIm: N-butylimidazol
BMImCl: Cloreto de 1-butyl-3-metilimidazólio
BMImOAc: Acetato de 1-butyl-3-metilimidazólio
CEL: Celulose
CIM: Concentração inibitória mínima
CC: Carboximetilcelulose
CMC: Celulose microcristalina
DMF: Dimetilformamida
DRX: Difractometria de raios X
HDP⁺: Hexadecilpiridínio
HDPSal: Salicilato de hexadecilpiridínio
HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose
IV: Infravermelho
LB: Luria Bertania
LI: Líquido Iônico
Lit: Literatura
Ln: Lantanídeo
MC: Metilcelulose
MET: Microscopia eletrônica de transmissão
MEV: Microscopia eletrônica de varredura
mmHg: Milímetro de mercúrio
MTT: Cloreto de trifeniltetrazólio
NPs: Nanopartículas
OTES: Octiltriethoxysilano
PVP: Polivinilpirrolidona
RMN: Ressonância nuclear magnética
rpm: rotações por minuto
RSO: Espécies reativas de oxigênio
SPR: Surface plasmon resonance
TBACit: Citrato de tetrabutylamônio
TG: Termogravimetria
T_m: Temperatura de fusão
TSA: Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
UFC: Unidades formadoras de colônia
UV-vis: Ultravioleta-visível
YMA: Extrato Malte e Levedura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÕES	1
1.1	Nanopartículas de prata	1
1.2	Líquidos iônicos (LI) e seu uso na síntese de nanomateriais	4
1.3	Uso de líquidos iônicos na síntese de nanopartículas de prata	7
1.4	Materiais híbridos de celulose e nanopartículas de prata	14
2	OBJETIVOS	18
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
3.1	Preparação e caracterização do salictrato de hexadecilpiridínio - meta 1a.....	20
3.2	Preparação das dispersões de nanopartículas de prata em HDPSal – meta 1b.....	20
3.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das dispersões de HDPSal contendo AgNPs – meta 1c.....	21
3.4	Preparação e caracterização do BMImCl - meta 2a	23
3.5	Preparação e caracterização do BMImOAc - meta 2b	24
3.6	Solubilização da celulose em BMImCl ou BMImOAc e obtenção de um filme de celulose – meta 2 c.....	26
3.7	Preparação dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata preparadas em HDPSal – meta 2d.....	28
3.8	Avaliação da atividade microbica dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata produzidas em HDPSal – meta 2e	29
3.9	Técnicas de caracterização	31
3.9.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	31
3.9.2	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV)	32
3.9.3	Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis (UV-Vis)	32
3.9.4	Espectroscopia de difração de Raios-X (DRX).....	32
3.9.5	Termogravimetria (TG).....	32
3.9.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	Preparação e caracterização das dispersões de nanopartículas de prata em HDPSal (OBJETIVO 1).....	33
4.1.1	Preparação e caracterização do salictrato de hexadecilpiridínio - meta 1a.....	33
4.1.2	Preparação das dispersões de nanopartículas de prata em HDPSal – meta 1b....	34
4.1.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das dispersões de HDPSal contendo AgNPs – meta 1c	39
4.2	Preparação de filmes de celulose não modificada contendo as nanopartículas de prata produzidas em meio de líquido iônico. (OBJETIVO 2)	47

4.2.1	Preparação e caracterização do BMImCl	48
4.2.2	Preparação e caracterização do BMImOAc	48
4.2.3	Solubilização da celulose em BMImCl e BMImOAc e obtenção de filmes de CEL por regeneração das dispersões	49
4.2.4	Preparação dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata preparadas em HDPSal	54
4.2.5	Avaliação da atividade microbica dos filmes de celulose contendo nanopartículas de Ag produzidas em HDPSal	66
5	CONCLUSÃO.....	69
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Imagens registradas em um microscópio eletrônico de transmissão de células de <i>E. coli</i> tratadas em contato com nanopartículas de prata após 1 hora de contato (a) escala de 1 μm (b) escala de 250 nm.....	2
FIGURA 2: Diagrama apresentando a interação de AgNPs na membrana celular bacteriana.....	3
FIGURA 3: Foto de um líquido iônico registrada a temperatura ambiente	5
FIGURA 4: Exemplos de cátions e ânions comuns que compõem os líquidos iônicos..	5
FIGURA 5: Algumas propriedades e aplicações dos líquidos iônicos.....	5
FIGURA 6: Estabilização eletrostática de uma nanopartícula metálica promovida por íons provenientes de um líquido iônico.....	6
FIGURA 7: Estabilização estérica promovida por líquidos iônicos contendo cadeias alquílicas longas	7
FIGURA 8: Gráfico do número de artigos e trabalhos de revisões sobre o tema “ionic liquid” and “Silver Nanoparticles” da coleção principal do “Web of Science” ao longo de 2001-2018.....	8
FIGURA 9: Estrutura do sulfato de 1-etil-3-metilimidazólio e tetrafluoroborato de 1-(2-hidroxietil)-3-metilimidazólio	9
FIGURA 10: Imagem obtida no microscópio eletrônico de transmissão em diferentes magnificações	10
FIGURA 11: Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), utilizando o HDPSal e uma mistura de HDPSal e AgNPs	11
FIGURA 12: Imagem obtida em um microscópio eletrônico de transmissão das AgNPs preparadas em BMImTf ₂ N na presença de ácido oleico	12
FIGURA 13: Estrutura do líquido iônico DIMCARB	12
FIGURA 14: Imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão das amostras de (A) AgNPs derivadas de AgOTf em BMimOTf produzidas na ausência de BIm ⁺ . (B) AgNPs derivadas de AgBF ₄ em BMImBF ₄ produzidas na presença de BIm ⁺	13
FIGURA 15: (A): Estrutura do TBACit; (B): Imagem obtida num microscópio eletrônico de transmissão de nanopartículas de prata produzidas em TBACit após um mês de preparo.....	14
FIGURA 16: Estrutura da celulose.....	15

FIGURA 17: Teste repelente de água em (A): tecido de algodão; (B): tecido de algodão tratado com OTES revestido com AgNPs.	17
FIGURA 18: Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) do algodão tratado com OTES revestido com AgNPs. (A) frente a <i>E. coli</i> (B) frente a <i>S. aureus</i>	17
FIGURA 19: Estrutura dos líquidos iônicos que foram utilizados nesta dissertação ...	19
FIGURA 20: Ilustração da preparação das nanopartículas de prata em HDPSal.....	21
FIGURA 21: Representação de parte de uma placa contendo 12 poços. Em vermelho é representado os espaços direcionados a amostras de controle.	22
FIGURA 22: Representação de parte de uma placa contendo 12 poços. Indicação de como é feito a determinação do CIM	23
FIGURA 23: SPIN COATER (MICROTUBE, MODEL A1V1.1.2)	27
FIGURA 24: Ilustração do preparo de um filme de celulose (CEL).....	28
FIGURA 25: Ilustração das etapas de preparação dos filmes de celulose com as nanopartículas de prata preparadas na presença de HDPSal (amostras da TABELA 2)	29
FIGURA 26: Ilustração do teste de disco-difusão em ágar para os filmes de celulose contendo as AgNPs.....	30
FIGURA 27: Ilustração do resultado do teste de disco-difusão	30
FIGURA 28: Reação de preparação do salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal).....	33
FIGURA 29: Reação de preparação das nanopartículas de prata em salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal)	34
FIGURA 30: Fotos das dispersões de AgNP preparadas na presença HDPSal após 30 minutos de preparo (Amostras da TABELA 2).....	36
FIGURA 31: Espectros na região do UV-Vis das dispersões de nanopartículas de prata contendo HDPSal do BLOCO 1.....	37
FIGURA 32: Espectros de absorção na região do UV-Vis das dispersões de nanopartículas de prata contendo HDPSal do BLOCO 2.....	38
FIGURA 33: Gráfico de CIM em termos de Ag para as amostras do BLOCO 1 para diferentes microrganismos.....	44
FIGURA 34: Gráfico de CIM em termos de Ag para as amostras do BLOCO 2 para diferentes microrganismos.....	44
FIGURA 35: Gráfico de CIM em termos de HDPSal para as amostras do BLOCO 1 para diferentes microrganismos.....	45
FIGURA 36: Gráfico de CIM em termos de HDPSal para as amostras do BLOCO 2 para diferentes microrganismos.....	46

FIGURA 37: Ilustração que mostra a interação de uma nanopartícula de prata com HDP ⁺	47
FIGURA 38: Reação de preparação do BMImCl.....	48
FIGURA 39: Reação de preparação do BMImOAc.....	49
FIGURA 40: Filme de celulose logo após regeneração (A) e após secagem (B).	50
FIGURA 41: Espectro de absorção na região do IV do filme de celulose.....	51
FIGURA 42: Imagens registradas em microscópio eletrônico de varredura da celulose microcristalina (CMC) (Imagens A e B em vermelho) e do filme de CEL (Imagens A e B em preto)	52
FIGURA 43: Difratoograma de raios-X do filme de celulose (CEL) e da CMC.....	53
FIGURA 44: Análise termogravimétrica do filme de celulose	54
FIGURA 45: Fotos dos filmes de celulose que foram impregnados com as dispersões de nanopartículas de prata contendo HDPSal (TABELA 2)	55
FIGURA 46: Espectros de absorbância na região do UV-Vis da dispersão NPAg ₁₀ HDP ₁₀₀ Ag ⁺ em contato com um filme de celulose após 12, 18, 36, 48, 62, 72, 80 horas de impregnação	57
FIGURA 47: Espectros de absorção na região do UV-Vis dos filmes do BLOCO 1 denominados: CEL, CEL ₁₀ HDP ₀ Ag ⁺ , CEL ₁₀ HDP ₁₀₀ Ag ⁺ , CEL ₁₀ HDP ₂₀₀ Ag ⁺ , CEL ₁₀ HDP ₃₀₀ Ag ⁺ , CEL ₁₀ HDP ₄₀₀ Ag ⁺ , CEL ₁₀ HDP ₅₀₀ Ag ⁺ e CEL ₁₀ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺	59
FIGURA 48: Espectros de absorção na região do UV-Vis dos filmes do BLOCO 2 denominados CEL, CEL ₁₀ HDP ₀ Ag ⁺ , CEL ₅ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺ , CEL ₁₀ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺ , CEL ₅₀ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺ e CEL ₁₀₀ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺	60
FIGURA 49: Espectros vibracionais na região do infravermelho dos filmes do BLOCO 1 denominados: Celulose, Cel ₁₀ HDP ₀ Ag ⁺ , Cel ₁₀ HDP ₁₀₀ Ag ⁺ , Cel ₁₀ HDP ₂₀₀ Ag ⁺ , Cel ₁₀ HDP ₃₀₀ Ag ⁺ , Cel ₁₀ HDP ₄₀₀ Ag ⁺ , Cel ₁₀ HDP ₅₀₀ Ag ⁺ e Cel ₁₀ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺	61
FIGURA 50: Espectros vibracionais na região do infravermelho dos filmes do BLOCO 2 denominados Celulose, Cel ₁₀ HDP ₀ Ag ⁺ , Cel ₅ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺ , Cel ₁₀ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺ , Cel ₅₀ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺ e Cel ₁₀₀ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺	61
FIGURA 51: Interações via ligação de hidrogênio entre a celulose com os íons salicilato e HDP ⁺	63
FIGURA 52: Difratoogramas de raios X do filme de CEL e dos filmes CEL ₅ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺ e CEL ₁₀ HDP ₁₀₀₀ Ag ⁺	64

FIGURA 53: Imagens registradas em microscópio eletrônico de varredura de um filme de celulose (azul) e dos filmes CEL_10HDP_1000Ag ⁺ (vermelho) e CEL_5HDP_1000Ag ⁺ (verde).....	65
FIGURA 54: Resultados dos testes de disco-difusão frente a <i>E. coli</i> dos filmes de celulose dos BLOCOS 1 e 2	66
FIGURA 55: Resultados dos testes de disco-difusão frente a <i>S. aureus</i> dos filmes dos BLOCOS 1 e 2.....	67
FIGURA 56: Resultados dos testes de disco-difusão frente a <i>C. albicans</i> dos filmes dos BLOCOS 1 e 2.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Concentrações de inibição mínimas para as amostras de prata preparadas na referência [27].....	10
TABELA 2: Dados sobre o preparo das dispersões de AgNPs produzidas na presença de HDPSal	21
TABELA 3: Diluições feitas e a % de concentração em cada uma das dispersões.....	22
TABELA 4: Parâmetros utilizados no Spin Coater (Model A1V1.1.2)	27
TABELA 5: Condições utilizadas para o preparo dos inóculos microbianos para os testes de disco-difusão	31
TABELA 6: Abreviações das amostras das dispersões de AgNPs produzidas em HDPSal e concentrações de HDPSal e prata.....	35
TABELA 7: Valor de CIM frente ao microrganismo <i>E. coli</i> para as amostras do BLOCO 1.....	39
TABELA 8: Valor de CIM frente ao microrganismo <i>E. coli</i> para as amostras do BLOCO 2.....	40
TABELA 9: Valor de CIM frente ao microrganismo <i>S. aureus</i> para as amostras do BLOCO 1.....	40
TABELA 10: Valor de CIM frente ao microrganismo <i>S. aureus</i> para as amostras do BLOCO 2.....	41
TABELA 11: Valor de CIM frente ao microrganismo <i>C. albicans</i> para as amostras do BLOCO 1.....	41
TABELA 12: Valor de CIM frente ao microrganismo <i>C. albicans</i> para as amostras do BLOCO 2.....	42

RESUMO

O desenvolvimento de métodos que utilizam biopolímeros como suporte para nanopartículas metálicas é de interesse crescente. Dentre os biopolímeros, celulose é o mais indicado por ser de ocorrência natural, abundante e atóxico, entretanto a sua insolubilidade e difícil processabilidade são obstáculos a serem superados.

Neste trabalho desenvolveu-se um novo método de obtenção de filmes de celulose (CEL) contendo nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas em meio aquoso contendo o líquido iônico, salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal).

A celulose utilizada neste trabalho foi uma celulose não modificada, que foi dissolvida em um líquido iônico denominado cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImCl) em uma quantidade de 2,5% (massa/massa). A dissolução ocorreu com sucesso, e o material regenerado com água forneceu um filme transparente, incolor e resistente ao manuseio. Nesse processo de dissolução e regeneração a celulose passou de celulose do tipo I para tipo II.

As nanopartículas de prata (AgNPs) foram produzidas a partir da redução química de nitrato de prata dissolvido em água com borohidreto de tetrabutilamônio (TBABH₄) na presença de diferentes concentrações de HDPSal. A obtenção das AgNPs em todas as amostras foi comprovada pela presença da banda de ressonância de superfícies de plasmon (SPR) da prata em escala nanométrica ao redor de 415 nm. Os ensaios para determinação das concentrações mínimas inibitórias mostraram que a ação microbicida dessas dispersões deve-se ao líquido iônico (HDPSal), que rodeia as nanopartículas de prata, estabilizando-as por efeito eletrostático.

Todas as AgNPs preparadas em HDPSal foram impregnadas nos filmes de celulose. Foi possível comprovar a impregnação das AgNPs nos filmes devido à presença da banda SPR ao redor de 420 nm em todos os filmes. O processo de impregnação das AgNP não ocasionou mudança na estrutura primária da celulose, entretanto ela passou do tipo I para o tipo II. Além das AgNPs, o sal HDPSal também foi impregnado no filme durante o processo. Pelas imagens registradas em um microscópio eletrônico de varredura identificou-se AgNPs de tamanho menor que 100 nm distribuídas homogeneamente ao longo do filme. Todos os filmes tiveram sua ação anti microbiana avaliada frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus* e apenas aqueles com maior concentração de prata apresentaram atividade frente à *C. albicans*. A ação microbicida nos filmes foi atribuída às nanopartículas de prata.

Palavras-chave: celulose, nanopartículas, prata, filmes, líquido iônico.

ABSTRACT

The development of methods that use biopolymers as a support for the immobilization of metallic nanoparticles is of growing interest. Among biopolymers, cellulose is the most indicated because it is natural, abundant and non-toxic, but its insolubility and its poor processability are obstacles to be overcome.

This study developed a new method for producing cellulose films (CEL) containing silver nanoparticles (AgNPs) produced in ionic liquid medium, called hexadecylpyridinium salicylate (HDPSal).

The cellulose used in this work was a unmodified polymer, which was dissolved in an ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazole chloride (BMImCl) 2.5% (w/w). This solution was regenerated by the addition of water, affording a transparent and resistant film. In this process of dissolution and regeneration of cellulose, it was transformed from type I to type II.

The silver nanoparticles (AgNPs) were produced from the chemical reduction of silver nitrate dissolved in water with tetrabutylammonium borohydride (TBABH₄) in the presence of different concentrations of HDPSal.

Obtaining of AgNPs in all the samples was proved by the presence of the surface plasmon resonance (SPR) band of silver in nanometric scale around 415 nm. The assays for determination of minimum inhibitory concentrations showed that the microbicidal action of these dispersions was due to the ionic liquid (HDPSal), which surrounds the silver nanoparticles, stabilizing them by electrostatic effect.

All prepared AgNPs in HDPSal were impregnated at cellulose films. It was possible to confirm the impregnation of the AgNPs, in the films, by the presence of the SPR band around 420 nm in all films. The AgNP impregnation process did not cause any change in the primary structure of the cellulose, although it modified to type II. In addition to the AgNPs, HDPSal was also impregnated in the film during the process. From the recorded images on a scanning electron microscope, AgNPs smaller than 100 nm were distributed homogeneously throughout the film. All films showed antimicrobial action against *E. coli* and *S. aureus*, and higher concentration of silver films showed activity against *C. albicans*. In this sense, the microbicidal action at films was attributed to the silver nanoparticles.

Keywords: cellulose, nanoparticles, silver, films, ionic liquid.

1 INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÕES

O método de preparo de nanopartículas de prata (AgNPs) é objeto de intenso estudo, pois influencia diretamente suas propriedades e consequentemente suas aplicações. A síntese química de nanopartículas de prata em líquidos iônicos (LIs) vem ganhando destaque na literatura, pois esses sais são considerados solventes com organização estrutural, servindo como moldes e agentes estabilizantes de nanoestruturas. Nesse contexto, nessa introdução abordar-se-á os seguintes temas: nanopartículas de prata (item 1.1), o uso de líquidos iônicos na síntese de nanomateriais (item 1.2) e o uso de líquidos iônicos na síntese de nanopartículas de prata (item 1.3).

Além disso, a imobilização de nanopartículas de prata em substratos sólidos como em filmes de celulose (CEL) contorna alguns problemas que o uso de dispersões de AgNP acarreta como, por exemplo, dificuldade de separação e recuperação do meio reacional, tendência de agregação e lixiviamento das nanopartículas no meio utilizado. Ainda assim, nessa introdução serão discutidos os métodos de preparo de materiais híbridos de celulose e nanopartículas de prata (item 1.4).

1.1 Nanopartículas de prata

As nanopartículas (NPs) são materiais que possuem pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica, ou seja, menor que 100 nm e com propriedades, físicas e químicas, diferenciadas quando comparadas aos massivos¹. Esse novo comportamento deve-se ao fato de que os nanomateriais possuem uma área superficial elevada quando comparada com o seu volume, tornando efeitos de superfície mais pronunciados quando comparados com os materiais massivos².

As nanopartículas de prata (AgNPs) possuem poder microbicida já estabelecido³, podendo ser utilizadas em revestimentos antimicrobianos, curativos para ferimentos e dispositivos biomédicos⁴. O seu uso é estimulado por ser um material de baixo custo se comparado a nanopartículas provenientes de outros metais nobres⁵.

A ação microbicida de nanopartículas de prata frente à *E. coli* foi estudada em 2004 por Sondi e colaboradores⁶. Os autores realizaram vários ensaios bacteriológicos utilizando diferentes concentrações de nanopartículas de prata no subcultivo de culturas dessas bactérias. Em imagens registradas por um microscópio eletrônico de transmissão (MET) (FIGURA 1), verificaram-se alterações na morfologia da membrana bacteriana e o acúmulo das nanopartículas no interior da bactéria, resultando em sua morte.

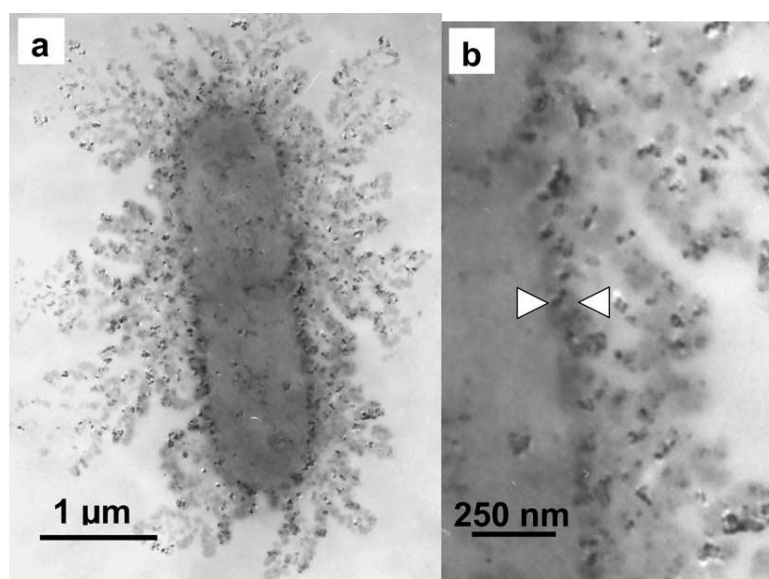


FIGURA 1: Imagens registradas por microscópio eletrônico de transmissão de células de *E. coli* tratadas em contato com nanopartículas de prata após 1 hora de contato (a) escala de 1 μm (b) escala de 250 nm. FIGURA adaptada da literatura⁶

Em 2010, Marambio-Jones e colaboradores⁷ publicaram uma revisão bibliográfica sobre o mecanismo antibacteriano de nanopartículas de prata. Nesse estudo, os autores ressaltaram que a liberação de íons de prata pelas nanopartículas de prata pode aumentar a permeabilidade das membranas bacterianas promovendo lise celular e consequente não replicação do seu DNA. É previsto que tal ação ocorra de forma similar com as células eucarióticas, portanto são necessários estudos adicionais sobre o emprego de AgNPs em seres humanos e no meio ambiente⁸. O mecanismo de ação das AgNPs em bactérias, ilustrado pela FIGURA 2, mais comumente aceito inclui as seguintes etapas⁷: (1) as nanopartículas de prata possuem íons de prata (Ag^+) em sua superfície que geram espécies reativas de oxigênio (RSO); (2) essas espécies (Ag^+ e RSO) interagem com as proteínas da membrana, afetando suas funções; (3) esses eventos afetam a permeabilidade da membrana; (4) AgNPs, Ag^+ e RSO entram na célula e interferem nos mecanismos de replicação de seu DNA.

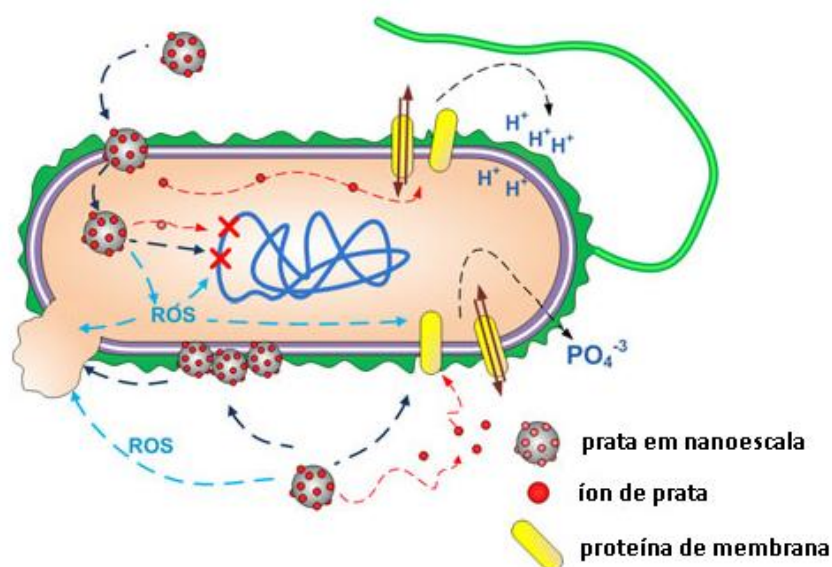


FIGURA 2: Diagrama apresentando a interação de AgNPs na membrana celular bacteriana. FIGURA adaptada da literatura⁷

Além da ação bactericida, Prasad e colaboradores⁹ avaliaram mecanismos celulares e moleculares das AgNPs contra um patógeno oportunista, a *Candida albicans*. O estudo mostrou que a concentração inibitória mínima (CIM) de AgNP necessária para inibir o crescimento de 90% dos organismos foi ao redor de 40 µg/mL. Foi relatado que as AgNPs induzem a morte celular programada mediada por estresse oxidativo através do acúmulo de espécies reativas intracelulares de oxigênio (RSO).

As nanopartículas de prata podem ser preparadas por redução química de sais de prata em diversos meios reacionais¹⁰. Devido à alta energia de superfície com sua vasta área, essas nanopartículas tendem a se aglomerar, exigindo a presença de agentes estabilizantes e moldes durante a síntese¹¹. Nos últimos anos, o uso de líquidos iônicos (LIs) como moldes ou agentes estabilizantes na preparação de nanomateriais vem emergindo na comunidade científica⁶.

1.2 Líquidos iônicos (LI) e seu uso na síntese de nanomateriais

Os líquidos iônicos são sais com ponto de fusão abaixo de 100 °C¹², como pode ser observado na FIGURA 3. Geralmente, são compostos por ânions e cátions volumosos e com carga deslocalizada, como exemplificado na FIGURA 4. Eles possuem boa estabilidade química e térmica, não são inflamáveis, possuem baixa pressão de vapor, alta viscosidade e condutividade iônica¹³⁻¹⁵. Devido a essas características, os líquidos iônicos têm várias aplicações, por exemplo, como solventes em reações orgânicas, como eletrólitos para dispositivos eletroquímicos e lubrificantes (FIGURA 5)¹⁶⁻¹⁸.



FIGURA 3: Ilustração de um líquido iônico registrada a temperatura ambiente. Autoria própria

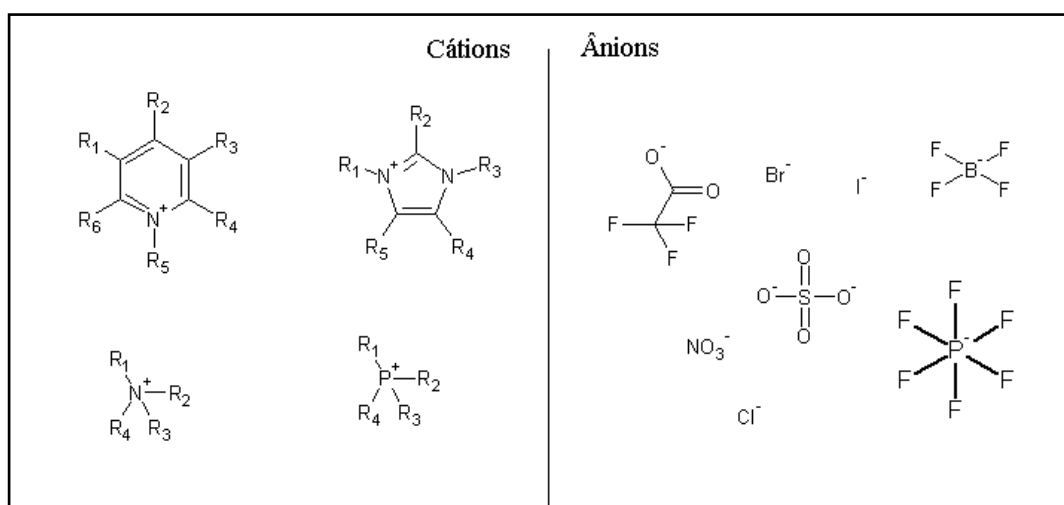


FIGURA 4: Exemplos de cátions e ânions comuns que compõem os líquidos iônicos. Autoria própria

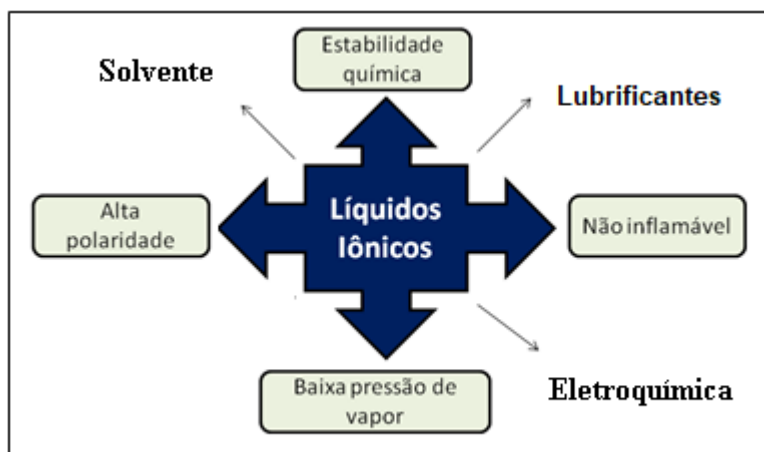


FIGURA 5: Algumas propriedades e aplicações dos líquidos iônicos. Autoria própria

Além disso, os líquidos iônicos são sais cujos cátions e ânions se auto-organizam espontaneamente, formando cavidades em escala nanométrica, que atuam como molde, para a síntese de nanomateriais¹⁹. Além de atuar como moldes durante a síntese, os líquidos iônicos agem também como agentes estabilizantes de nanopartículas metálicas²⁰.

A interação dos íons que compõem os líquidos iônicos com a superfície das nanopartículas, como mostrado na FIGURA 6, promove uma estabilização eletrostática²⁰, uma vez que ocorre repulsão eletrostática entre as nanopartículas. Dessa forma, a aglomeração é evitada assim como a perda das propriedades das nanopartículas.

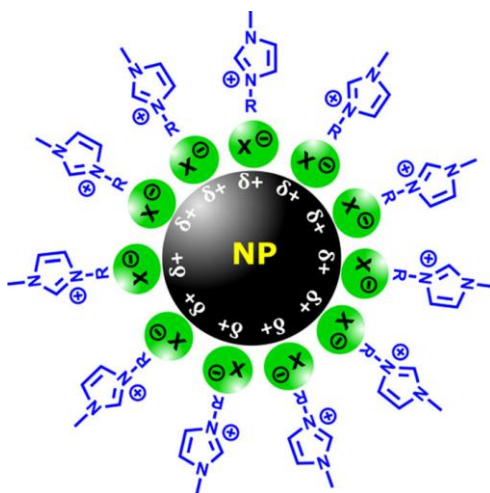


FIGURA 6: Estabilização eletrostática de uma nanopartícula metálica promovida por íons provenientes de um líquido iônico. FIGURA adaptada da literatura²⁰

Outro tipo de estabilização que alguns líquidos iônicos podem promover é a estabilização estérica²⁰. Nesse caso, os líquidos iônicos devem possuir grupos volumosos, como por exemplo, cadeias alquílicas longas e com ramificações, que formem uma camada protetora ao redor das nanopartículas, evitando que elas se aproximem. Uma ilustração de como essa estabilização estérica pode ocorrer é mostrada na FIGURA 7.

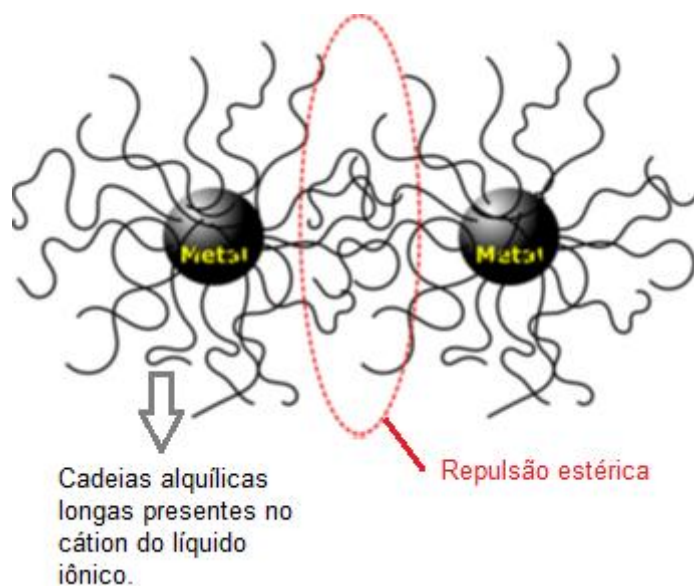


FIGURA 7: Estabilização estérica promovida por líquidos iônicos contendo cadeias alquílicas longas. FIGURA adaptada da literatura²⁰

Além de atuar como molde e agente estabilizante (por estabilização estérica e eletrostática), alguns líquidos iônicos também podem atuar como reagentes²¹. Essas sínteses são denominadas *all-in-one*, já que o líquido iônico emprega todos os papéis necessários simultaneamente para a obtenção das nanoestruturas²².

Neste contexto, em 2008, Zhang e colaboradores²² usaram pela primeira vez líquidos iônicos em sínteses *all-in-one* para a obtenção de nanocristais de fluoretos de lantanídeos (LnF_3). Líquidos iônicos contendo os cátions 1-metil-3-alkylimidazólios (alkil = n-butil e n-octil) e diferentes ânions (BF_4^- , PF_6^-) atuaram como agentes estabilizantes, moldes e forneceram ânions fluoretos (F^-), que eram um dos reagentes da síntese. As alterações nas estruturas dos líquidos iônicos levaram à formação de nanocristais com morfologias e tamanhos diferentes.

1.3 Uso de líquidos iônicos na síntese de nanopartículas de prata

O uso de líquidos iônicos na síntese das nanopartículas de prata vem crescendo continuamente, como pode ser visto no gráfico mostrado na FIGURA 8.

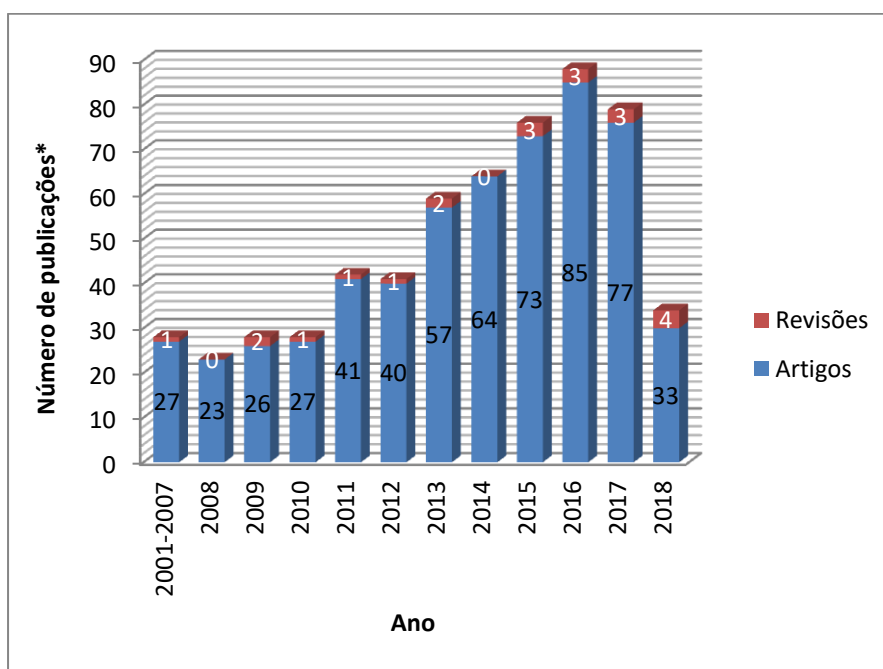


FIGURA 8: Gráfico do número de artigos e trabalhos de revisões sobre o tema “ionic liquid” and “silver nanoparticles” da coleção principal do “Web of Science” ao longo de 2001-2018 (Acesso em Abril/2018)

Relatos de sínteses de nanoestruturas de prata em líquidos iônicos começaram a surgir em 2004. Neste ano, Zhang e colaboradores²³ apresentaram o preparo de nanopartículas de prata a temperatura ambiente via redução química do sal de prata, acetato de prata, em meio aquoso contendo o líquido iônico sulfato de 1-etil-3-metilimidazólio (FIGURA 9). Foi observado que o líquido iônico atuou como agente estabilizante, evitando a agregação das nanopartículas de prata com diâmetro médio de 20 nm.

Em 2007, Choi e colaboradores²⁴ sintetizaram AgNPs em soluções aquosas acrescidas do líquido iônico tetrafluoroborato de 1-(2-hidroxietil)-3-metilimidazólio ([HEMIm][BF₄]) (FIGURA 9). Foi observado que o [HEMIm][BF₄] atuou tanto como agente redutor como estabilizante da reação. Foi avaliada também a atividade anti microbiana e antifúngica das dispersões contendo AgNPs por teste de concentrações inibitórias mínimas (CIM). Os testes de CIM contendo apenas o [HEMIm][BF₄]

revelaram que este LI puro não apresentava atividade microbica, já as dispersões de AgNPs contendo o líquido iônico apresentaram elevada atividade anti microbiana, devido a ação das nanopartículas de prata.

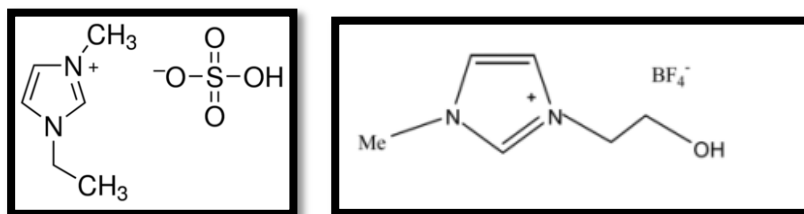


FIGURA 9: Estrutura do sulfato de 1-etil-3-metilimidazólio (esquerda) e tetrafluoroborato de 1-(2-hidroxietil)-3-metilimidazólio (direita)

Em 2011, Setua e colaboradores²⁵ observaram a redução química de dois sais de prata - tetrafluoroborato de prata (AgBF_4) e trifluorometanossulfonato de prata (AgCF_3SO_3) com hidrogênio como agente redutor, em um sistema de micela reversa contendo dois líquidos iônicos - tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio ($[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$) e trifluorometanossulfonato de 1-butil-1-metilpirrolidínio ($[\text{BMPy}][\text{Tfms}]$), o surfactante Triton X-100 e ciclohexano. Nanopartículas com diâmetro médio de 3,0 nm foram obtidas no sistema micelar proposto.

Em 2013, Harada e colaboradores²⁶ sintetizaram nanopartículas de prata a partir da fotoredução de nitrato de prata em microemulsões de água e do líquido iônico hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazólio, na presença dos surfactantes Tween 20 e Triton X-100. Foi observado que o tamanho das partículas de prata produzidas nas microemulsões contendo Triton X-100 era ligeiramente maior do que aquelas produzidas nas microemulsões contendo Tween 20. Essas dispersões produzidas desestabilizaram após 30 minutos, devido à agregação das AgNPs. Essas mesmas sínteses foram testadas sob alta pressão de CO_2 (25 MPa), e nessas condições as

dispersões ficaram estáveis por longo período de tempo. Nanopartículas de 3,7 nm de diâmetro foram obtidas em Triton X-100 e de 2,8 nm em Tween 20.

Em 2015, Lu e colaboradores²⁷ sintetizaram AgNPs por redução química de AgNO_3 com ácido ascórbico, na interface de água com diferentes líquidos iônicos (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio, hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio e hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazólio). Nanoplasmas triangulares de prata (FIGURA 10) foram obtidas em condições específicas de síntese. Essas nanoplasmas apresentaram atividade anti microbiana superior a nanopartículas esféricas, como pode ser visto nos dados da TABELA 1. Segundo os autores, as nanoplasmas liberaram mais Ag^+ na superfície do que as nanopartículas.

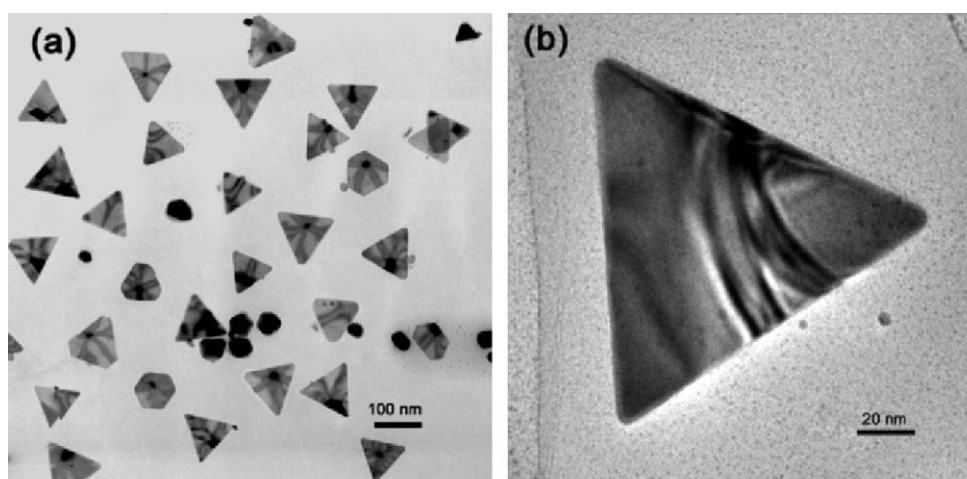


FIGURA 10: Imagem obtida no microscópio eletrônico de transmissão em diferentes magnificações. FIGURA adaptada da literatura²⁷

TABELA 1: Concentrações de inibição mínimas para as amostras de prata preparadas [27]

Bactéria	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Nanoplasmas de Ag	Nanopartículas de Ag
<i>E. coli</i>	15	25
<i>S. aureus</i>	20	40

Em 2015, Silveira e colaboradores²⁸ realizaram o preparo de nanopartículas de prata a partir da redução química de nitrato de prata com borohidreto de tetrabutilamônio, utilizando diferentes concentrações do líquido iônico salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal) como agente estabilizante. Nanopartículas esféricas com diâmetro ao redor de 10 nm foram obtidas e a presença do líquido iônico foi fundamental para manter as dispersões estáveis ao longo do tempo. A presença do líquido iônico HDPSal melhorou a atividade microbica das dispersões de AgNPs frente aos microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, conforme ilustrado na FIGURA 11.

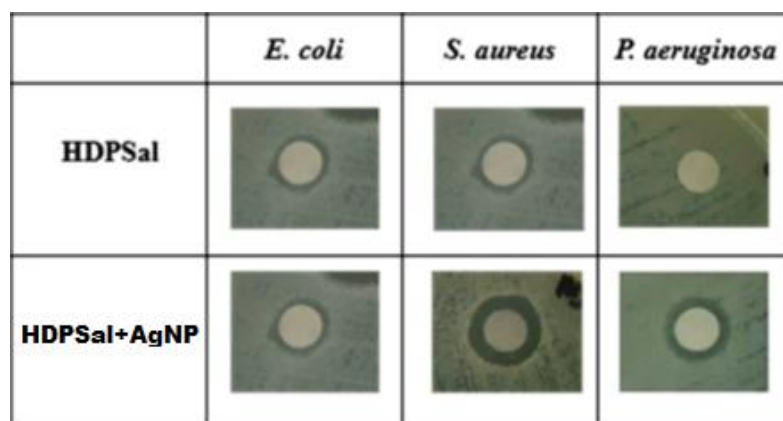


FIGURA 11: Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão, utilizando o HDPSal e uma mistura de HDPSal e AgNPs. FIGURA adaptada da literatura²⁸

Todos os trabalhos descritos anteriormente envolvem o uso de misturas de água e líquidos iônicos, pois a presença do solvente molecular é essencial para solubilizar o sal de prata utilizado²⁹⁻³⁰. Relatos para a obtenção de AgNPs em meios exclusivos de líquidos iônicos são mais escassos. Em 2006, Wang e colaboradores³¹ sintetizaram nanopartículas de prata a partir do tratamento térmico de trifluoroacetato de prata na presença de ácido oleico e do líquido iônico bis(trifluorometanossulfonil)imideto de 1-butyl-3-metilimidazólio (BMImTf₂N). Dispersões com nanopartículas esféricas de 3,0 nm e monodispersas (FIGURA 12) foram obtidas. O uso do líquido iônico propiciou a

decomposição térmica do sal de prata a elevadas temperaturas, processo não viável em solventes convencionais.

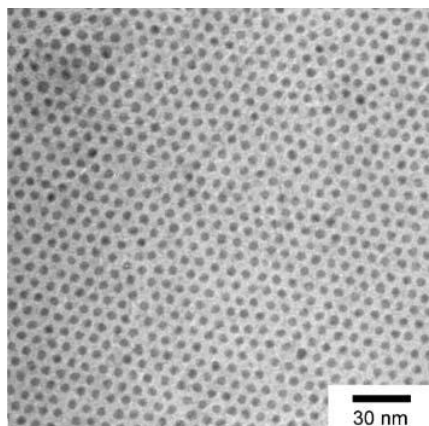


FIGURA 12: Imagem obtida em um microscópio eletrônico de transmissão das AgNPs preparadas em BMImTf₂N na presença de ácido oleico. FIGURA adaptada da literatura ³¹

Em 2007, Bhatt e colaboradores³² sintetizaram nanopartículas de prata a partir da redução de carbonato de prata com dimetilformamida (DMF) no líquido iônico dimetilcarbamato de dimetilamônio (DIMCARB) (FIGURA 13). A adição de polivinilpirrolidona (PVP) retardou a velocidade de formação de partículas maiores. Dependendo das condições utilizadas foram produzidas nanopartículas ou nanofios de prata.

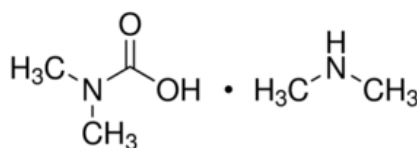


FIGURA 13: Estrutura do líquido iônico DIMCARB

Em 2008, Redel e colaboradores³³ realizaram o primeiro estudo sistemático, relacionando o tipo de ânion do líquido iônico com o tamanho das nanoestruturas. Nanopartículas de prata foram obtidas pela redução com hidrogênio de diferentes sais de prata na presença de líquidos iônicos 1-butil-3-metilimidazólio (BMIm⁺) ou n-butiltrimetilamônio (BtMA⁺) contendo os ânions BF₄⁻, PF₆⁻, CF₃SO₃⁻, entre outros.

Nanopartículas de prata com diâmetro entre 2,8 e 26,1 nm foram obtidas, dependendo do tamanho do ânion do LI. A desestabilização e aglomeração das AgNPs foi evitada quando n-butilimidazol (BIm^+) foi adicionado no meio reacional, que neutralizou os ácidos formados durante a reação. Na FIGURA 14 nota-se que as nanopartículas de prata (FIGURA 14 – A) aglomeram na síntese realizada na ausência de BIm^+ e dispersam na presença de BIm^+ (FIGURA 14 – B).

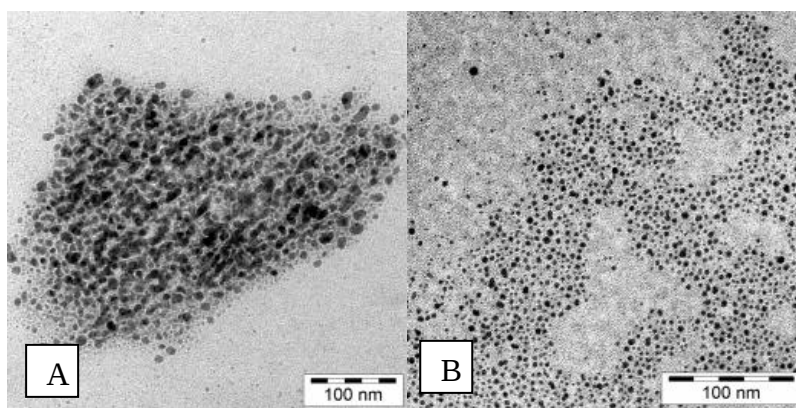


FIGURA 14: Imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão das amostras de (A) AgNPs derivadas de AgOTf em BMimOTf produzidas na ausência de BIm^+ . (B) AgNPs derivadas de AgBF_4 em BMimBF_4 produzidas na presença de BIm^+ . FIGURA adaptada da literatura³³

Em 2016, Correa e colegas³⁴ sintetizaram nanopartículas de prata no líquido iônico citrato de tetrabutilamônio (TBACit) (FIGURA 15-A). O ânion citrato do TBACit atuou como agente redutor do sal de prata, bis(trifluorometanossulfonil)imideto de prata (AgTf_2N). Além disso, o líquido iônico contribuiu para a estabilização eletrostática e estérica de nanopartículas de prata de diâmetro aproximado de 2-6 nm (FIGURA 15-B). As dispersões produzidas foram estáveis ao longo do tempo e continham alta concentração de prata, que são aspectos importantes para aplicações.

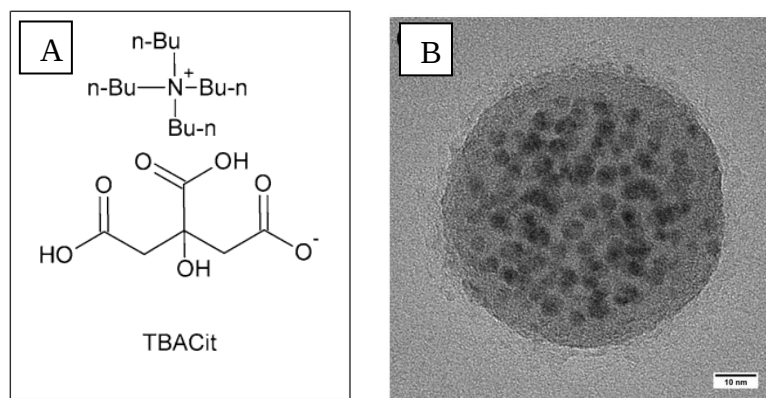
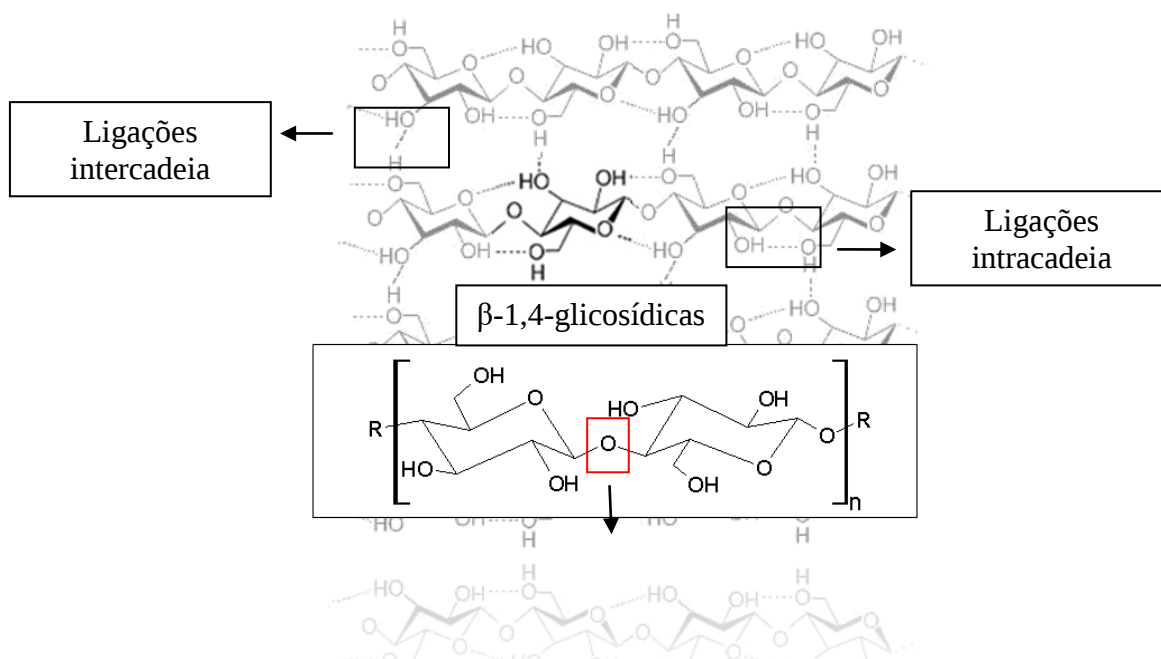


FIGURA 15: (A): Estrutura do TBACit; (B): Imagem obtida num microscópio eletrônico de transmissão de nanopartículas de prata produzidas em TBACit após um mês de preparo.

Adaptado da literatura ³⁴

1.4 Materiais híbridos de celulose e nanopartículas de prata

A celulose (CEL) é um polissacarídeo formado por cadeias não ramificadas de β -D-glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas (FIGURA 16)³⁵. Apresenta algumas propriedades interessantes, como ser proveniente de fonte renovável, possuir baixo custo e apresentar biocompatibilidade e biodegradabilidade³⁶. Por possuir vários grupos hidroxilas, a celulose possui várias ligações de hidrogênio intra e intercadeia, apontadas na FIGURA 16³⁷.

**FIGURA 16:** Estrutura da celulose

De acordo com as interações presentes na celulose, ela pode existir como diversos alomorfos, sendo as mais comuns a celulose do tipo I e tipo II.³⁶ A celulose do tipo I é a encontrada na natureza, oriunda de microrganismos, fungos ou plantas³⁶, enquanto a celulose do tipo II é obtida por processos de dissolução da celulose nativa e posterior regeneração.³⁸

A principal dificuldade do uso da celulose é a sua insolubilidade em solventes convencionais.³⁹ Esse aspecto indesejado foi superado quando Swatloski e colaboradores⁴⁰ relataram a dissolução de celulose nos líquidos iônicos cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImCl) e acetato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImOAc). Mais tarde, Liu e colaboradores⁴¹ descreveram a produção de filmes de celulose a partir da regeneração controlada de uma solução do biopolímero em BMImCl, abrindo um leque de aplicações dessas membranas, por exemplo, como suportes para diferentes classes de nanomateriais, incluindo as nanopartículas metálicas.⁴²⁻⁴⁸ A imobilização de nanopartículas de prata em membranas de celulose contorna alguns problemas que seu

uso em dispersão acarreta, como por exemplo: dificuldade de separação e recuperação do meio reacional, tendência de agregação das nanopartículas e o lixiviamento das nanopartículas no meio utilizado⁴⁹⁻⁵³.

Existem na literatura vários trabalhos que relatam acerca da preparação de materiais híbridos de derivados de celulose com nanopartículas de prata, tais como metilcelulose (MC), a carboximetilcelulose (CC) e a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)⁵⁴⁻⁶¹, porém há poucos relatos que envolvem a preparação de materiais híbridos de celulose não modificada e essas nanopartículas metálicas. He e colaboradores⁶², em 2003, imobilizaram nanopartículas de prata em fibras de celulose porosa. Devido à estrutura nanoporosa do biopolímero e à alta densidade de oxigênio (grupos éteres e hidroxilas) nas fibras de celulose, ele se tornou um efetivo nanoreator para sínteses *in situ* de nanopartículas metálicas. Adicionalmente, os grupos éteres e hidroxilas da celulose estabelecem interações íon-dipolo com os íons Ag^+ , estabilizando as AgNPs. Este trabalho é de destaque, pois possibilitou a abertura de um leque de pesquisas relacionadas à síntese de materiais híbridos de AgNPs e celulose.

Em 2010, Khalil-Abad e colaboradores⁴ prepararam fibras de algodão com características hidrofóbicas contendo AgNPs (FIGURA 17), a partir da redução de nitrato de prata com ácido ascórbico. As fibras de celulose foram modificadas com octiltriethoxisilano (OTES) para tornarem-se hidrofóbicas. O material apresentou ação anti microbiana frente aos microrganismos *E. coli* e *S. aureus* (FIGURA 18).

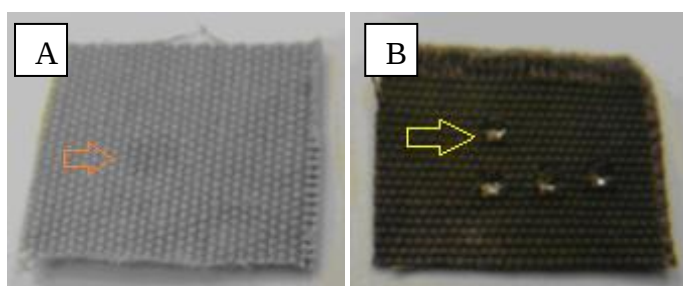


FIGURA 17: Teste repelente de água em (A): tecido de algodão; (B): tecido de algodão tratado com OTES revestido com AgNPs. FIGURA adaptada da literatura ⁴

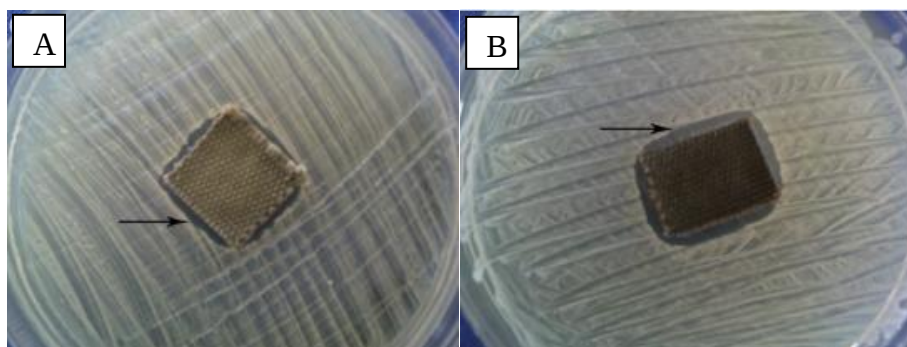


FIGURA 18: Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) do algodão tratado com OTES revestido com AgNPs frente a (A) *E. coli* (B) *S. aureus*. FIGURA adaptada da literatura ⁴

Em 2016, Muthulakshmi e colaboradores⁶³ relataram sobre o preparo de filmes de celulose produzidos por regeneração de uma solução do biopolímero dissolvido em uma solução de LiOH/uréia com álcool etílico. Estes filmes foram mergulhados em solução aquosa de nitrato de prata e os íons Ag^+ impregnados foram reduzidos com o extrato das folhas de *T. cattapa*. Os filmes de celulose contendo AgNPs apresentaram boa atividade anti microbiana frente às bactérias *E. coli* e *Bacillus sp.*

Como foi possível observar, existem poucos relatos de preparo de materiais híbridos, principalmente na forma de filmes, de celulose não modificada e nanopartículas de prata. Diante desse cenário, o desenvolvimento de métodos alternativos para produção de filmes de celulose não modificada e com alta concentração de nanopartículas de prata distribuídas uniformemente pela matriz celulósica é de interesse.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve os seguintes objetivos primordiais:

- **OBJETIVO 1:** Preparação e caracterização de dispersões de nanopartículas de prata em meio aquoso contendo o líquido iônico salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal) (FIGURA 19).
- **OBJETIVO 2:** Desenvolvimento de um novo método de preparação de filmes de celulose não modificada contendo as nanopartículas de prata produzidas em HDPSal.

Os objetivos específicos do **OBJETIVO 1** deste trabalho são:

- ✓ Preparar e caracterizar o líquido iônico salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal) (meta 1a);
- ✓ Preparar as dispersões de nanopartículas de prata (AgNPs) em HDPSal (meta 1b);
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das dispersões de HDPSal contendo AgNPs (meta 1c).

Os objetivos específicos do **OBJETIVO 2** deste trabalho são:

- ✓ Preparar e caracterizar o líquido iônico cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImCl) (FIGURA 19) (meta 2a);
- ✓ Preparar e caracterizar o líquido iônico acetato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImOAc) (FIGURA 19) (meta 2b);
- ✓ Solubilizar celulose em BMImCl e BMImOAc e obter filme de celulose (meta 2c);
- ✓ Preparar e caracterizar filmes de celulose contendo as nanopartículas de prata produzidas em HDPSal (meta 2d);

- ✓ Avaliar a atividade microbica dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata produzidas em HDPSal (meta 2e).

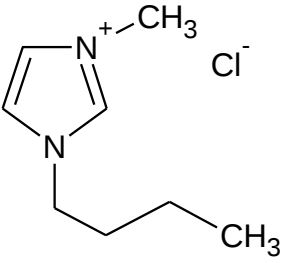
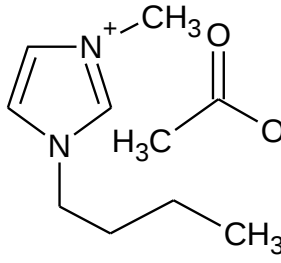
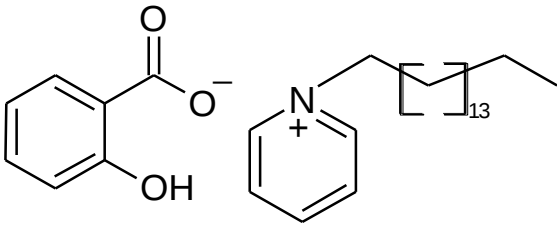
	
Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImCl)	Acetato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImOAc)
	
Salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal)	

FIGURA 19: Estrutura dos líquidos iônicos que foram utilizados nesta dissertação

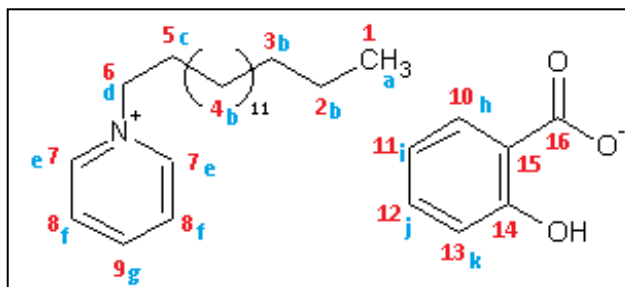
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Preparação e caracterização do salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal) - meta 1a

Em um erlenmeyer de 100 mL sob agitação magnética, 3,84 g (10 mmol) de brometo de hexadecilpiridínio (ALDRICH, 97%) e 1,60 g (10 mmol) de salicilato de sódio (ALDRICH, 99,5%) foram dissolvidos em 60 mL de uma mistura 1:1 (v/v) de água/acetona e misturados sob agitação constante em temperatura ambiente por 12 horas. O meio reacional foi extraído com diclorometano (SYNTH, 99,5%) e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (ALDRICH, 99,5%). O diclorometano foi removido a pressão reduzida, resultando em 4,05 g (9,38 mmol) de um sólido branco, com rendimento de 92% e com ponto de fusão ao redor de 63-65°C (Lit. = 67 °C)⁶⁴.

- **IV (KBr/cm⁻¹):** 3420 (v O-H); 3060 (v C-H_{arom}); 2917 (v C-H_{alif}); 2848 (v C-H_{alif}); 1630 (v C=C_{arom}); 1590 (v C=O); 1490 (δ C-H_{alif}); 1380 (δ C-H_{alif}); 720 (δ CH₂ rocking).

- **RMN de ¹H (300 MHz, 25 °C em CDCl₃, δ em ppm):** 0,87 (t, 3H_a, J = 7,0 Hz); 1,25 (m, 26H_b); 1,94 (m, 2H_c); 4,78 (t, 2H_d, J = 7,0 Hz); 8,0 (dd, 2H_f); 8,33 (t, 1H_g); 9,20 (d, 2H_e); 6,70 (dd, 1H_h); 6,80 (dt, 1H_i); 7,22 (dt, 1H_j); 7,84 (dd, 1H_k).



- **RMN DE ¹³C (75 MHz, 25 °C em CDCl₃, δ em ppm):** 14,1 (1C₁); 22,7 (1C₂); 26,1 (1C₃); 29,3-29,7 (11C₄); 31,9 (1C₅); 62,5 (1C₆); 128,3 (2C₇); 144,7 (2C₈); 144,9 (1C₉); 130,5 (1C₁₀); 120,0 (1C₁₁); 132,1 (1C₁₂); 116,2 (1C₁₃); 162,1 (1C₁₄); 117,2 (1C₁₅); 174,2 (1C₁₆).

3.2 Preparação das dispersões de nanopartículas de prata em HDPSal – meta 1b

Em um béquer sob agitação magnética, um volume conhecido de uma solução aquosa de nitrato de prata (ALDRICH, 99%) (10 mM) foi adicionado a uma solução aquosa de HDPSal sob agitação a temperatura ambiente. A seguir, um volume conhecido de uma solução aquosa de borohidreto de tetrabutilamônio (ALDRICH,

98%) (100 mM) foi adicionado lentamente (aproximadamente 1 gota por segundo) à solução de nitrato de prata, sob agitação constante por 30 minutos, conforme ilustrado na FIGURA 20. As quantidades de reagentes utilizadas nas preparações estão na TABELA 2.

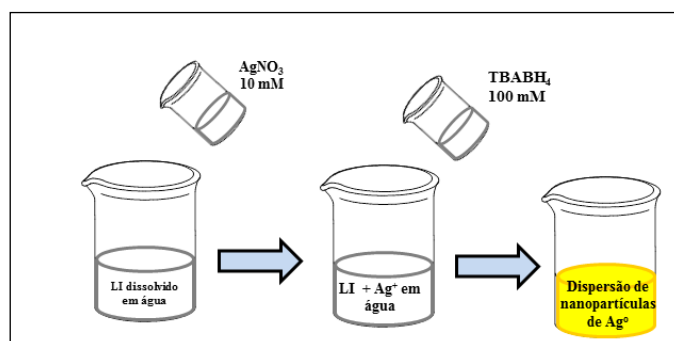


FIGURA 20: Ilustração da preparação das nanopartículas de prata em HDPSal

TABELA 2: Dados sobre o preparo das dispersões de AgNPs produzidas na presença de HDPSal

Nome da Amostra	Quantidade de HDPSal*	Volume de AgNO ₃ (10 mM)	Volume de TBABH ₄ (100 mM)	[Ag] final (mM)
NPAg_10HDP_100Ag ⁺	10 mg	100 µL	10 µL	0.1
NPAg_10HDP_200Ag ⁺	10 mg	200 µL	20 µL	0.2
NPAg_10HDP_300Ag ⁺	10 mg	300 µL	30 µL	0.3
NPAg_10HDP_400Ag ⁺	10 mg	400 µL	40 µL	0.4
NPAg_10HDP_500Ag ⁺	10 mg	500 µL	50 µL	0.5
NPAg_5HDP_1000Ag ⁺	5 mg	1000 µL	100 µL	1
NPAg_10HDP_1000Ag ⁺	10 mg	1000 µL	100 µL	1
NPAg_50HDP_1000Ag ⁺	50 mg	1000 µL	100 µL	1
NPAg_100HDP_1000Ag ⁺	100 mg	1000 µL	100 µL	1
NPAg_1000HDP_1000Ag ⁺	1000 mg	1000 µL	100 µL	1

*adicionado em 10 mL de água destilada

3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das dispersões de HDPSal contendo AgNPs – meta 1c

Para realizar estas análises foram selecionados três microrganismos: *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva), *Escherichia coli* (bactéria Gram-

negativa) e *Candida albicans* (levedura), todos patógenos I, selecionados de acordo com a literatura de referência.

Os testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados diluindo-se as amostras de AgNPs descritos na TABELA 2, sucessivamente, em poços como apresentados na FIGURA 21.⁷⁴⁻⁷⁶ Não foi utilizada a amostra NPAg_1000HDP_1000Ag⁺ nesses testes, pois obteve-se um gel. As diluições feitas e a % de concentração em cada uma das dispersões estão apresentadas na TABELA 3.

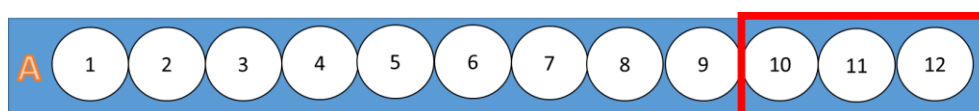


FIGURA 21: Representação de parte de uma placa contendo 12 poços. Em vermelho é representado os espaços direcionados a amostras de controle experimental.

TABELA 3: Diluições feitas e a % de concentração em cada uma das dispersões

Poços	Diluição (v/v)*
1 A	100%
2 A	50%
3 A	25%
4 A	12,5%
5 A	6,25%
6 A	3,12%
7 A	1,6%
8 A	0,8%
9 A	0,4%
10 A	Apenas meio de cultura
11 A	Apenas meio de cultura e microrganismos
12 A	Apenas meio de cultura, microrganismos e anticorpos

*em relação à concentração da dispersão bruta

Como exemplo, as diluições aconteceram da seguinte forma: 200 µL da dispersão NPAg_10HDP_100Ag⁺ foi adicionada no poço 1A. Então, 100µL deste material foi recolhido e transferido para o poço 2A, com adição de 100 µL de meio de cultura, sendo Luria Bertania (LB) para bactérias e Extrato Malte e Levedura (YMA)

para fungos. A seguir, 100 μL da dispersão no poço 2A foi transferido para o poço 3A com adição de 100 μL de meio de cultura. Diluições sucessivas foram feitas até o poço 9A. Todos estes poços (até a coluna 9) foram acrescidos com 10 μL de microrganismos. Os poços 10A, 11A e 12A foram acrescidos apenas do meio de cultura, do meio de cultura e microrganismos, e finalmente dos meios de cultura, microrganismos e o antibiótico Clorofenicol (ALDRICH) (para bactérias) e o antifúngico Nistatina (ALDRICH) (para fungos), respectivamente. Os inóculos bacterianos e fúngicos foram preparados por diluição de uma cultura de colônia durante 24 horas para equivaler a aproximadamente 0,4 a 0,5 número mais provável (NMP)/mL, antes de serem adicionadas nas placas de cultura (OD_{600}).

Após 24 horas as placas foram acrescidas do bioindicador de cloreto de trifeniltetrazólio (MTT). Coloração rosa indicou a manutenção das culturas, concluindo assim ineficiência da ação anti microbiana da amostra testada. O CIM foi a concentração do poço anterior do 1º poço que apresentou coloração rosa (FIGURA 22).

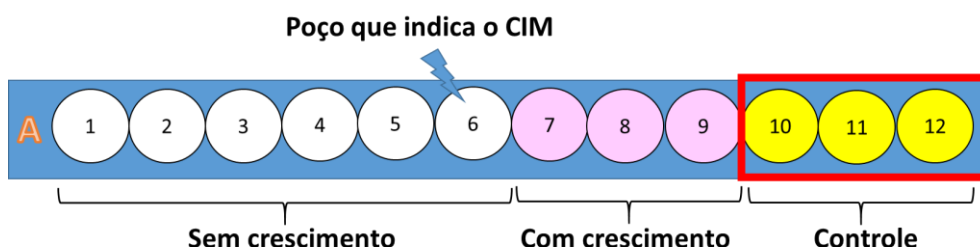


FIGURA 22: Representação de parte de uma placa contendo 12 poços. Indicação de como é feito a determinação do CIM

Esse teste foi realizado em colaboração com Prof^a. Dr^a. Suzan Pantaroto Vasconcellos na UNIFESP, campus DIADEMA.

3.4 Preparação e caracterização do BMImCl - meta 2a

Inicialmente, 1-clorobutano (ALDRICH, 99%) foi destilado a pressão ambiente recolhendo-se um líquido incolor de ponto de ebulição entre 74-76 °C (Lit. = 78 °C a

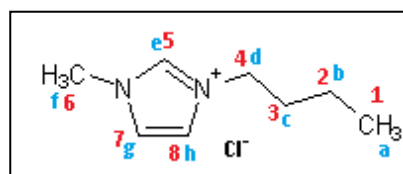
760 mmHg)⁶⁵. 1-metilimidazol (ALDRICH, 98%) foi purificado por destilação a pressão reduzida, recolhendo-se um líquido incolor de ponto de ebulição entre 115-118 °C a 73 mmHg (198 °C a 760 mmHg)⁶³.

Em um balão de fundo redondo de 500 mL equipado com condensador de refluxo, tubo secante com cloreto de cálcio e agitação magnética introduziram-se 135 mL (139,0 g; 1,69 mol) de 1-metilimidazol e 211 mL (187,7 g; 2,03 mol) de 1-clorobutano, previamente destilados. O sistema foi aquecido durante 24 horas a 70 °C. O excesso de 1-clorobutano foi removido em um rotoevaporador. Lavagens sucessivas com acetato de etila (SYNTH, 99,5%) foram feitas para eliminar qualquer resíduo de 1-metilimidazol. A seguir, o BMImCl foi colocado no rotoevaporador para eliminar qualquer resíduo volátil. O BMImCl foi obtido como um sólido branco de ponto de fusão entre 60-64 °C (Lit. = 65 °C)⁶⁴ com 80% de rendimento.

- **IV (filme/cm⁻¹):** 3061 (v C-H arom); 2956 e 2869 (v C-H alif); 1566 (v C=C arom); 1165 (v C-N).

- **RMN de ¹H (300 MHz, 25 °C em CDCl₃, δ em ppm):** 0,89 (t, 3H^a, J = 7,3 Hz); 1,30 (m, 2H^b); 1,73 (m, 2H^c); 3,06 (s, 3H^f); 4,27 (t, 2H^d, J = 7,2 Hz); 7,42 (s, 1H^g); 7,57 (s, 1H^h); 10,5 (s, 1H^e).

- **RMN de ¹³C (75 MHz, 25 °C em CDCl₃, δ em ppm):** 13,16 (1C¹); 19,28 (1C²); 32,19 (1C³); 36,58 (1C⁶); 49,80 (1C⁴); 121,94 (1C⁷); 123,6 (1C⁸); 137,99 (1C⁵).



3.5 Preparação e caracterização do BMImOAc - meta 2b

Primeiramente, 1-bromobutano (ALDRICH, 99%) foi destilado a pressão ambiente recolhendo-se um líquido incolor de ponto de ebulição entre 97-100 °C (Lit. = 101 °C a 760 mmHg)⁶². 1-metilimidazol (ALDRICH, 98%) foi purificado conforme descrito anteriormente.

O líquido iônico BMImOAc foi preparado em três etapas, seguindo procedimento já descrito na literatura⁶⁶. Na primeira etapa, foi preparado o brometo de

1-butil-3-metilimidazólio (BMImBr). Na segunda foi realizada a troca iônica entre o ânion brometo pelo ânion hidroxila em uma coluna de troca iônica (Ambersep 900 – Hydroxide form - FLUKA), produzindo o hidróxido de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImOH). A seguir, foi realizada uma reação entre BMImOH e ácido acético (SYNTH, 99,5%), fornecendo o acetato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImOAc).

Primeira etapa - Preparação do BMImBr

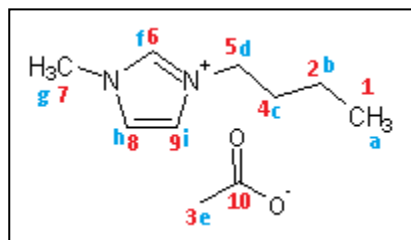
Em um balão de fundo redondo de 25 mL equipado com condensador de refluxo, tubo secante com cloreto de cálcio e agitação magnética introduziram-se 2,43 mL (2,54 g; 31,0 mmol) de 1-metilimidazol e 4,02 mL (5,10 g; 37,2 mmol) de 1-bromobutano, previamente destilados. O sistema permaneceu a 70 °C por 2 horas. A seguir, o excesso do brometo de n-butila foi removido por rotoevaporação. Obteve-se 6,25 g (28,5 mmol) de um sólido branco de PF= 74-76 °C (Lit. = 74 °C)⁶⁷ com 92% de rendimento.

Segunda e terceira etapa - Preparação do BMImOAc

Uma coluna cromatográfica de vidro de 3 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento foi preenchida com 10 g de uma resina de troca iônica básica (Ambersep 900 – Hydroxide form - FLUKA), e lavada excessivamente com água antes do uso. A seguir, 2,0 g (9,3 mmol) do BMImBr dissolvido em 50 mL de água destilada foi eluído pela coluna com a passagem de água de destilada. Para verificar a efetividade da troca de brometo por OH⁻, alíquotas retiradas da coluna passaram por testes com uma solução aquosa de AgNO₃ e HNO₃.

A seguir, a solução aquosa de BMImOH retirada da coluna foi acrescida de uma solução aquosa de ácido acético, usando a relação molar de 1:1. A seguir, a mistura reacional foi rotoevaporada à 70 °C e 20 mmHg, de modo a eliminar a água presente no meio reacional. Obteve-se 1,29 g (6.50 mmol) de um líquido viscoso límpido levemente amarelado. O rendimento foi de 70%.

- **IV (filme/cm⁻¹):** 3085 (v C-H_{arom}); 2962 e 2867 (v C-H_{alif}); 1574 (v C=O); 1465 (δ C-H_{arom no plano}); 1169 (v C-N).
- **RMN de ¹H (300 MHz, 25 °C em CDCl₃, δ em ppm):** 0,94 (t, 3H^a, J = 7,3 Hz); 1,35 (m, 2H^b); 1,76(m, 2H^c); 1,96(s, 3H^e); 4,03 (s, 3H^g); 4,27 (t, 2H^d, J = 7,2 Hz); 7,20 (s, 1H^h); 7,26 (s, 1Hⁱ); 10,72 (s, 1H^f).
- **RMN de ¹³C (75 MHz, 25 °C em CDCl₃, δ em ppm):** 13,39 (1C¹); 19,43 (1C²); 24,47 (1C³); 32,12 (1C⁴); 36,26 (1C⁷); 49,51 (1C⁵); 121,19(1C⁸); 122,63 (1C⁹); 139,65 (1C⁶); 177,45 (1C¹⁰).



3.6 Solubilização da celulose em BMImCl ou BMImOAc e obtenção de um filme de celulose – meta 2 c

Primeiramente, celulose microcristalina comercial (ALDRICH, tamanho de partícula de 20 µm– Número CAS 9004-34-6) foi seca na estufa a vácuo a 80 °C por 24 horas antes do uso. A seguir, em diferentes balões de fundo redondo equipados com condensador de refluxo, tubo secante com cloreto de cálcio e agitação magnética, adicionou-se o líquido iônico (BMImCl ou BMImOAc) e diferentes quantidades de celulose (2,5%, 5,0 %, 10% e 15%) em massa de celulose microcristalina em relação ao LI. Mantiveram-se os sistemas sob agitação e aquecimento de 60 °C por 24 horas.

Para o preparo do filme de celulose, verteu-se 5,0 g da dispersão 2,5 % de celulose em BMImCl em uma placa de Petri de poliestireno de 8 cm de diâmetro, espalhando-a com um spin coater (MICROTUBE, MODEL A1V1.1.2) (FIGURA 23), utilizando os parâmetros listados na TABELA 4. Em seguida, o filme de celulose foi

formado a partir da regeneração da dispersão pela adição de água. Para a secagem, o filme produzido foi estocado à temperatura ambiente por cinco dias e depois armazenado em um dessecador à vácuo com pentóxido de fósforo (ALDRICH, 97%) para remoção do excesso de água. Este procedimento está ilustrado na FIGURA 24.



FIGURA 23: SPIN COATER (MICROTUBE, MODEL A1V1.1.2)

TABELA 4: Parâmetros utilizados no Spin Coater (Model A1V1.1.2)

Parâmetros	
Tempo de aceleração até 500 rpm	120 s
Tempo de duração em 500 rpm	40 s
Tempo de desaceleração	10 s

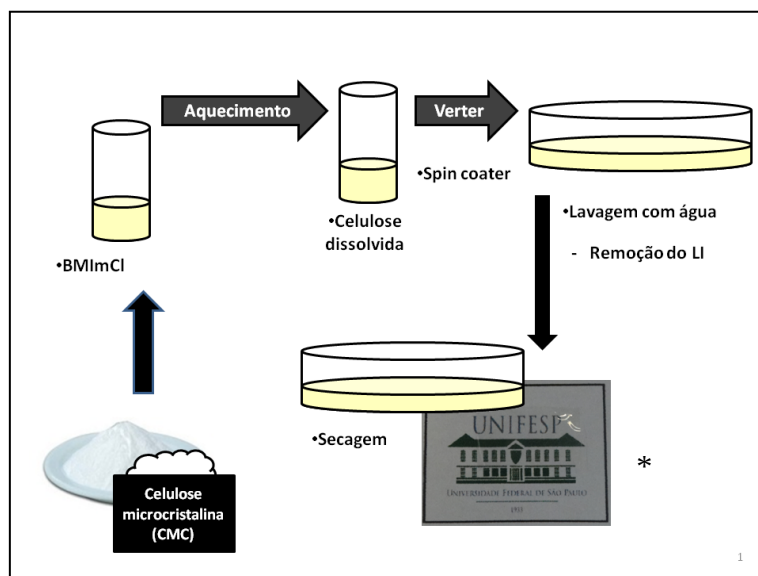


FIGURA 24: Ilustração do preparo de um filme de celulose (CEL)

*Filme colocado sobre logo da UNIFESP

3.7 Preparação dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata preparadas em HDPSal – meta 2d

Para a preparação dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata produzidas em HDPSal foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 3.6, porém a impregnação das nanopartículas de prata se deu antes da etapa de secagem.

Sucintamente, adicionou-se 5,0 g da solução 2,5% em massa de celulose em BMImCl em uma placa de Petri de poliestireno com 8 cm de diâmetro e a dispersão foi espalhada. Em seguida, o filme de celulose foi formado a partir da regeneração da dispersão pela adição de água. Ao filme de celulose úmido foi adicionado 5,0 mL de cada uma das dispersões denominadas $\text{NPAg}_x\text{HDP}_y\text{Ag}^+$ listadas na TABELA 2. O sistema permaneceu em contato e em repouso. Depois de 72 horas, o filme foi retirado da placa e lavado excessivamente com água, deixado à temperatura ambiente por cinco dias, e então armazenado em um dessecador a vácuo com pentóxido de fósforo para remoção de vestígio de água. O procedimento está ilustrado na FIGURA 25. Para comparação foi preparado um filme de celulose que foi deixado em contato com 5 mL

de uma solução contendo 1 mg/mL de HDPSal. Esses filmes foram denominados **CEL_xHDP_yAg⁺**, onde x é a quantidade de HDPSal e y ao volume de AgNO₃ utilizados no preparo das nanopartículas.

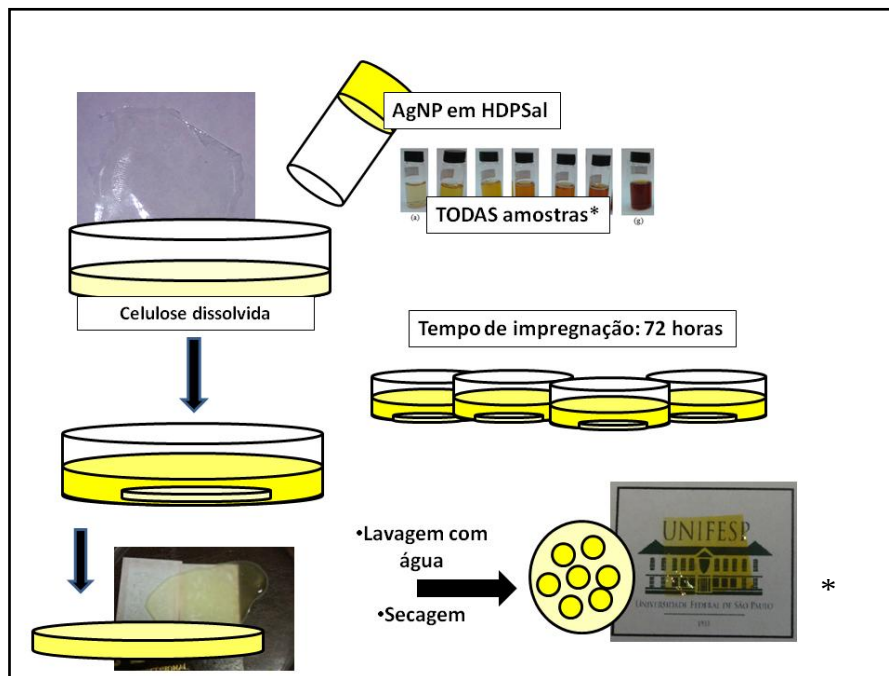


FIGURA 25: Ilustração das etapas de preparação dos filmes de celulose com as nanopartículas de prata preparadas na presença de HDPSal (amostras da TABELA 2)

*Filme colocado sobre logo da UNIFESP

3.8 Avaliação da atividade microbica dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata produzidas em HDPSal – meta 2e

Para realizar estes testes foram selecionados três microrganismos: *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva), *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e *Candida albicans* (fungo). O teste de suscetibilidade ao antimicrobiano⁷⁶⁻⁷⁷ por disco-difusão foi realizado utilizando os filmes preparados no procedimento da FIGURA 25, recortados em forma de discos, sobre a placa de ágar após a aplicação do inóculo bacteriano. O procedimento realizado está ilustrado na FIGURA 26. Na prática, o teste não fornece um resultado quantitativo, mas sim qualitativo, indicando se a amostra é sensível ou resistente ao microrganismo (FIGURA 27).

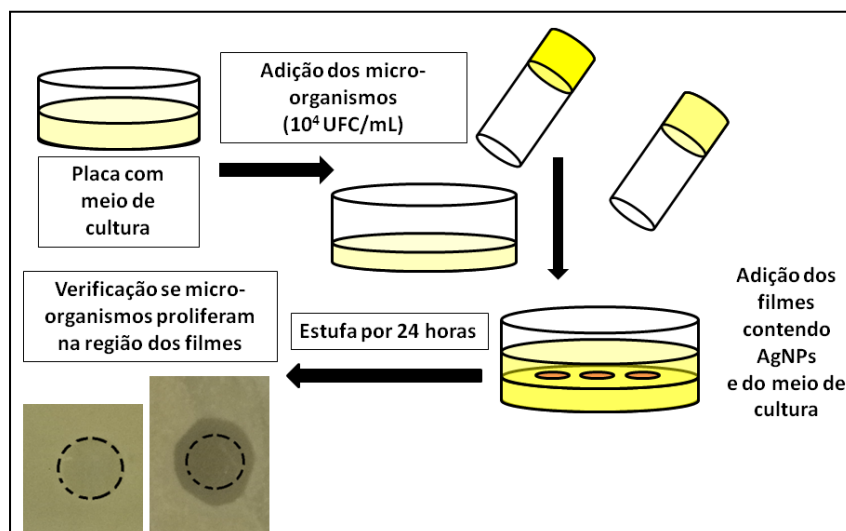


FIGURA 26: Ilustração do teste de disco-difusão em ágar para os filmes de celulose contendo as AgNPs

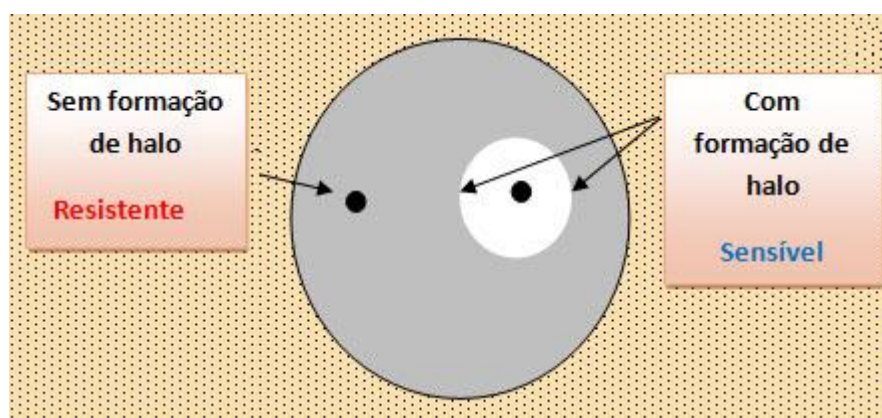


FIGURA 27: Ilustração do resultado do teste de disco-difusão

Para os testes realizados nessa dissertação, primeiramente construiu-se uma suspensão microbiana na concentração aproximada de 0,4 a 0,5 NMP/mL (OD_{600}). Este material foi obtido por meio do método de crescimento direto da colônia por 24 horas, seguindo as condições apresentadas na TABELA 5.

TABELA 5: Condições utilizadas para o preparo dos inóculos microbianos para os testes de disco-difusão

MICROORGANISMOS	MEIO*	INÓCULO	INCUBAÇÃO
<i>Staphylococcus aureus</i>	LB	Método de crescimento ou inóculo direto	35±2°C em estufa aeróbia 20 a 24 h
<i>Escherichia coli</i>	LB	Método de crescimento ou inóculo direto	35±2°C em estufa aeróbia 20 a 24 h
<i>Candida albicans</i>	YMA	Método de crescimento ou inóculo direto	35±2°C em estufa aeróbia 20 a 24 h

*LB = Luria Bertania; YMA = Extrato Malte e Levedura

Com o auxílio de uma alça bacteriológica foram inoculadas 4 colônias com a mesma morfologia em 4 mL de caldo de LB (meio bacteriano) ou YMA (meio fúngico). Foram adicionados 200 µL da suspensão microbiana pela superfície do ágar já solidificado em placa de Petri de poliestireno com 8 cm de diâmetro. Em seguida foi adicionado os filmes de celulose contendo AgNPs produzidas em HDPSal, e preenchidos pelo meio de cultura. Os testes foram feitos em triplicata.

A análise dos resultados foi realizada após 24 horas por observação e mensuração dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco (milímetros).

Esse teste foi realizado em colaboração com Profa. Dra. Suzan Pantaroto Vasconcellos na UNIFESP, campus DIADEMA.

3.9 Técnicas de caracterização

3.9.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Ultrashield 300 MHz da Bruker, localizado na UNIFESP, operando a 300 MHz para RMN de ^1H e 75 MHz para RMN de ^{13}C . Utilizou-se clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano como padrão interno.

3.9.2 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (IV) foram obtidos num espectrômetro IR Prestige-21 da SHIMADZU localizado no Laboratório de Materiais Híbridos (LMH) da UNIFESP. Os espectros foram registrados no modo de transmitância usando acessório de ATR (Refletância total atenuada).

3.9.3 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis (UV-Vis)

Os espectros de absorção eletrônico na região do UV-Vis das amostras foram coletados com o espectrofotômetro USB 4000 OCEAN OPTICS localizado no laboratório de materiais híbridos dentro da UNIFESP. No caso das amostras líquidas utilizou-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico. Os espectros dos filmes foram registrados em modo absorbância colocando os filmes em um aparato apropriado.

3.9.4 Difratometria de Raios-X (DRX)

Os difratogramas foram obtidos no difratômetro D8-Advance DAVINCI da marca BRUKER com anodo de Cu-K α (0,1542 nm), operando em 40 kV e 40 mA localizado na UNIFESP. O filme foi aderido a um substrato de vidro para análise. Todos os difratogramas das amostras foram subtraídos do difratograma do porta-amostra de vidro.

3.9.5 Termogravimetria (TG)

As análises termogravimétricas (TG) foram registradas em um equipamento TGA-60 DUPONT da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, utilizando atmosfera de ar, cápsula de alumina e rampa de aquecimento de 10 °C/min na faixa de temperatura entre 30 e 900 °C.

3.9.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens foram obtidas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JSM-7401F, localizado na central analítica da IQ-USP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação e caracterização das dispersões de nanopartículas de prata em HDPSal (OBJETIVO 1)

Conforme mencionado na introdução dessa dissertação, em 2015, nosso grupo de pesquisa²⁸ publicou um trabalho relatando a preparação de nanopartículas de prata a partir da redução química de nitrato de prata com borohidreto de tetrabutilamônio, utilizando diferentes concentrações do líquido iônico salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal) como agente estabilizante em meio aquoso. A presença do líquido iônico HDPSal potencializou a atividade microbida das dispersões de AgNP frente aos patógenos *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. No presente estudo, essas dispersões de AgNPs contendo HDPSal (item 4.1.1) foram novamente preparadas (item 4.1.2) para serem posteriormente usadas no processo de impregnação nos filmes de celulose. Ensaio para a determinação da concentração mínima inibitória dessas dispersões foram realizados pela primeira vez (item 4.1.3).

4.1.1 Preparação e caracterização do salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal) - meta 1a

O líquido iônico salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal) foi preparado a partir de uma reação de troca iônica do brometo de hexadecilpiridínio (HDPBr) com salicilato de sódio (NaSal), segundo a reação mostrada abaixo (FIGURA 28)²⁸.

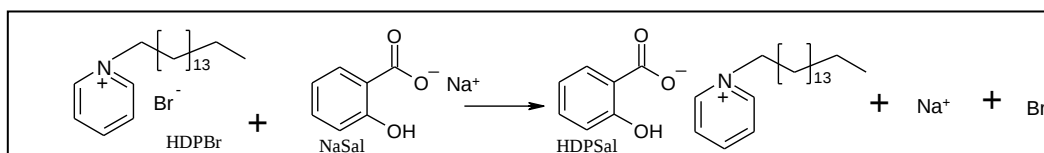


FIGURA 28: Reação de preparação do salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal)

O produto foi obtido como um sólido branco com ponto de fusão ao redor de 63-65 °C (Lit. = 67 °C)⁶⁴ e foi caracterizado espectroscopicamente por IV e RMN de ¹H e ¹³C (ver atribuições no item 3.1) comparando sua estrutura química.

4.1.2 Preparação das dispersões de nanopartículas de prata em HDPSal – meta 1b

Com o HDPSal preparado, seguiu-se na preparação das dispersões de nanopartículas de prata na presença desse líquido iônico, a partir da redução de nitrato de prata com borohidreto de tetrabutilamônio, segundo a reação mostrada a seguir (FIGURA 29). O líquido iônico foi adicionado para atuar como agente estabilizante da prata em escala nanométrica e pelo fato do cátion HDP⁺ ter ação bactericida²⁸, e o ânion salicilato (Sal⁻) anti-inflamatória⁶⁸.

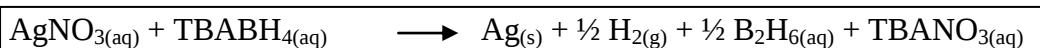


FIGURA 29: Reação de preparação das nanopartículas de prata em salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal)

Foram preparadas 10 dispersões de AgNPs contendo diferentes quantidades de HDPSal e de prata (TABELA 2) e divididas em BLOCOS, exemplificados na TABELA 6. Essas amostras foram denominadas NPAg_xHDP_yAg⁺, onde x é a massa em mg de HDPSal e y é o volume em µL da solução aquosa 10 mM de AgNO₃ adicionados em 10 mL de água destilada. Todos os experimentos foram feitos usando a razão molar de Ag⁺/BH₄⁻ de 1:1.

TABELA 6: Abreviações das amostras das dispersões de AgNPs produzidas em HDPSal e concentrações de HDPSal e prata

BLOCO	Nome da Amostra	Concentração de HDPSal (mg/mL)	Concentração de Ag (µg/mL)
1	NPAg_10HDP_100Ag ⁺	1	10.8
1	NPAg_10HDP_200Ag ⁺	1	21.6
1	NPAg_10HDP_300Ag ⁺	1	32.4
1	NPAg_10HDP_400Ag ⁺	1	43.2
1	NPAg_10HDP_500Ag ⁺	1	54.0
2	NPAg_5HDP_1000Ag ⁺	0.5	108
1 e 2	NPAg_10HDP_1000Ag ⁺	1	108
2	NPAg_50HDP_1000Ag ⁺	5	108
2	NPAg_100HDP_1000Ag ⁺	10	108
2	NPAg_1000HDP_1000Ag ⁺	100	108

As fotos mostradas na FIGURA 30 são das dispersões elencadas na TABELA 6 após 30 minutos de preparo. Como pode ser observado, as amostras preparadas na presença de HDPSal possuem coloração de amarelo claro a laranja, sugerindo a presença de nanopartículas de prata. Foi feita também uma amostra sem a adição de LI, denominada NPAg_0HDP_100Ag⁺, que resultou em uma solução levemente amarela-acinzentada nos primeiros minutos após a preparação, mas logo após 60 minutos foi possível observar formação de um precipitado cinza e a dispersão ficou incolor. Vale ressaltar que a amostra (NPAg_1000HDP_1000Ag⁺) originou um material gelatinoso, diferentemente das demais. Essas amostras foram analisadas em dois BLOCOS. O BLOCO 1 contém as amostras com a mesma concentração de HDPSal e diferentes concentrações de nanopartículas de prata teórica. Pertencem ao BLOCO 1 as amostras: NPAg_10HDP_100Ag⁺, NPAg_10HDP_200Ag⁺, NPAg_10HDP_300Ag⁺, NPAg_10HDP_400Ag⁺, NPAg_10HDP_500Ag⁺, NPAg_10HDP_1000Ag⁺. O BLOCO 2 inclui as dispersões com a mesma concentração de nanopartículas de Ag teórica e diferentes concentrações de HDPSal. Pertencem a esse BLOCO 2 as amostras:

**NPAg_5HDP_1000Ag⁺, NPAg_10HDP_1000Ag⁺, NPAg_50HDP_1000Ag⁺,
NPAg_100HDP_1000Ag⁺, NPAg_1000HDP_1000Ag⁺.**

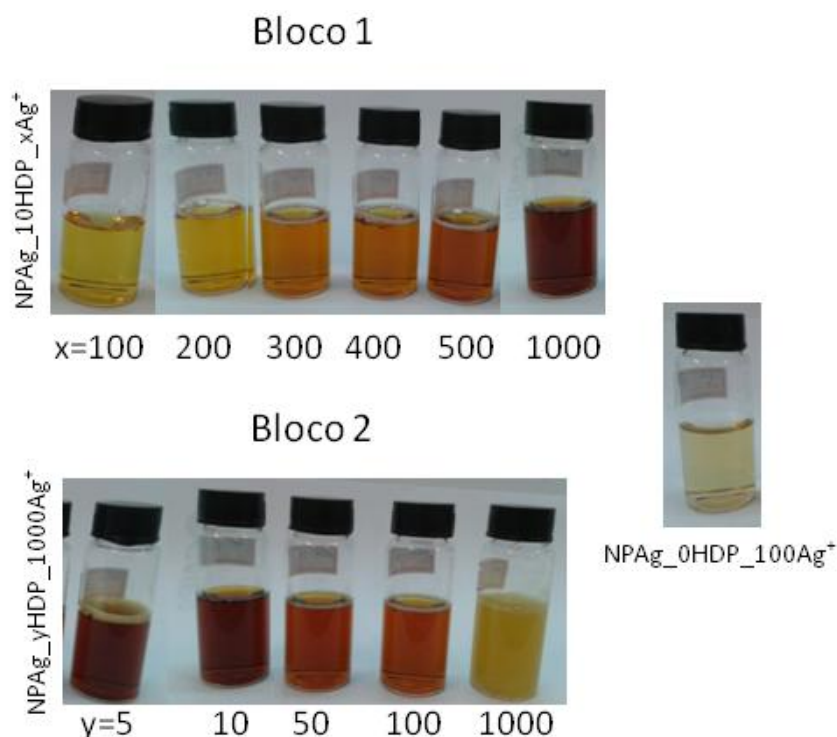


FIGURA 30: Fotos das dispersões de AgNP preparadas na presença HDPSal após 30 minutos de preparo (Amostras da TABELA 2)

Para confirmar a presença das nanopartículas de prata nas dispersões da FIGURA 30 foram registrados os espectros de absorção na região do UV-Vis. Na FIGURA 31 encontram-se os espectros das amostras do BLOCO 1 registrados após 1 hora de preparo. Observa-se a presença de uma banda em aproximadamente 415 nm para todas as amostras do 1º BLOCO. O espectro de uma solução aquosa de HDPSal não apresenta bandas na região do visível. A banda em 415 nm é atribuída a banda SPR (surface plasmon resonance) da prata, quando ela se encontra em escala nanométrica, causada pela oscilação coletiva dos elétrons existentes na superfície das nanopartículas.²⁸ Como pode-se notar, a amostra NPAg_0HDP_100Ag⁺ preparada na ausência de líquido iônico não apresenta a banda na região de 415 nm, indicando ausência de nanopartículas de prata, e que a presença do HDPSal é essencial para a

estabilização das nanopartículas. Todas as amostras permaneceram estáveis por mais de 3 meses. Ainda é possível observar que o máximo de absorbância em 415 nm aumenta à medida que a concentração teórica de Ag^0 aumenta. Portanto, pode-se concluir que as concentrações de nanopartículas de prata nas amostras do bloco 1 seguem a seguinte ordem crescente: **NPAg_10HDP_1000Ag⁺** > **NPAg_10HDP_500Ag⁺** > **NPAg_10HDP_400Ag⁺** > **NPAg_10HDP_300Ag⁺** > **NPAg_10HDP_200Ag⁺** > **NPAg_10HDP_100Ag⁺**.

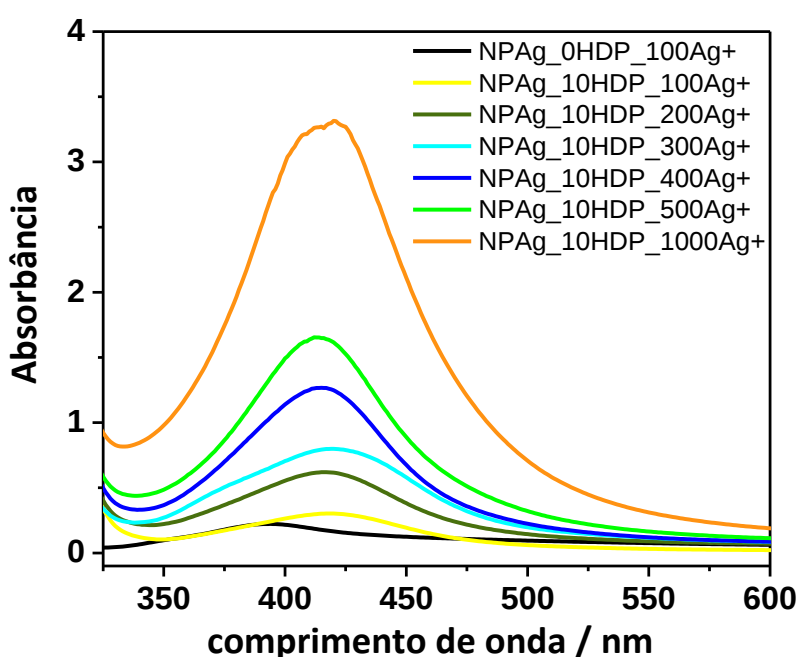


FIGURA 31: Espectros na região do UV-Vis das dispersões de nanopartículas de prata contendo HDPSal do BLOCO 1

Analisando os espectros na região do UV-Vis do BLOCO 2 de amostras (FIGURA 32) nota-se que à medida que a concentração do líquido iônico HDPSal aumenta, a banda de absorção em 415 nm varia de forma distinta do que foi observado para amostras do BLOCO 1. Uma explicação para esse fato é que em altas concentrações de HDPSal (amostras NPAg_50HDP_1000Ag⁺, NPAg_100HDP_1000Ag⁺ e NPAg_1000HDP_1000Ag⁺), as nanopartículas aglomeram e floculam, explicando o decaimento considerável da absorção em 415 nm em

comparação com as amostras NPAg_5HDP_1000Ag⁺ e NPAg_10HDP_1000Ag⁺ após 1 hora de preparo. Dessa forma, embora a concentração sal de prata adicionado nas amostras do BLOCO 2 tenha sido a mesma, as concentrações de nanopartículas de prata não foram, pois parte delas aglomeraram, não permanecendo na dispersão. Pelos valores de máximo de absorbância em 415 nm, pode-se concluir que as concentrações de nanopartículas de prata nas amostras do bloco 2 seguem a seguinte ordem crescente: NPAg_5HDP_1000Ag⁺ > NPAg_10HDP_1000Ag⁺ > NPAg_50HDP_1000Ag⁺ ~ NPAg_100HDP_1000Ag⁺ > NPAg_1000HDP_1000Ag⁺.

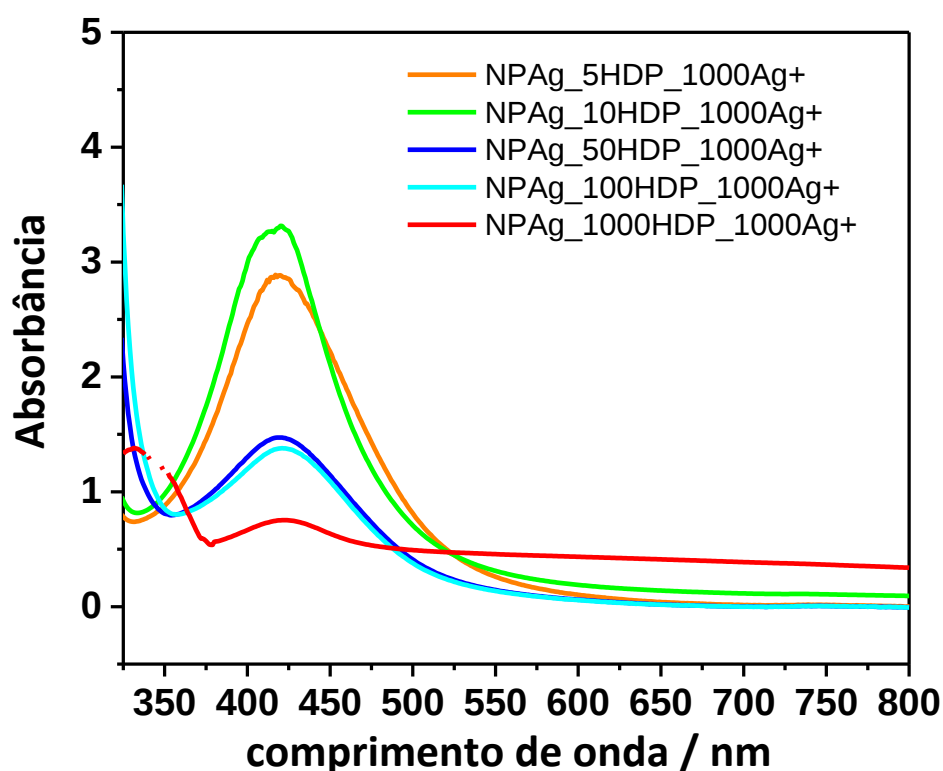


FIGURA 32: Espectros de absorção na região do UV-Vis das dispersões de nanopartículas de prata contendo HDPSal do BLOCO 2

Já que os espectros na região do UV-Vis do BLOCO 1 e 2 são similares a aqueles publicados anteriormente²⁸, podendo-se pressupor que as dispersões de AgNP do BLOCO 1 e 2 foram obtidas com sucesso. Vale mencionar que no trabalho publicado²⁸ as imagens registradas no microscópio eletrônico de transmissão

confirmaram a formação de nanopartículas esféricas com diâmetro ao redor de 10 nm. O potencial Zeta dessas dispersões foi ao redor de +50 mV, indicando que os cátions HDP⁺ estavam rodeando as nanopartículas, prevenindo a sua aglomeração por repulsão eletrostática.²⁸

4.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das dispersões de HDPSal contendo AgNPs – meta 1c

O teste da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) determina a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o desenvolvimento visível do microrganismo. Dessa forma, quanto menor o valor de CIM mais potente é o antimicrobiano. Para os testes de CIM foram feitas diluições seriadas das amostras da TABELA 2, variando-se a concentração de 100% até 0,04875% (ver TABELA 3) e utilizando os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os valores de CIM obtidos experimentalmente são apresentados na TABELA 7 e 8 para *E. coli*, TABELA 9 e 10 para *S. aureus* e TABELA 11 e 12 para *C. albicans*. Decidiu-se apresentar os valores de CIM em termos de HDPSal e prata, pois ambas as espécies podem apresentar efeito microbicida, como mencionado anteriormente.

TABELA 7: Valor de CIM frente ao microrganismo *E. coli* para as amostras do

BLOCO 1

Nome da Amostra	Concentração inicial		Diluição do CIM*	CIM em termos de	
	HDPSal (mg/mL)	Teórica de Ag (µg/mL)		HDPSal (µg/mL)	Ag (µg/mL)
NPAg_10HDP_100Ag ⁺	1	10,8	0,8%	7,8	0,084
NPAg_10HDP_200Ag ⁺	1	21,6	0,8%	7,8	0,169
NPAg_10HDP_300Ag ⁺	1	32,4	0,8%	7,8	0,253
NPAg_10HDP_400Ag ⁺	1	43,2	0,8%	7,8	0,337
NPAg_10HDP_500Ag ⁺	1	54,0	0,8%	7,8	0,436
NPAg_10HDP_1000Ag ⁺	1	108	0,8%	7,8	0,842

* 1ª diluição que a dispersão não apresentou atividade

TABELA 8: Valor de CIM frente ao microrganismo *E. coli* para as amostras do

BLOCO 2

Nome da Amostra	Concentração inicial		Diluição do CIM*	CIM em termos de	
	HDPSal (mg/mL)	Teórica de Ag (µg/mL)		HDPSal (µg/mL)	Ag (µg/mL)
NPAg_5HDP_1000Ag ⁺	0.5	108	1,6%	6,3	1,685
NPAg_10HDP_1000Ag ⁺	1	108	0,8%	7,8	0,842
NPAg_50HDP_1000Ag ⁺	5	108	0,2%	9,75	0,211
NPAg_100HDP_1000Ag ⁺	10	108	0,1%	9,75	0,105

* 1ª diluição que a dispersão não apresentou atividade

TABELA 9: Valor de CIM frente ao microrganismo *S. aureus* para as amostras do

BLOCO 1

Nome da Amostra	Concentração inicial		Diluição do CIM*	CIM em termos de	
	HDPSal (mg/mL)	Teórica de Ag (µg/mL)		HDPSal (µg/mL)	Ag (µg/mL)
NPAg_10HDP_100Ag ⁺	1	10,8	0,4%	3,9	0,042
NPAg_10HDP_200Ag ⁺	1	21,6	0,4%	3,9	0,084
NPAg_10HDP_300Ag ⁺	1	32,4	0,4%	3,9	0,126
NPAg_10HDP_400Ag ⁺	1	43,2	0,4%	3,9	0,168
NPAg_10HDP_500Ag ⁺	1	54,0	0,4%	3,9	0,211
NPAg_10HDP_1000Ag ⁺	1	108	0,4%	3,9	0,421

* 1ª diluição que a dispersão não apresentou atividade

TABELA 10: Valor de CIM frente ao microrganismo *S. aureus* para as amostras do BLOCO 2

Nome da Amostra	Concentração inicial		Diluição do CIM*	CIM em termos de	
	HDPSal (mg/mL)	Teórica de Ag (µg/mL)		HDPSal (µg/mL)	Ag (µg/mL)
NPAg_5HDP_1000Ag ⁺	0.5	108	0,8%	3,9	0,842
NPAg_10HDP_1000Ag ⁺	1	108	0,4%	3,9	0,421
NPAg_50HDP_1000Ag ⁺	5	108	0,1%	4,9	0,105
NPAg_100HDP_1000Ag ⁺	10	108	0,05%	4,9	0,053

* 1ª diluição que a dispersão não apresentou atividade

TABELA 11: Valor de CIM frente ao microrganismo *C. albicans* para as amostras do

BLOCO 1

Nome da Amostra	Concentração inicial		Diluição do CIM*	CIM em termos de	
	HDPSal (mg/mL)	Teórica de Ag (mg/mL)		HDPSal (µg/mL)	Ag (µg/mL)
NPAg_10HDP_100Ag ⁺	1	10,8	0,8%	7,8	0,842
NPAg_10HDP_200Ag ⁺	1	21,6	0,8%	7,8	0,169
NPAg_10HDP_300Ag ⁺	1	32,4	0,8%	7,8	0,253
NPAg_10HDP_400Ag ⁺	1	43,2	0,8%	7,8	0,337
NPAg_10HDP_500Ag ⁺	1	54,0	0,8%	7,8	0,436
NPAg_10HDP_1000Ag ⁺	1	108	0,8%	7,8	0,842

* 1ª diluição que a dispersão não apresentou atividade

TABELA 12: Valor de CIM frente ao microrganismo *C. albicans* para as amostras do

BLOCO 2

Nome da Amostra	Concentração inicial		Diluição do CIM*	CIM em termos de	
	HDPSal (mg/mL)	Teórica de Ag (µg/mL)		HDPSal (µg/mL)	Ag (µg/mL)
NPAg_5HDP_1000Ag ⁺	0.5	108	1,6%	6,3	1,685
NPAg_10HDP_1000Ag ⁺	1	108	0,8%	7,8	0,842
NPAg_50HDP_1000Ag ⁺	5	108	0,2%	9,75	0,211
NPAg_100HDP_1000Ag ⁺	10	108	0,1%	9,75	0,105

* 1ª diluição que a dispersão não apresentou atividade

Na TABELA 7 e 8 são apresentados os valores de CIM para as cepas de *E. coli*. Os valores de CIM em termos de HDPSal para todas as amostras do BLOCO 1 (TABELA 7) são ao redor de 7,8 µg/mL. Em termos de Ag, os valores de CIM variaram de $84,2 \times 10^{-3}$, $168,5 \times 10^{-3}$, $252,6 \times 10^{-3}$, $336,8 \times 10^{-3}$, $436,0 \times 10^{-3}$ e $842,0 \times 10^{-3}$ µg/mL para as amostras NPAg_10HDP_xAg⁺, sendo x=100, 200, 300, 400, 500, 1000, respectivamente. Para as amostras do BLOCO 2 (TABELA 8) os valores de CIM em termos de HDPSal também são similares (6,3 a 9,75 µg/mL). Em termos de Ag, os valores diminuem de 1648×10^{-3} , $842,0 \times 10^{-3}$, $210,6 \times 10^{-3}$ a $105,3 \times 10^{-3}$ µg/mL indo da amostra NPAg_yHDP_1000Ag⁺, y=5, 10, 50 e 100, respectivamente.

Na TABELA 9 e 10 são apresentados os valores de CIM para as cepas de *S. aureus*. Os valores de CIM em termos de HDPSal para todas as amostras do BLOCO 1 (TABELA 9) são ao redor de 3,9 µg/mL. Em termos de Ag, o CIM variou de $42,1 \times 10^{-3}$ µg/mL para a amostra NPAg_10HDP_100Ag⁺ até 421×10^{-3} µg/mL para a amostra NPAg_10HDP_1000Ag⁺. Para as amostras do BLOCO 2 (TABELA 10), os valores de CIM em termos de HDPSal também são similares (3,9 a 4,9 µg/mL) e

diminuem de $842,4 \times 10^{-3}$, 421×10^{-3} , $105,3 \times 10^{-3}$ e $52,7 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ indo da amostra NPAg_yHDP_1000Ag⁺, y=5, 10, 50 e 100, respectivamente.

Na TABELA 11 e 12 são apresentados os valores de CIM para as cepas de *C. albicans*. Os valores de CIM em termos de HPDSal e prata para esse fungo foram similares aos valores apresentados para a bactéria *E. coli*.

As concentrações inibitórias mínimas em termos da concentração de Ag para as amostras do BLOCO 1 (TABELA 7, 9 e 11) aumentam na ordem NPAg_10HDP_xAg⁺, onde x = 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 para todos os microrganismos testados (FIGURA 33). Esse resultado indica que a ação microbicida dessas amostras está sendo governada pelo HDPSal e não pelas nanopartículas de prata presentes nas amostras, já se as AgNPs fossem as espécies responsáveis pela ação microbicida os valores de CIM deveriam seguir a ordem decrescente para as amostras NPAg_10HDP_xAg⁺, onde x = 100, 200, 300, 400, 500 e 1000. Esse dado é corroborado quando se analisa os valores de CIM em termos de Ag para as amostras do BLOCO 2 (FIGURA 34). Para essas amostras (NPAg_yHDP_1000Ag⁺, onde y = 5, 10, 50 e 1000) (TABELA 8, 10 e 12) os valores de CIM diminuem a medida que a concentração de HDPSal aumenta.

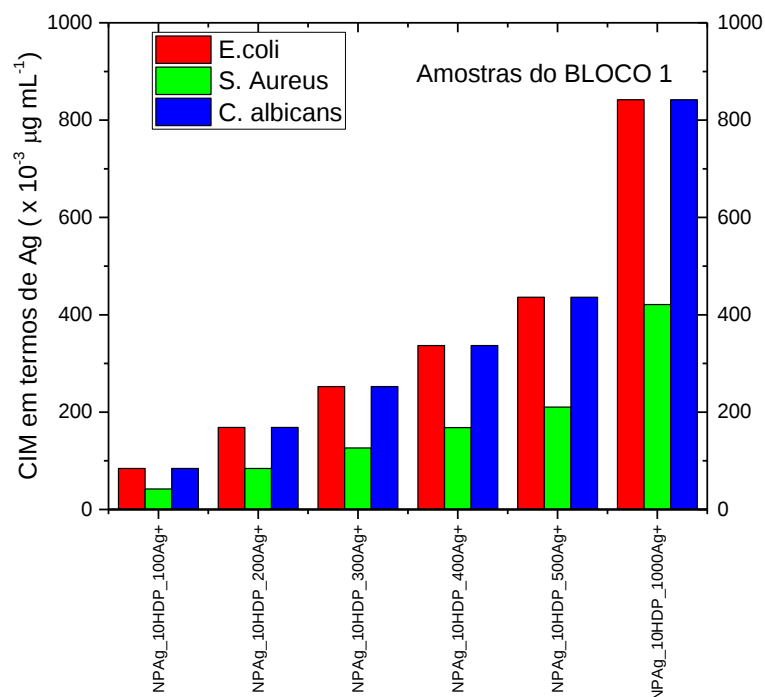


FIGURA 33: Gráfico de CIM em termos de Ag para as amostras do BLOCO 1 para diferentes microrganismos

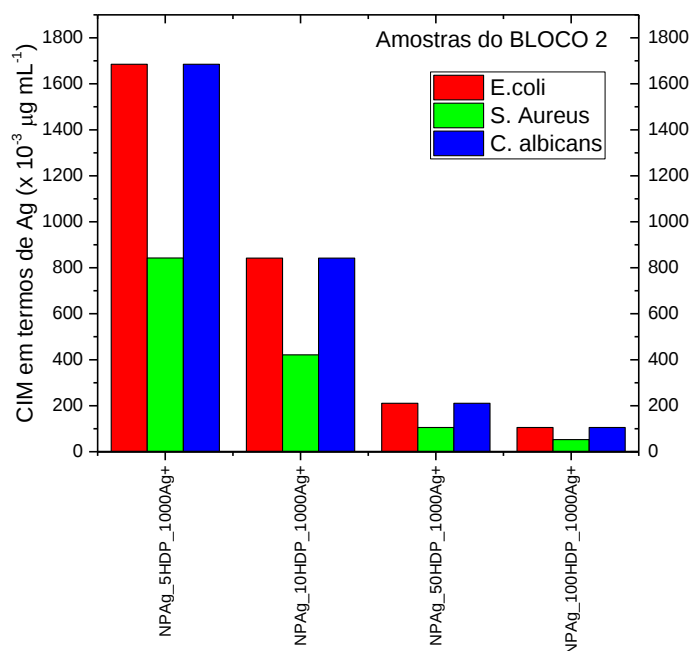


FIGURA 34: Gráfico de CIM em termos de Ag para as amostras do BLOCO 2 para diferentes microrganismos

As concentrações inibitórias mínimas em termos da concentração de HDPSal para as amostras do BLOCO 1 (NPAg_10HDP_xAg⁺, onde x = 100, 200, 300, 400, 500 e 1000) (TABELA 7, 9 e 11) são similares para o mesmo microrganismos (FIGURA 35). Os menores valores de CIM em termos de HDPSal para o microrganismo *S. aureus* indicam que ele é mais sensível a essas amostras. Esse resultado indica que todas essas amostras, ou seja, que apresentam a mesma concentração de HDPSal, apresentam a mesma eficiência microbicida. Os valores de CIM em termos da concentração de HDPSal para as amostras do BLOCO 2 (NPAg_yHDP_1000Ag⁺, onde y = 5, 10, 50 e 1000) (TABELA 8, 10 e 12) (FIGURA 36) também são similares para o mesmo microrganismos em estudo e próximos dos valores obtidos para as amostras do BLOCO 1.

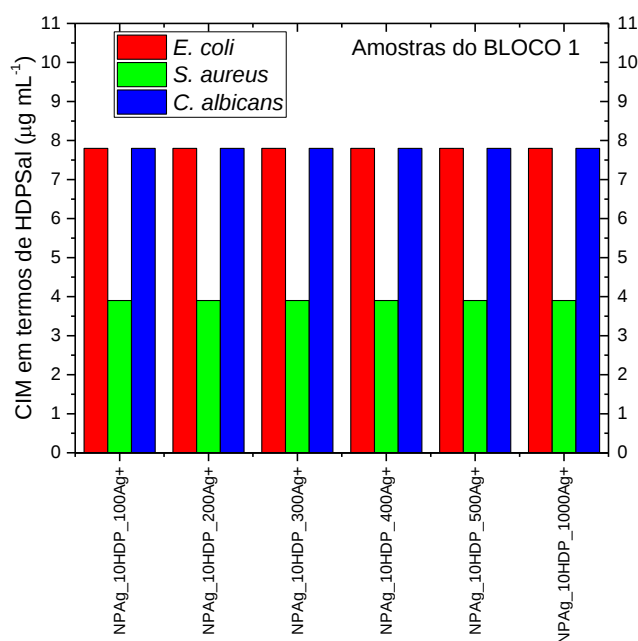


FIGURA 35: Gráfico de CIM em termos de HDPSal para as amostras do BLOCO 1 para diferentes microrganismos

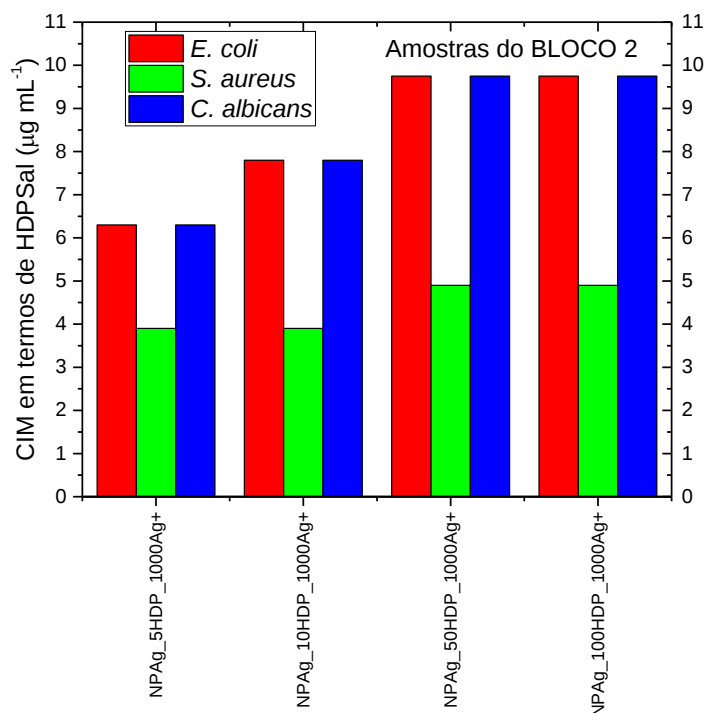


FIGURA 36: Gráfico de CIM em termos de HDPSal para as amostras do BLOCO 2 para diferentes microrganismos

Esses resultados indicam que a ação microbicida dessas amostras está sendo realmente conduzida pelo HDPSal. Uma explicação para esse fato é que as nanopartículas de prata produzidas em meio aquoso contendo HDPSal, estão sendo rodeadas pelo cátion HDP^+ (FIGURA 37) que apresenta ação microbicida já estabelecida.²⁸ Os valores de CIM em termos de HDPSal para os microrganismos *E. coli* e *C. albicans* é de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ e de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*.

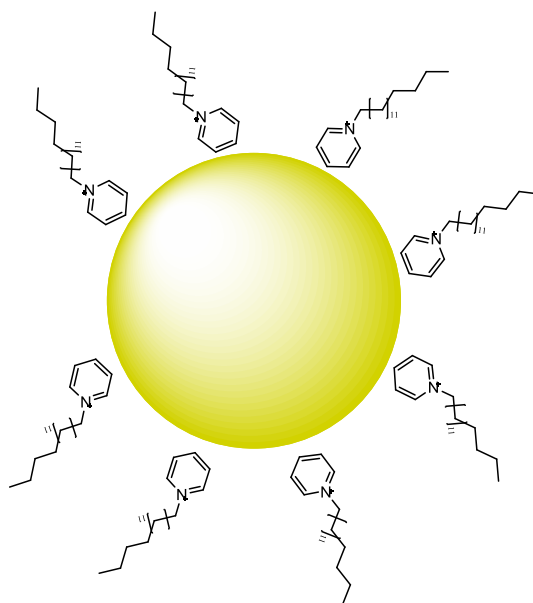


FIGURA 37: Ilustração que mostra a interação de uma nanopartícula de prata com HDP^+

4.2 Preparação de filmes de celulose não modificada contendo as nanopartículas de prata produzidas em meio de líquido iônico. (OBJETIVO 2)

De acordo com o que foi descrito na introdução deste trabalho, a imobilização de nanopartículas de prata em substratos sólidos, como em filmes celulose, contorna alguns problemas que seu uso em dispersão acarreta, como dificuldade de separação e recuperação do meio reacional e tendência de agregação das nanopartículas. Sendo assim, com o intuito de se produzir filmes de celulose não modificada com alta concentração de AgNPs, nessa dissertação foram sintetizados os líquidos iônicos BMImCl e BMImOAc (itens 4.2.1 e 4.2.2) que foram utilizados para solubilizar a celulose. Um filme de celulose sem nanopartículas de prata foi preparado para comparação (item 4.2.3). Em seguida, as AgNPs produzidas em HDPSal foram impregnadas nos filmes (item 4.2.4), os quais tiveram a sua atividade microbicida avaliada em testes de disco-difusão (item 4.2.5).

4.2.1 Preparação e caracterização do BMImCl

O líquido iônico cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImCl) foi obtido a partir da reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) do 1-clorobutano com o 1-metilimidazol (FIGURA 38)⁶⁹. O produto foi obtido como um sólido branco, com uma estreita faixa de ponto de fusão de 60-64 °C (Lit. = 65 °C)⁶⁴, indicando alto grau de pureza do produto.

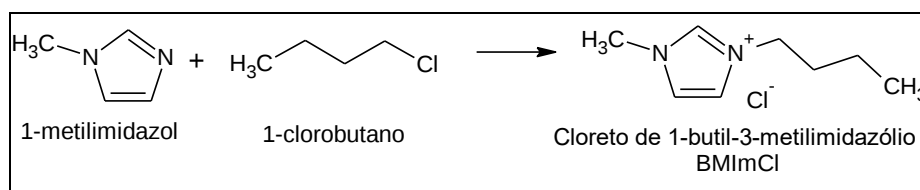


FIGURA 38: Reação de preparação do BMImCl

O BMImCl foi caracterizado por espectroscopia no IV e RMN de ^1H e ^{13}C , comprovando sua estrutura química (ver atribuições no item 3.4).

4.2.2 Preparação e caracterização do BMImOAc

O líquido iônico acetato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImOAc) foi preparado em 3 etapas, conforme mostrado na FIGURA 39.⁶⁶ A primeira foi a preparação do BMImBr, obtido de forma similar ao BMImCl, exceto pelo uso de 1-bromobutano no lugar de 1-clorobutano. A seguir, foi efetuada uma reação de troca iônica dos íons brometos por hidroxilas, utilizando uma resina de troca iônica. O acompanhamento da troca dos íons brometos por hidroxilas foi feito pela adição de uma solução aquosa de nitrato de prata, acrescida de ácido nítrico. A terceira etapa foi uma reação ácido-base entre o BMImOH e ácido acético. O produto foi obtido como um líquido incolor e viscoso.

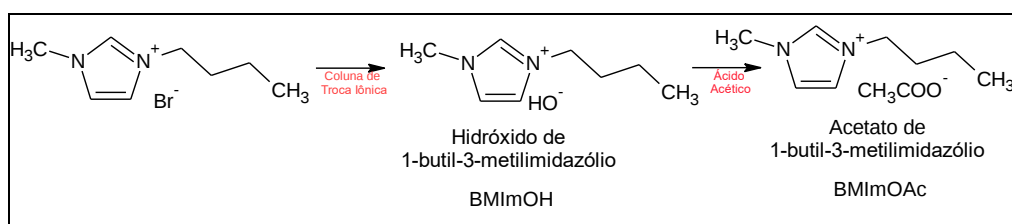


FIGURA 39: Reação de preparação do BMImOAc

O BMImOAc foi caracterizado por espectroscopia no IV e RMN de ^1H e ^{13}C , comprovando sua estrutura química (ver atribuições no item 3.5).

4.2.3 Solubilização da celulose em BMImCl e BMImOAc e obtenção de um filme de celulose (meta 2c)

Primeiramente, solubilizou-se 2,5%, 5%, 10% e 15% em massa de celulose em BMImCl com aquecimento constante a 70°C com agitação por 24 horas. Embora a solubilização tenha ocorrido em todos os casos, as dispersões contendo 10 e 15% ficaram muito viscosas, dificultando o espalhamento da dispersão para a formação dos filmes. Também, solubilizou-se 2,5 e 5% em massa de celulose em BMImOAc, utilizando as mesmas condições empregadas para o BMImCl. A solubilização da celulose em BMImCl ou BMImOAc foi atribuída à penetração dos ânions cloreto ou acetato na estrutura da celulose, que estabelecem interações íon-dipolo com os grupos hidroxilas da celulose, enfraquecendo as ligações de hidrogênio intercadeias.⁶⁶

Embora BMImOAc tenha solubilizado eficientemente o biopolímero, o processo de regeneração da celulose pelo acréscimo de água não levou a formação de filmes resistentes, portanto o uso desse líquido iônico foi descartado.

A preparação de um filme de celulose foi feita usando a dispersão contendo 2,5% em massa de celulose em BMImCl, pois era a de menor viscosidade e, portanto, facilitava o espalhamento da dispersão. Uma quantidade conhecida dessa dispersão foi adicionada em uma placa de Petri e então ela foi distribuída uniformemente com o auxílio de um spin-coater. A seguir, água foi adicionada nessa dispersão. Imediatamente

após a adição de água, observa-se a formação de um filme, devido ao fato da celulose não ser solúvel nesse solvente⁷⁰. Então, o filme foi lavado exaustivamente com água a fim de remover todo o líquido iônico, e seco a temperatura ambiente. Esse filme foi denominado Celulose (CEL). É interessante mencionar que quando o filme está úmido ou tem a presença de líquido iônico ele é frágil e quebradiço, entretanto quando está seco e sem resíduos de líquido iônico ele é visualmente transparente e resistente ao manuseio, como mostrado na FIGURA 40.

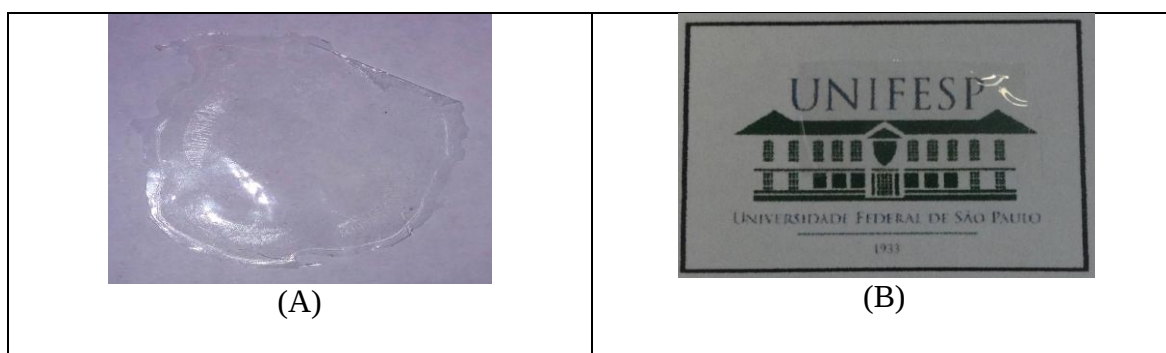


FIGURA 40: Filme de celulose logo após regeneração (A) e após secagem (B).

O filme de celulose (CEL) foi caracterizado por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV), termogravimetria (TG), difratometria de Raios-X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

No espectro de absorção na região do IV do filme de celulose (linha preta da FIGURA 41) nota-se uma banda ao redor de 3360 cm^{-1} devido ao estiramento das ligações O-H, e em 2890 , 1440 e 1370 cm^{-1} bandas referentes ao estiramento e deformação angular das ligações C-H. Em 1645 cm^{-1} , encontrou-se uma banda referente à deformação angular dos grupos hidroxilas tanto da celulose, quanto da água residual presente nos filmes. Ao redor de 1070 e 1160 cm^{-1} nota-se uma banda larga que corresponde ao estiramento das ligações C-O-C presentes na celulose. A banda aproximada em 1160 cm^{-1} é referente à deformação C-H no plano. Finalmente, a banda em 890 cm^{-1} é referente à deformação angular C-H das unidades β 1-4 glicosídicas entre

as unidades de glicose que compõem o biopolímero. Nota-se ainda que o espectro da celulose microcristalina (CMC) (linha vermelha da FIGURA 41) é similar ao do filme CEL, indicando que o processo de solubilização da celulose em BMImCl não alterou a estrutura primária da celulose.⁷¹

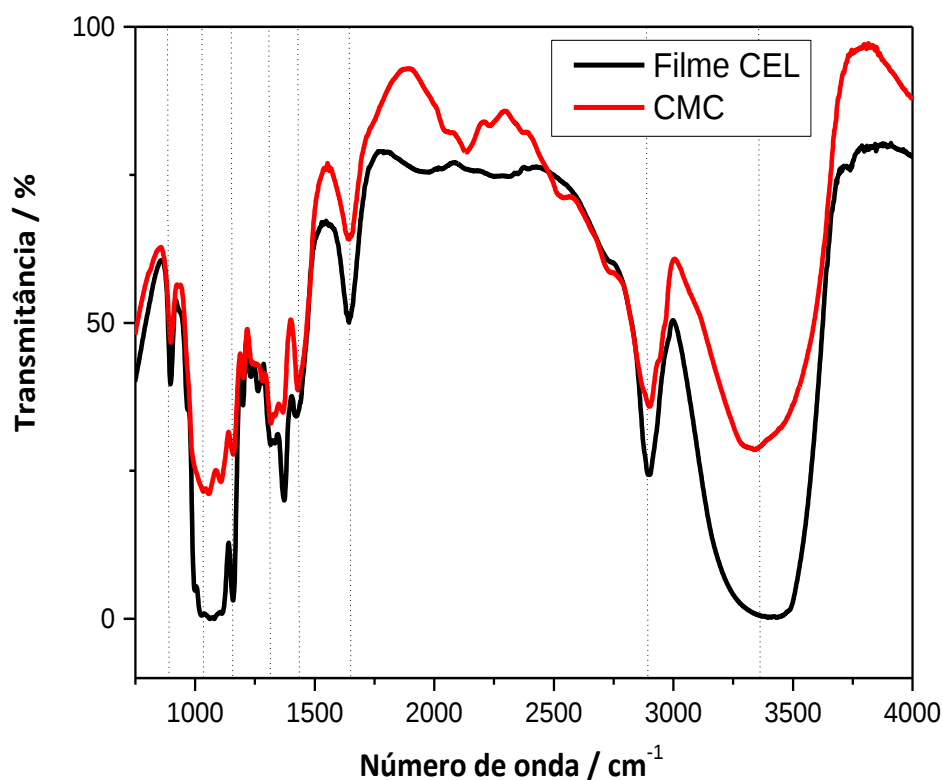


FIGURA 41: Espectro vibracional na região do infravermelho do filme de celulose

Foram registradas imagens em um microscópio eletrônico de varredura (FIGURA 42) tanto da celulose microcristalina (CMC), quanto do filme de CEL em diferentes magnificações. É possível observar nas imagens da celulose microcristalina (Imagens A e B em vermelho) a presença de fibras entrelaçadas de diversos tamanhos. No filme de celulose (Imagens A e B em preto), as imagens são totalmente diferentes, não sendo observadas partículas. Observa-se apenas uma superfície lisa, regular e

homogênea, compatível com o processo de dissolução e regeneração da celulose na forma de filme ⁷².

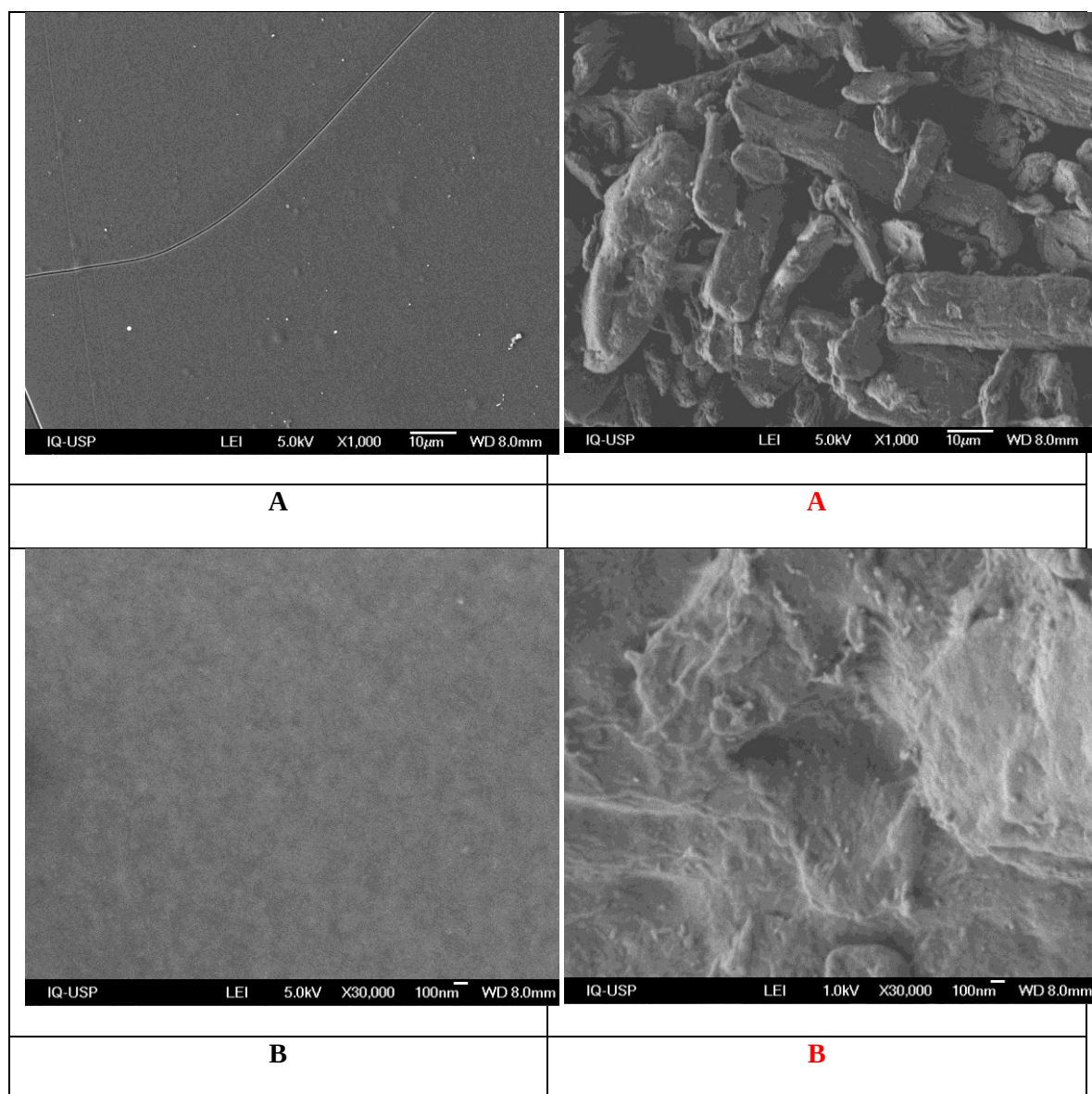


FIGURA 42: Imagens registradas em microscópio eletrônico de varredura da celulose microcristalina (CMC) (Imagens A e B em vermelho) e do filme de CEL (Imagens A e B em preto)

No difratograma de raios X (DRX) da celulose microcristalina (linha vermelha da FIGURA 43) observa-se um pico ao redor de $2\theta = 22^\circ$ de maior intensidade e outro ao redor de $2\theta = 15^\circ$. Considerando o pico em $2\theta = 22^\circ$, pode-se ver que no filme de celulose (linha preto da FIGURA 43) ocorre uma diminuição de intensidade e

alargamento deste pico, devido à diminuição da cristalinidade da celulose nesse filme. O mesmo comportamento pode ser observado no pico $2\theta = 15^\circ$, que está ausente no filme de celulose. Esse fato deve-se a quebra das ligações de hidrogênio da celulose microcristalina (CMC) quando dissolvida em BMImCl e regenerada na forma de filme. Essas mudanças foram atribuídas à conversão da celulose do tipo I para a celulose do tipo II, que apresenta menor organização estrutural⁷². O grau de cristalinidade da celulose microcristalina no material em estudo foi calculado e é de 91 %⁷².

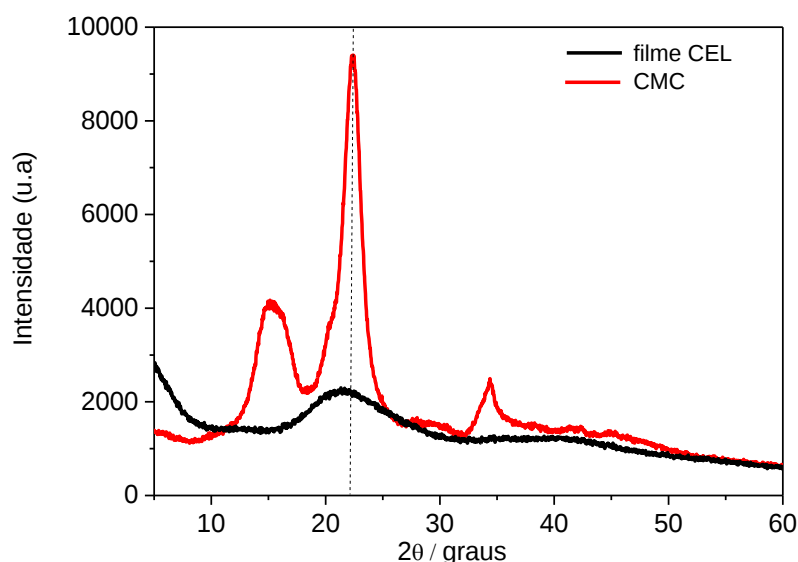


FIGURA 43: Difratograma de raios-X do filme de celulose (CEL) e da CMC

A estabilidade térmica do filme de celulose foi avaliada no ensaio de termogravimetria. No gráfico de perda de massa em função de temperatura (FIGURA 44: curva cheia) e a sua primeira derivada (FIGURA 44: curva pontilhada) nota-se um primeiro evento de perda de massa ao redor de 100-150 °C, referente à perda de água adsorvida, que corresponde a 4% em massa, e dois eventos consecutivos com picos na 1ª derivada em 280 e 520 °C, referentes à decomposição total da celulose. O filme apresenta uma temperatura inicial de degradação ao redor de 260 °C.

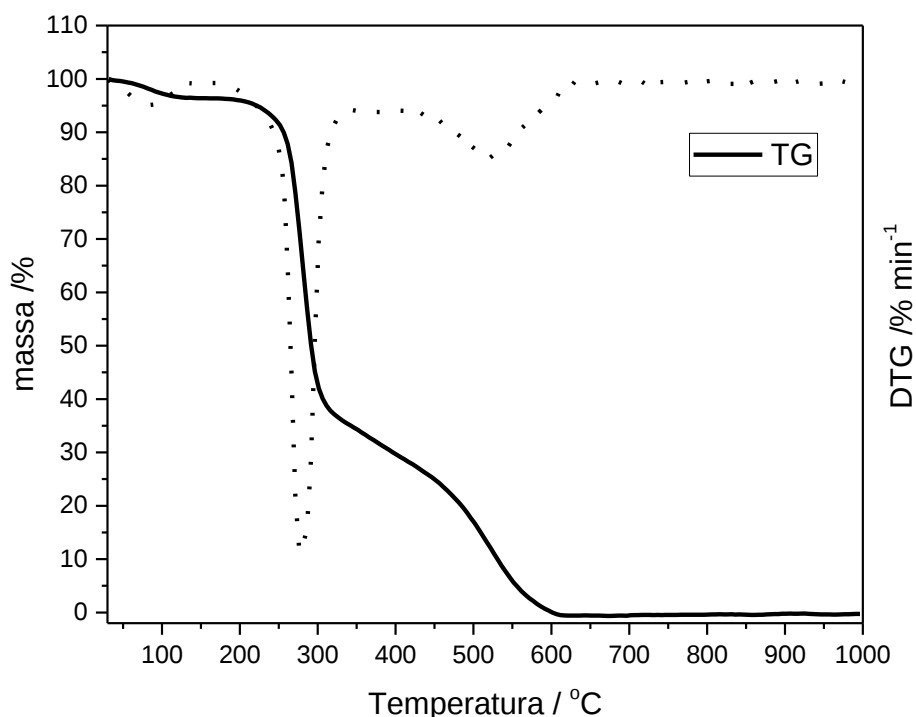


FIGURA 44: Análise termogravimétrica do filme de celulose

4.2.4 Preparação dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata preparadas em HDPSal

Para a preparação dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata preparadas em HDPSal, primeiramente sintetizou-se os filmes de celulose utilizando 5,0g da solução 2,5% em massa de celulose em BMImCl. Nas placas de Petri, já com esses filmes de celulose regenerados e lavados excessivamente com água para eliminar qualquer resíduo de líquido iônico, foram adicionados 5,0 mL das dispersões NP_{Ag}-xHDP-yAg⁺ listadas na TABELA 2. Não foi utilizada a amostra NP_{Ag}-1000HDP-1000Ag⁺, pois ela era um gel. O filme e a dispersão permaneceram em contato e em repouso por 72 horas. A seguir, os filmes foram lavados com água e deixados à temperatura ambiente por cinco dias, e depois armazenados em um dessecador a vácuo com pentóxido de fósforo para remoção de vestígio de água. Para

comparação foi preparado um filme de celulose que foi deixado em contato com 5,0 mL de uma solução contendo 1 mg/mL de HDPSal. Esse filme foi denominado CEL_10HDP_0Ag⁺.

Na FIGURA 45 são apresentados os filmes de celulose preparados com as dispersões de nanopartículas de prata produzidas em HDPSal. Os filmes CEL_10HDP_100Ag⁺, CEL_10HDP_200Ag⁺, CEL_10HDP_300Ag⁺, CEL_10HDP_400Ag⁺, CEL_10HDP_500Ag⁺ e CEL_10HDP_1000Ag⁺ foram preparados com as dispersões de AgNPs contendo a mesma quantidade de HDPSal, variando a concentração de AgNPs. Essas amostras fazem parte do BLOCO 1. Já os filmes CEL_5HDP_1000Ag⁺, CEL_10HDP_1000Ag⁺, CEL_50HDP_1000Ag⁺ e CEL_100HDP_1000Ag⁺ foram preparados com as dispersões contendo a mesma concentração teórica AgNPs, porém com diferentes quantidades de HDPSal. Essas amostras fazem parte do BLOCO 2. Após a secagem, alguns filmes apresentaram a coloração amarelada característica da presença das nanopartículas de prata.

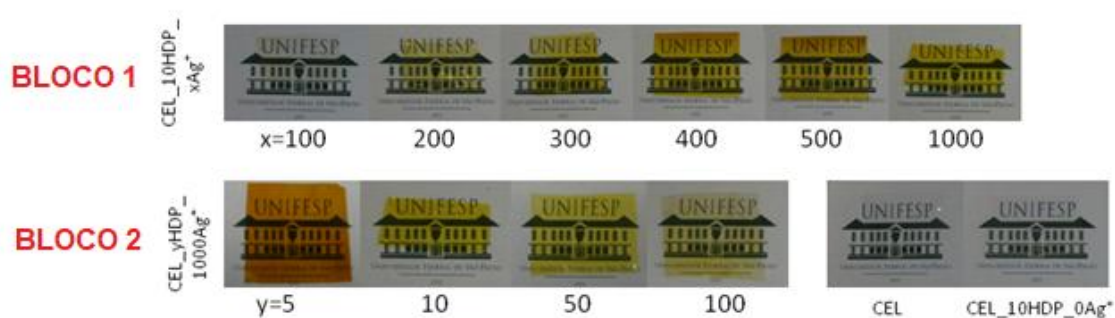


FIGURA 45: Fotos dos filmes de celulose que foram impregnados com as dispersões de nanopartículas de prata contendo HDPSal (TABELA 2)

Vale ressaltar que decidiu-se deixar as dispersões de AgNPs em contato com os filmes de celulose por 72 horas, pois primeiramente realizou-se um experimento para

avaliar o tempo necessário para haver a máxima impregnação das nanopartículas de prata. Nesse experimento, manteve-se a dispersão NP_{Ag_10HDP_100Ag⁺} em contato com um filme de celulose e retiraram-se alíquotas da dispersão após 12, 18, 36, 48, 62, 72 e 80 horas de seu contato com o filme e analisou-as por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis (FIGURA 46). Pode-se notar que a intensidade da banda SPR das AgNPs ao redor de 405 nm diminui acentuadamente até 36 horas de impregnação. A seguir, plotou-se o valor da absorbância em 405 nm versus a quantidade de horas de impregnação (inset da FIGURA 46). Com esse gráfico, pode-se notar que após aproximadamente 36 horas a taxa de impregnação fica praticamente constante (círculo vermelho no inset da FIGURA 46). Dessa forma, o tempo mínimo seria de 36 horas. Por medida de precaução decidiu-se dobrar o tempo de impregnação, ou seja, utilizar 72 horas.

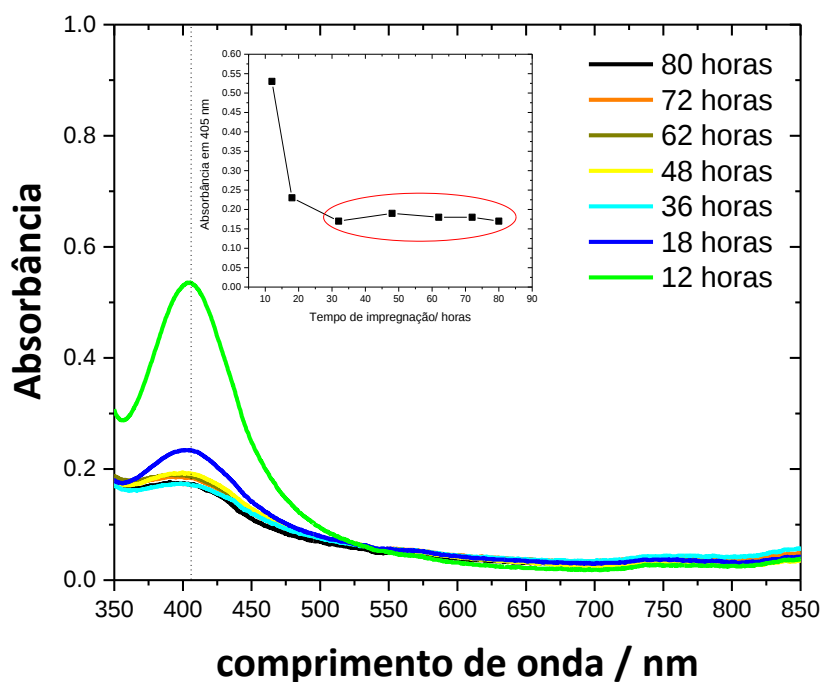


FIGURA 46: Espectros de absorvância na região do UV-Vis da dispersão NPAg_10HDP_100Ag⁺ em contato com um filme de celulose após 12, 18, 36, 48, 62, 72, 80 horas de impregnação

Na FIGURA 47 encontram-se os espectros de absorção na região do UV-Vis de todas as amostras do BLOCO 1 (FIGURA 45). Nota-se que os filmes de celulose e CEL_10HDP_0Ag⁺ (espectros em preto e magenta) não apresentam bandas entre 400 nm a 900 nm, coerente com o fato desses filmes serem completamente incolores. Entretanto, nota-se que ambos apresentaram bandas na região entre 220 nm a 350 nm devido às transições eletrônicas dos cromóforos presentes na celulose (OH; C-O-C) e no HDPSal (aromático, C=O, OH).²⁸

Na amostra CEL_10HDP_100Ag⁺ observa-se o surgimento de uma banda entre 350 e 500 nm, atribuída a banda SPR da prata em escala nanométrica. As amostras CEL_10HDP_200Ag⁺, CEL_10HDP_300Ag⁺, CEL_10HDP_400Ag⁺ e CEL_10HDP_500Ag⁺ apresentam bandas bem definidas ao redor de 425 nm, que

indicam a presença de nanopartículas de prata. Nota-se que a intensidade dessa banda aumenta na seguinte ordem $CEL_10HDP_xAg^+$, sendo $x=100, 200, 300, 400$ e 500 , indicando um aumento da concentração de AgNPs nesses filmes nessa ordem. Essa ordem crescente da concentração de AgNPs foi a mesma que a identificada nas dispersões utilizadas ($NPAg_10HDP_1000Ag^+ > NPAg_10HDP_500Ag^+ > NPAg_10HDP_400Ag^+ > NPAg_10HDP_300Ag^+ \sim NPAg_10HDP_200Ag^+ > NPAg_10HDP_100Ag^+$).

Devido à elevada concentração de AgNPs no filme $CEL_10HDP_1000Ag^+$, esse espectro atingiu o máximo de absorbância detectável na região do visível pelo equipamento, não apresentando a banda SPR completamente definida. Observando os espectros da FIGURA 47 na região entre 220 e 350 nm, nota-se um aumento da absorbância nessa região na seguinte ordem $CEL_10HDP_xAg^+$, sendo $x=100, 200, 300, 400, 500$ e 1000 , o que indica um aumento da concentração de HDPSal nesses filmes também nessa ordem. Vale ressaltar que as dispersões de AgNPs utilizadas no preparo desses filmes do BLOCO 1 possuíam a mesma concentração de HDPSal, portanto esse aumento da concentração de HDPSal que segue a mesma ordem da quantidade de AgNPs no filme, sugere que o líquido iônico, que estabiliza as nanopartículas de prata, conforme mencionado anteriormente, foi incorporado juntamente com as AgNPs. Sendo assim, quanto maior a concentração de AgNPs no filme maior a concentração de HDPSal.

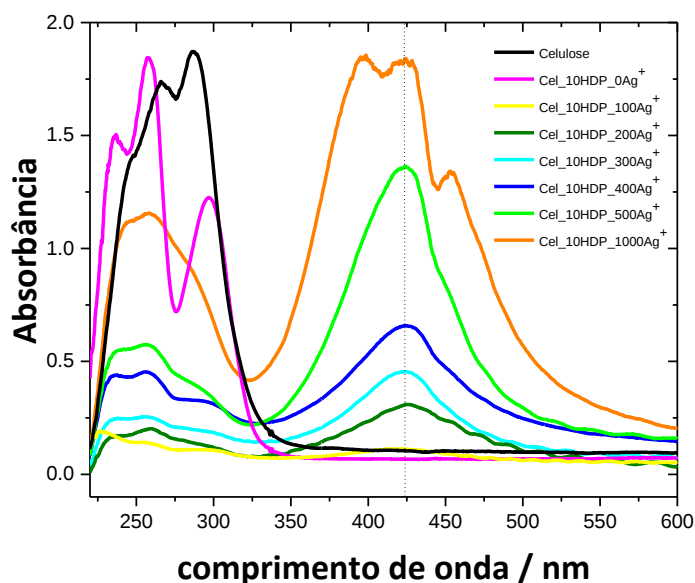


FIGURA 47: Espectros de absorção na região do UV-Vis dos filmes do BLOCO 1 denominados: CEL, CEL_10HDP_0Ag⁺, CEL_10HDP_100Ag⁺, CEL_10HDP_200Ag⁺, CEL_10HDP_300Ag⁺, CEL_10HDP_400Ag⁺, CEL_10HDP_500Ag⁺ e CEL_10HDP_1000Ag⁺

Na FIGURA 48 encontram-se os espectros na região do UV-Vis de todos os filmes de celulose do BLOCO 2. As amostras CEL_50HDP_1000Ag⁺ e CEL_100HDP_1000Ag⁺ apresentam bandas bem definidas ao redor de 425 nm, que indicam a presença de nanopartículas de prata. Devido à elevada concentração de AgNPs nos filmes CEL_10HDP_1000Ag⁺ e CEL_5HDP_1000Ag⁺ os espectros atingiram o máximo de absorbância detectável na região do visível pelo equipamento. Nota-se ainda que a intensidade da banda SPR da prata diminui de intensidade na seguinte ordem CEL_yHDP_1000Ag⁺, sendo y=5, 10, 50, 100, indicando um decréscimo da concentração de AgNPs nessa ordem nos filmes. Vale ressaltar que as dispersões utilizadas no preparo desses filmes do BLOCO 2 contêm a seguinte ordem crescente de concentração de AgNP: **NPAg_5HDP_1000Ag⁺ ~ NPAg_10HDP_1000Ag⁺ > NPAg_50HDP_1000Ag⁺ ~ NPAg_100HDP_1000Ag⁺ > NPAg_1000HDP_1000Ag⁺**, portanto pode-se inferir que o aumento da concentração de

HDPSal nas dispersões diminui a concentração de AgNPs no filme. Uma proposição para explicar esse fato é que o aumento da concentração de HDPSal aumenta a viscosidade da dispersão, o que dificulta o processo de impregnação das AgNPs no filme de celulose. Da mesma forma que foi observado para as amostras do BLOCO 1, quanto maior a concentração de AgNPs, maior a concentração de HDPSal no filme (ver região entre 220-350 nm).

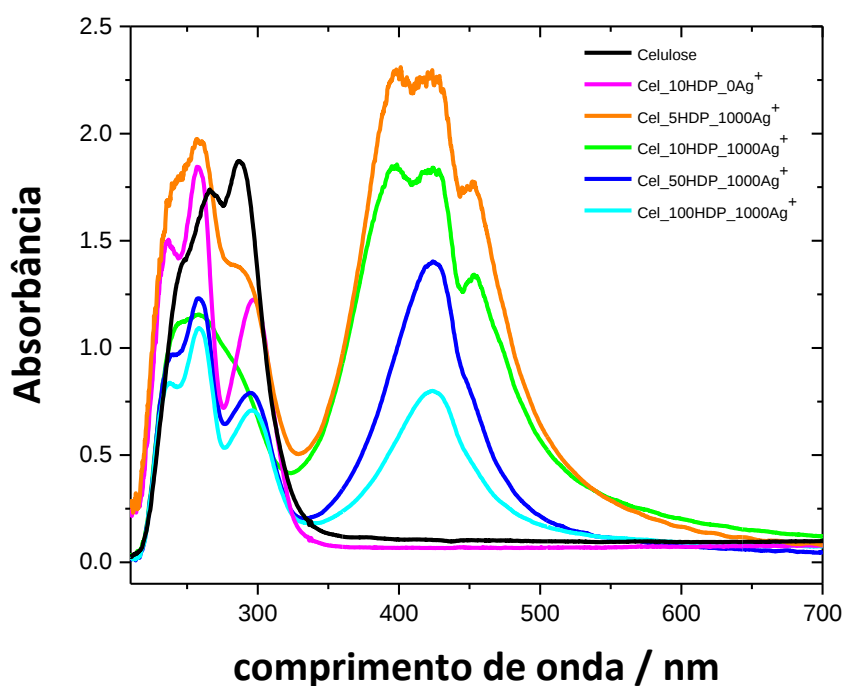


FIGURA 48: Espectros de absorção na região do UV-Vis dos filmes do BLOCO 2 denominados CEL, CEL_10HDP_0Ag⁺, CEL_5HDP_1000Ag⁺, CEL_10HDP_1000Ag⁺, CEL_50HDP_1000Ag⁺ e CEL_100HDP_1000Ag⁺.

Os espectros vibracionais na região do IV dos filmes de celulose do BLOCO 1 e 2 encontram-se nas FIGURAS 49 e 50.

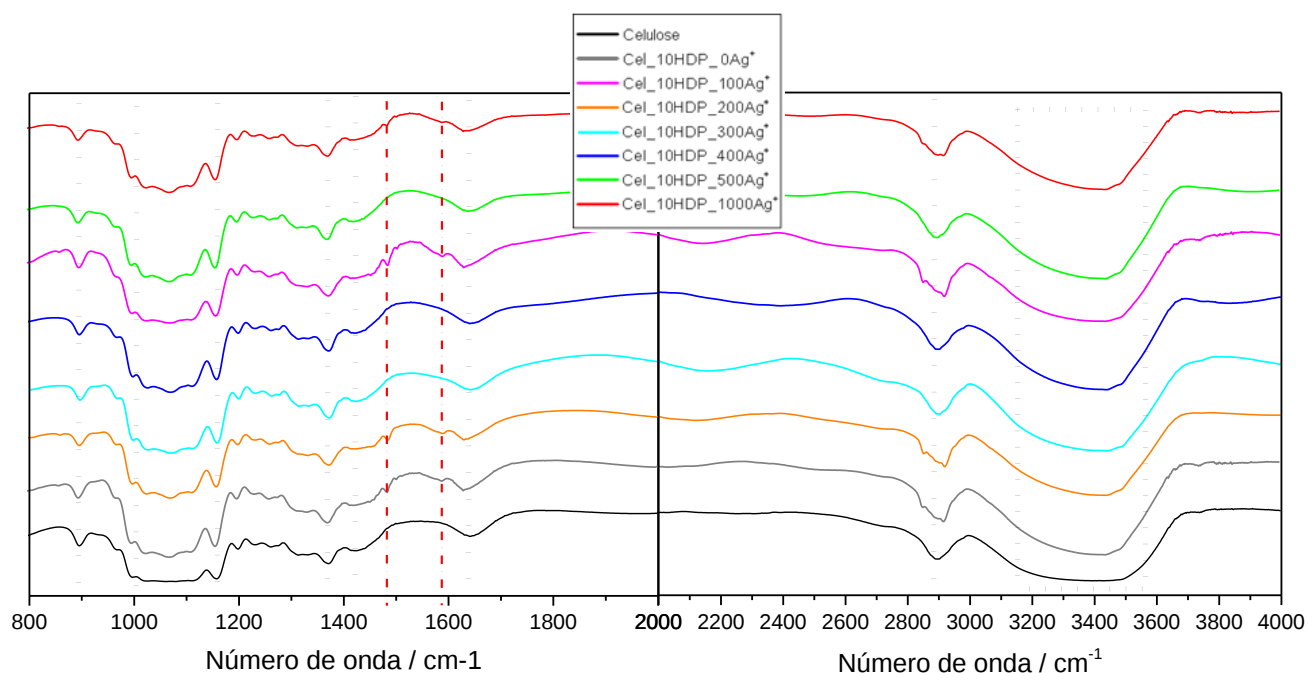


FIGURA 49: Espectros vibracionais na região do infravermelho dos filmes do BLOCO 1 denominados: Celulose, Cel_10HDP_0Ag⁺, Cel_10HDP_100Ag⁺, Cel_10HDP_200Ag⁺, Cel_10HDP_300Ag⁺, Cel_10HDP_400Ag⁺, Cel_10HDP_500Ag⁺ e Cel_10HDP_1000Ag⁺

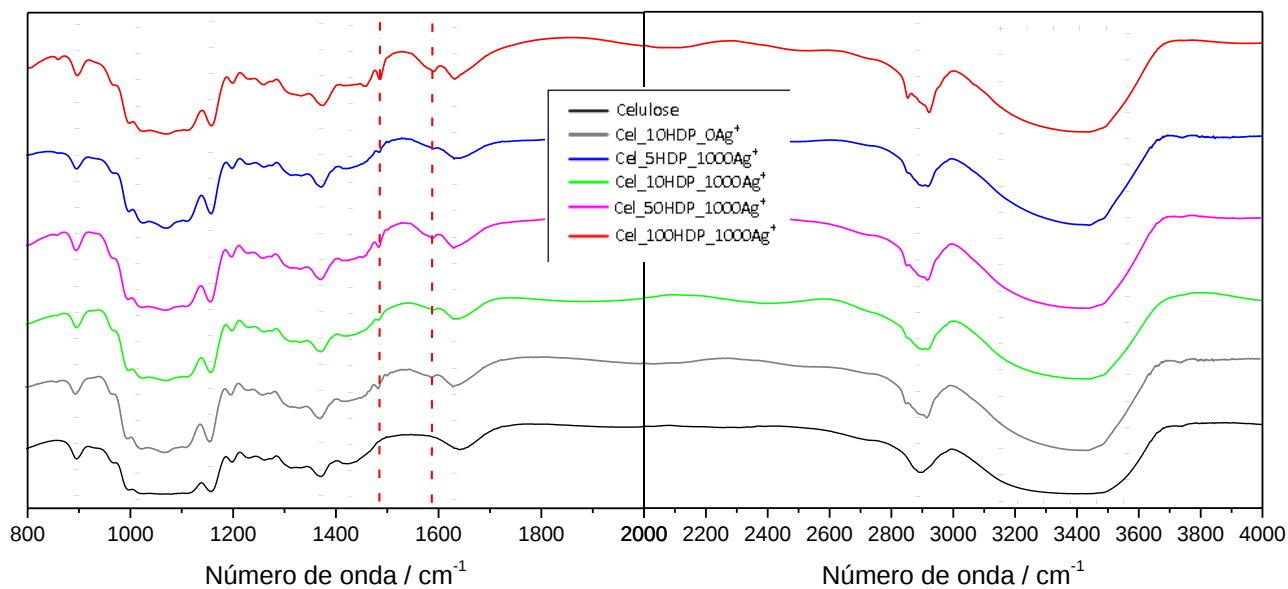


FIGURA 50: Espectros vibracionais na região do infravermelho dos filmes do BLOCO 2 denominados Celulose, Cel_10HDP_0Ag⁺, Cel_5HDP_1000Ag⁺, Cel_10HDP_1000Ag⁺, Cel_50HDP_1000Ag⁺ e Cel_100HDP_1000Ag⁺

Os espectros dos filmes de celulose do BLOCO 1 (FIGURA 45 - CEL_10HDP_xAg⁺ (x=100, 200, 300, 400, 500 e 1000)) são bem similares ao espectro do filme de celulose puro (linha preta da FIGURA 49), contendo as principais bandas mencionadas anteriormente (destacadas aqui com linhas pontilhadas pretas), indicando que a celulose manteve sua estrutura primária durante o processo de impregnação das AgNPs. Adicionalmente, nas amostras CEL_10HDP_100Ag⁺ e CEL_10HDP_200Ag⁺ nota-se o aparecimento de uma banda ao redor de 1470 cm⁻¹, atribuída a deformação angular das ligações C-H dos grupos metilenos do cátion HDP⁺²⁸ e outra em 1590 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação C=O do ânion salicilato²⁸ (destacadas em linhas pontilhadas vermelhas), indicando portanto que além da impregnação de nanopartículas de prata ocorreu a impregnação do sal HDPSal nesses filmes. Esse fato é coerente com os dados de UV-Vis discutidos anteriormente.

Nos espectros no IV dos filmes de celulose do BLOCO 2 (FIGURA 50) nota-se que, além das bandas de celulose, bandas em 1470 e 1590 cm⁻¹ referentes ao HDPSal, estão presentes, indicando que além das AgNPs, o sal HDPSal também foi impregnanado. Comparando o espectro no IV do filme de celulose com aqueles contendo AgNPs tanto do BLOCO 1 como do BLOCO 2, nota-se uma alteração na banda da celulose referente ao estiramento O-H, sugerindo formação de ligações de hidrogênio desses grupos funcionais com o HDPSal. As possíveis interações da celulose com os íons salicilato e HDP⁺ são mostradas na FIGURA 51.

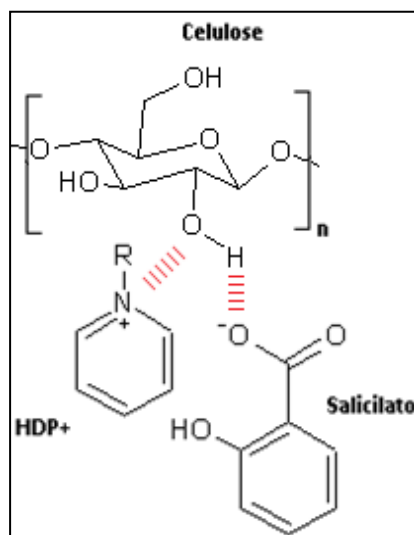


FIGURA 51: Interações via ligação de hidrogênio entre a celulose com os íons salicilato e HDP⁺.

Levando-se em conta que as amostras CEL_10HDP_1000Ag⁺ e CEL_5HDP_1000Ag⁺ são as que apresentam maior concentração de nanopartículas de prata do BLOCO 2 e 1 respectivamente, eles foram adicionalmente caracterizados por DRX.

Nos difratogramas de raios X dos filmes CEL_5HDP_1000Ag⁺ e CEL_10HDP_1000Ag⁺ (linha vermelha e azul, respectivamente, da FIGURA 52) observa-se um halo amplo e de baixa intensidade ao redor de $2\theta = 22^\circ$ característico da celulose do tipo II (linha preta da FIGURA 52). Além disso, observa-se um pico ao redor de $2\theta = 38^\circ$ que corresponde ao plano de reflexão (111) da prata cúbica de face centrada⁷³.

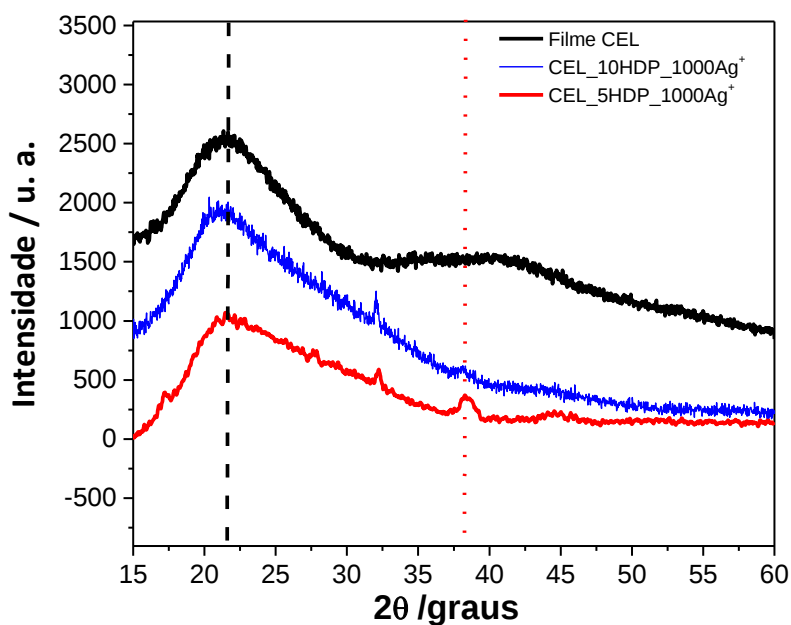


FIGURA 52: Difratoogramas de raios X do filme de CEL e dos filmes CEL_5HDP_1000Ag⁺ e CEL_10HDP_1000Ag⁺

Foram também registradas imagens no microscópio eletrônico de varredura dos filmes CEL_10HDP_1000Ag⁺ e CEL_5HDP_1000Ag⁺ em diferentes magnificações (FIGURA 53).

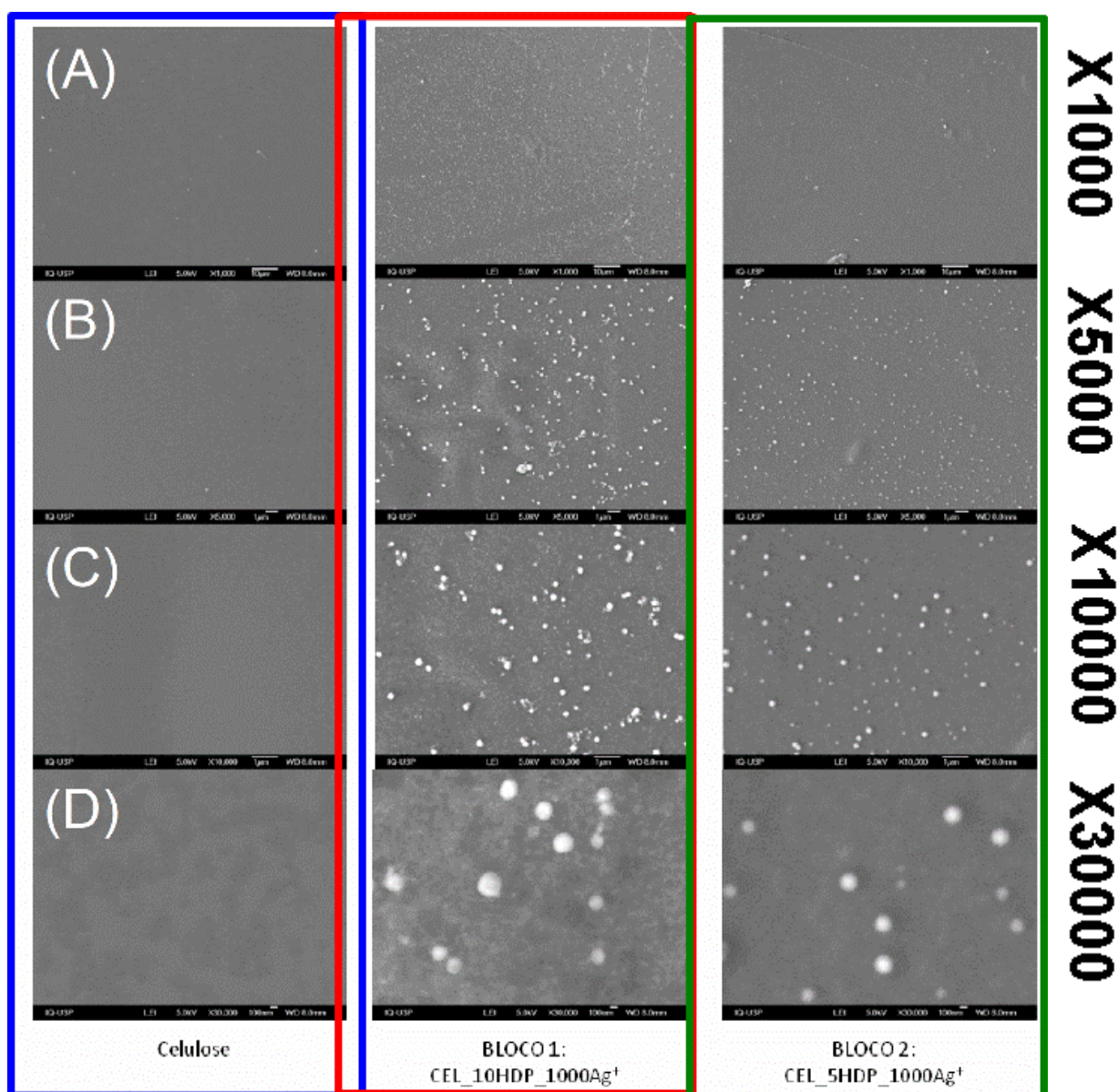


FIGURA 53: Imagens registradas em microscópio eletrônico de varredura de um filme de celulose (azul) e dos filmes CEL_10HDP_1000Ag⁺ (vermelho) e CEL_5HDP_1000Ag⁺ (verde) com diferentes magnitudes

Nas imagens do filme de celulose obtidas (FIGURA 53 - A, B, C e D em azul) não se verificou a presença de fibras, que foram observadas na celulose microcristalina, e notou-se que a superfície é lisa e altamente homogênea. Já nos filmes de CEL_10HDP_1000Ag⁺ e CEL_5HDP_1000Ag⁺ (FIGURA 53 - A, B, C e D em vermelho e verde) nota-se a presença de esferas mais claras, atribuídas a prata, com tamanho ao redor de 100 nm ou menor, que estavam distribuídas homogeneamente ao

longo de todo o filme de celulose. Esse fato indica que o processo de impregnação das dispersões de AgNP em HDPSal foi eficiente.

4.2.5 Avaliação da atividade microbica dos filmes de celulose contendo nanopartículas de Ag produzidas em HDPSal (meta 2e)

Todos os filmes de celulose do BLOCO 1 e 2 (FIGURA 35) tiveram suas atividades microbicas avaliadas pelo teste de disco-difusão utilizando os microrganismos *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva), *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e *Candida albicans* (fungo). Foi verificado, após 24 horas de contato dos filmes com os microrganismos, a formação de halos de inibição do crescimento microbiano nas placas de cultivo em incubação e as imagens são mostradas nas FIGURAS 54, 55 e 56. Como controle negativo foi utilizado o filme Cel_10HDP_0Ag⁺.

E. coli (10⁴ NMP/mL)

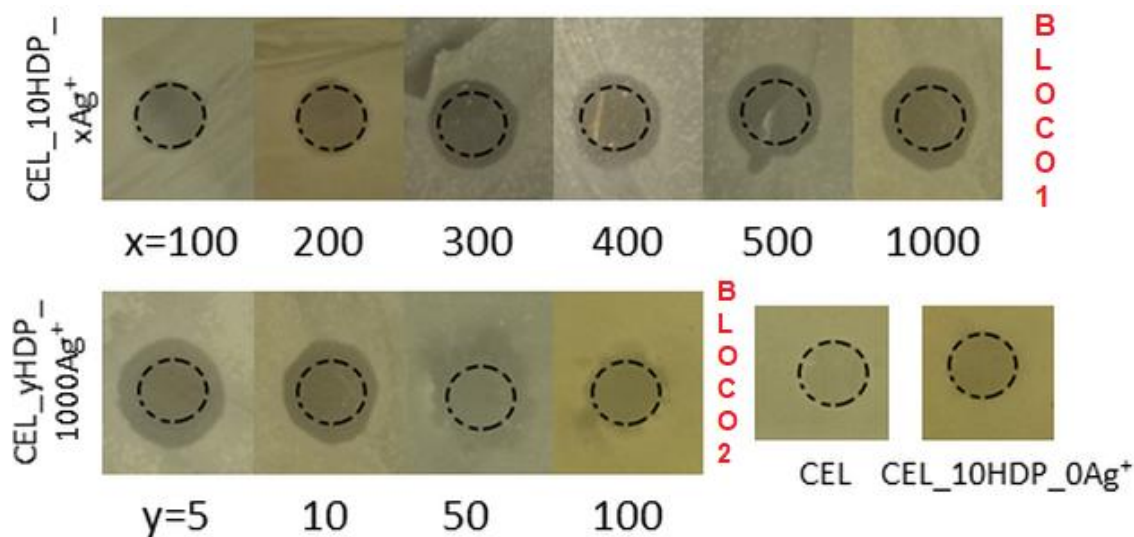


FIGURA 54: Resultados dos testes de disco-difusão frente a *E. coli* dos filmes de celulose dos BLOCOS 1 e 2

S. aureus (10^4 NMP/mL)

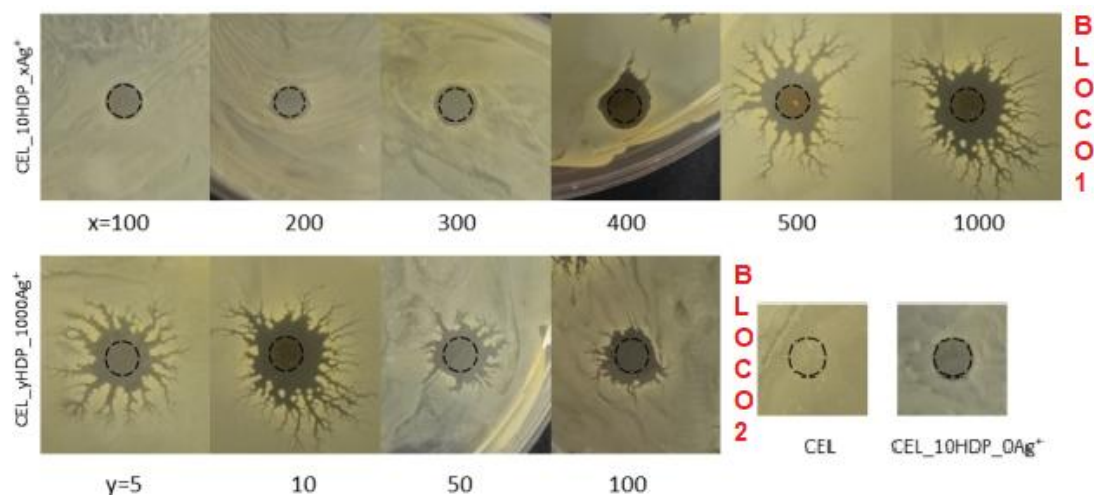


FIGURA 55: Resultados dos testes de disco-difusão frente a *S. aureus* dos filmes dos BLOCOS 1 e 2

C. albicans (10^4 NMP/mL)

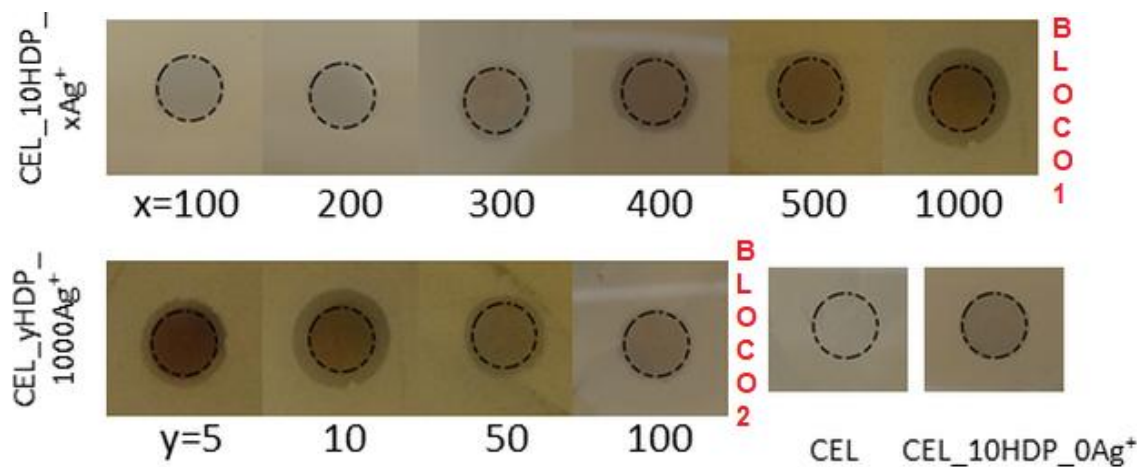


FIGURA 56: Resultados dos testes de disco-difusão frente a *C. albicans* dos filmes dos BLOCOS 1 e 2

Nota-se nos testes apresentados nas FIGURAS 54, 55 e 56 que tanto o filme de celulose como o CEL_10HDP_0Ag⁺, que era constituído apenas por celulose e HDPSal, não apresentaram halo, indicando ausência de atividade microbicida frente a todos os microrganismos testados. Esse fato indicou que a quantidade de HDPSal presente no

filme (comprovado na análise por UV-Vis) não foi suficiente para inibir o crescimento microbiano. Vale ressaltar nos testes de CIM das dispersões (ver item 4.1.3) o HDPSal foi a espécie responsável pelo feito microbicida, provavelmente por ser o componente majoritário das dispersões e rodear as nanopartículas de prata.

Analisando os testes de disco-difusão frente às bactérias *E. coli* (FIGURA 54) e *S. aureus* (FIGURA 55) nota-se a presença de halos em todos os filmes de celulose contendo nanopartículas de prata tanto do BLOCO 1 quanto 2, comprovando que a ação bactericida se dá por conta das nanopartículas impregnadas nos filmes de celulose. Nos ensaios empregando os filmes do BLOCO 1, nota-se que os halos são maiores para os filmes que possuem maiores concentrações de AgNPs. Por exemplo, o filme CEL_10HDP_1000Ag⁺ que possui a maior concentração de AgNPs do BLOCO 1 é o que apresenta o maior halo e portanto maior atividade bactericida. O mesmo comportamento foi observado para os filmes do BLOCO 2. Nota-se que os filmes CEL_5HDP_1000Ag⁺ e CEL_10HDP_1000Ag⁺, que possuem os maiores teores de AgNPs apresentam halos maiores do que os outros desse BLOCO, indicando maior atividade bactericida. Observa-se ainda que os halos obtidos nos ensaios com *S. aureus* são bem maiores que aqueles obtidos para *E. coli*, indicando que os filmes são mais efetivos para inibir o crescimento da bactéria Gran-positiva.

Nos ensaios utilizando o fungo *Candida albicans* (FIGURA 56), notaram-se halos apenas nos filmes com maiores concentrações de nanopartículas de prata, que são os filmes CEL_5HDP_1000Ag⁺ e CEL_10HDP_400Ag⁺, CEL_10HDP_500Ag⁺, CEL_10HDP_1000Ag⁺.

Vale ressaltar que na literatura não existem trabalhos que avaliem a atividade microbicida de filmes de celulose não modificada contendo AgNPs, ainda que o uso da celulose não modificada seja de grande interesse por ser uma matéria-prima de baixo

custo, abundante e de fonte renovável. Os filmes de celulose contendo nanopartículas de prata poderiam ser utilizados como curativos com ação microbicide.

5 CONCLUSÃO

- Dispersões estáveis de nanopartículas de prata foram produzidas com sucesso a partir da redução química de nitrato de prata com TBABH_4 contendo salicilato de hexadecilpiridínio (HDPSal) como agente estabilizante. Essas dispersões contêm nanopartículas de prata esféricas com diâmetro inferior a 10 nm, contendo os cátions HDP^+ ao seu redor.
- As dispersões de AgNPs tiveram sua atividade microbicide avaliada frente a *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Notou-se que a ação microbicide dessas dispersões se deu por conta do HDPSal, ao invés das AgNPs. Os valores de CIM em termos de HDPSal para os microrganismos *E. coli* e *C. albicans* foi de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ e de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*.
- Foram preparados, com sucesso, os líquidos iônicos cloreto e acetato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMImCl) e (BMImOAc). A celulose foi solubilizada tanto em BMImCl como em BMImOAc. Um filme de celulose proveniente da regeneração da dispersão 2,5 % de celulose em BMImCl pela adição de água foi produzido. Ele não apresenta fibras e possui uma superfície lisa e homogênea. O filme apresenta a celulose tipo II.
- Os filmes de celulose contendo nanopartículas de prata sintetizadas em HDPSal foram preparados por um método que envolveu a impregnação das dispersões de AgNPs em filmes de celulose recém-preparados. Os filmes de celulose produzidos com as dispersões de AgNPs contendo a mesma concentração de HDPSal, apresentaram teor de nanopartículas de prata nos filmes proporcional à

concentração de nanopartículas de prata encontradas em suas dispersões. Quando se utilizou as dispersões de AgNPs contendo diferentes concentrações de HDPSal para impregná-las nos filmes de celulose, notou-se que quanto menor a concentração de HDPSal na dispersão maior é o teor de AgNPs impregnado no filme. Foi possível observar que além da impregnação de AgNPs houve a impregnação do líquido iônico HDPSal. Todos os filmes produzidos são amorfos, devido à conversão da celulose tipo I em II durante o processo de solubilização e regeneração. As possíveis interações da celulose com HDPSal ocorrem via ligações de hidrogênio. Nas imagens registradas no microscópio eletrônico de varredura observaram-se AgNPs com diâmetros menores que 100 nm distribuídas homogeneamente ao longo de todo o filme de celulose.

- A atividade microbica e fungicida dos filmes de celulose contendo nanopartículas de prata produzidas em HDPSal foram testadas pelo teste de suscetibilidade por disco-difusão ao antimicrobiano. Observou-se que os filmes contendo AgNPs apresentaram maior ação bactericida do que fungicida. Quanto maior a concentração de nanopartículas de prata nos filmes, maior foi a ação microbica, indicando que essas são as espécies responsáveis pela atividade bactericida ou fungicida.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MURPHY, Catherine. J. et al. Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *The Journal of Physical Chemistry. B*, v. 109, n. 29, p. 13857-13870, 2005.
- [2] RODUNER, Emil. Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, v. 35, n. 7, p. 583-592, 2006.
- [3] CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*, v. 176, n. 1, p. 1-12, 2008.
- [4] KHALIL-ABAD, Mohammad Shateri; YAZDANSHENAS, Mohammad E. Superhydrophobic antibacterial cotton textiles. *Journal of Colloid and Interface science*, v. 351, n. 1, p. 293-298, 2010.
- [5] VOLKMAN, Steven K. et al. Ink-jetted silver/copper conductors for printed RFID applications. *MRS Online Proceedings Library Archive*, v. 814, 2004.
- [6] SONDI, Ivan; SALOPEK-SONDI, Branka. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.
- [7] MARAMBIO-JONES, Catalina; HOEK, Eric MV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, n. 5, p. 1531-1551, 2010.
- [8] ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano*, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2008.
- [9] PRASAD, TNVKV; ELUMALAI, E. K. Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 6, p. 439-442, 2011.

- [10] WANG, Hongshui et al. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 256, n. 2-3, p. 111-115, 2005.
- [11] EL BADAWY, Amro M. et al. The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Science of the Total Environment*, v. 429, p. 325-331, 2012.
- [12] WASSERSCHIED, Peter; WELTON, Thomas (Ed.). *Ionic liquids in synthesis*. John Wiley & Sons, 2008.
- [13] PANDEY, Siddharth. Analytical applications of room-temperature ionic liquids: A review of recent efforts. *Analytica Chimica Acta*, v. 556, n. 1, p. 38-45, 2006.
- [14] SOMERS, Anthony E. et al. A review of ionic liquid lubricants. *Lubricants*, v. 1, n. 1, p. 3-21, 2013.
- [15] KESKIN, Seda et al. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 43, n. 1, p. 150-180, 2007.
- [16] ARMAND, Michel et al. Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. *Nature Materials*, v. 8, n. 8, p. 621, 2009.
- [17] ZHOU, Feng; LIANG, Yongmin; LIU, Weimin. Ionic liquid lubricants: designed chemistry for engineering applications. *Chemical Society Reviews*, v. 38, n. 9, p. 2590-2599, 2009.
- [18] WILKES, John S. Properties of ionic liquid solvents for catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 214, n. 1, p. 11-17, 2004.
- [19] WADE, T. L.; WEGROWE, J.-E. Template synthesis of nanomaterials. *The European Physical Journal Applied Physics*, v. 29, n. 1, p. 3-22, 2005.

- [20] MANOJKUMAR, Kasina; SIVARAMAKRISHNA, Akella; VIJAYAKRISHNA, Kari. A short review on stable metal nanoparticles using ionic liquids, supported ionic liquids, and poly (ionic liquids). *Journal of Nanoparticle Research*, v. 18, n. 4, p. 103, 2016.
- [21] KALVIRI, Hassan A.; KERTON, Francesca M. Synthesis of Pd nanocrystals in phosphonium ionic liquids without any external reducing agents. *Green Chemistry*, v. 13, n. 3, p. 681-686, 2011.
- [22] ZHANG, Chao et al. Ionic liquid-based “all-in-one” synthesis and photoluminescence properties of lanthanide fluorides. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 27, p. 10083-10088, 2008.
- [23] ZHANG, Zhi-Heng et al. The standard molar enthalpy of formation of room temperature ionic liquid EMIES. *Acta Physico-Chimica Sinica*, v. 20, n. 12, p. 1469-1471, 2004.
- [24] CHOI, Sukjeong et al. Fabrication of silver nanoparticles via self-regulated reduction by 1-(2-hydroxyethyl)-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 24, n. 5, p. 856-859, 2007.
- [25] SETUA, Palash et al. Synthesis of silver nanoparticle in imidazolium and pyrrolidinium based ionic liquid reverse micelles: a step forward in nanostructure inorganic material in room temperature ionic liquid field. *Journal of Molecular Liquids*, v. 162, n. 1, p. 33-37, 2011.
- [26] HARADA, Masafumi et al. Influence of the organization of water-in-ionic liquid microemulsions on the size of silver particles during photoreduction. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 406, p. 94-104, 2013.
- [27] LU, Weiwei et al. Ionic liquids–water interfacial preparation of triangular Ag nanoplates and their shape-dependent antibacterial activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 437, p. 35-41, 2015.

- [28] SILVEIRA, Leonardo T. et al. Combined bactericidal activity of silver nanoparticles and hexadecylpyridinium salicylate ionic liquid. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 17, n. 3, p. 129, 2015.
- [29] AN, Jing; WANG, D. S.; YUAN, X. Y. Synthesis of stable silver nanoparticles with antimicrobial activities in roomtemperature ionic liquids. *Chemical Research in Chinese Universities*, v. 25, n. 4, p. 421-425, 2009.
- [30] MORONES, Jose Ruben et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005.
- [31] WANG, Yong; YANG, Hong. Oleic acid as the capping agent in the synthesis of noble metal nanoparticles in imidazolium-based ionic liquids. *Chemical Communications*, n. 24, p. 2545-2547, 2006.
- [32] BHATT, Anand I. et al. Synthesis of Ag and Au nanostructures in an ionic liquid: thermodynamic and kinetic effects underlying nanoparticle, cluster and nanowire formation. *Journal of Materials Chemistry*, v. 17, n. 21, p. 2241-2250, 2007.
- [33] REDEL, Engelbert; THOMANN, Ralf; JANIÁK, Christoph. First correlation of nanoparticle size-dependent formation with the ionic liquid anion molecular volume. *Inorganic chemistry*, v. 47, n. 1, p. 14-16, 2008.
- [34] CORREA, Cintia M.; BIZETO, Marcos A.; CAMILO, Fernanda F. Direct synthesis of silver nanoparticles in ionic liquid. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 18, n. 5, 2016.
- [35] AZIZI SAMIR, My Ahmed Said; ALLOIN, Fannie; DUFRESNE, Alain. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 2, p. 612-626, 2005.
- [36] MOON, Robert J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, v. 40, n. 7, p. 3941-3994, 2011.

- [37] VAN OSCH, Dannie JGP et al. Ionic liquids and deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass fractionation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 19, n. 4, p. 2636-2665, 2017.
- [38] KLEMM, Dieter et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.
- [39] WERTZ, Jean-Luc; OLIVER, Bedue; JEAN, P. Mercier. Swelling and Dissolution of Cellulose, Chapter 4.3: Intracrystalline Swelling. *Cellulose Science and Technology*, p. 161, 2010.
- [40] SWATLOSKI, Richard P. et al. Dissolution of cellose with ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, n. 18, p. 4974-4975, 2002.
- [41] LIU, Zhen et al. Characterization of the regenerated cellulose films in ionic liquids and rheological properties of the solutions. *Materials Chemistry and Physics*, v. 128, n. 1-2, p. 220-227, 2011.
- [42] HE, Junhui; KUNITAKE, Toyoki; NAKAO, Aiko. Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. *Chemistry of Materials*, v. 15, n. 23, p. 4401-4406, 2003.
- [43] FERRARIA, Ana Maria et al. Hybrid systems of silver nanoparticles generated on cellulose surfaces. *Langmuir*, v. 26, n. 3, p. 1996-2001, 2009.
- [44] TAYLOR, P. et al. Impact of heat on nanocrystalline silver dressings: Part I: Chemical and Biological Properties. *Biomaterials*, v. 26, n. 35, p. 7221-7229, 2005.
- [45] BARUD, Hernane S. et al. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. *Materials Science and Engineering: C*, v. 28, n. 4, p. 515-518, 2008.

- [46] DE SANTA MARIA, Luiz Claudio et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles impregnated into bacterial cellulose. *Materials Letters*, v. 63, n. 9-10, p. 797-799, 2009.
- [47] DROGAT, Nicolas et al. Antimicrobial silver nanoparticles generated on cellulose nanocrystals. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 13, n. 4, p. 1557-1562, 2011.
- [48] EL-SHISHTAWY, Reda M. et al. In situ production of silver nanoparticle on cotton fabric and its antimicrobial evaluation. *Cellulose*, v. 18, n. 1, p. 75-82, 2011.
- [49] NELAYAH, Jaysen et al. Mapping surface plasmons on a single metallic nanoparticle. *Nature Physics*, v. 3, n. 5, p. 348, 2007.
- [50] LE, Fei et al. Metallic nanoparticle arrays: a common substrate for both surface-enhanced Raman scattering and surface-enhanced infrared absorption. *ACS nano*, v. 2, n. 4, p. 707-718, 2008.
- [51] COGNET, Laurent et al. Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 20, p. 11350-11355, 2003.
- [52] RAI, Mahendra; YADAV, Alka; GADE, Aniket. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.
- [53] AHAMED, Maqusood; ALSALHI, Mohamad S.; SIDDIQUI, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*, v. 411, n. 23-24, p. 1841-1848, 2010.
- [54] DE MOURA, Marcia R.; MATTOSO, Luiz HC; ZUCOLOTTI, Valtencir. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *Journal of Food Engineering*, v. 109, n. 3, p. 520-524, 2012.

- [55] DOBROVOL'SKAYA, I. P. et al. Structure and characteristics of film composites based on methyl cellulose, poviargol, and montmorillonite. *Polymer Science*, v. 53, n. 2, p. 166-171, 2011.
- [56] SCHEEREN, Carla W. et al. Antimicrobial membrane cellulose acetate containing ionic liquid and metal nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, n. 6, p. 5114-5122, 2011.
- [57] ANDRESEN, Martin et al. Nonleaching antimicrobial films prepared from surface-modified microfibrillated cellulose. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 7, p. 2149-2155, 2007.
- [58] POLSHETTIWAR, Vivek; NADAGOUDA, Mallikarjuna N.; VARMA, Rajender S. Microwave-assisted chemistry: A rapid and sustainable route to synthesis of organics and nanomaterials. *Australian Journal of Chemistry*, v. 62, n. 1, p. 16-26, 2009.
- [59] NECULA, Adina Maria et al. Silver nanoparticles in cellulose acetate polymers: Rheological and morphological properties. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, v. 50, n. 4, p. 639-651, 2011.
- [60] YUNUSOV, Kh E.; SARYMSAKOV, A. A.; RASHIDOVA, S. Sh. Structure and properties of biodegradable carboxymethyl cellulose films containing silver nanoparticles. *Polymer Science*, v. 56, n. 3, p. 283-288, 2014.
- [61] JANKAUSKAITE, Virginija et al. Silicone rubber and microcrystalline cellulose composites with antimicrobial properties. *Materials Science*, v. 20, n. 1, p. 42-49, 2014.
- [62] HE, Junhui; KUNITAKE, Toyoki; NAKAO, Aiko. Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. *Chemistry of Materials*, v. 15, n. 23, p. 4401-4406, 2003.

- [63] MUTHULAKSHMI, L. et al. Experimental investigation of cellulose/Silver nanocomposites using In Situ generation method. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 25, n. 4, p. 1021-1032, 2017.
- [64] HAYNES, William M. (Ed.). *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC press, 2014.
- [65] ZHANG, Hao et al. 1-Allyl-3-methylimidazolium chloride room temperature ionic liquid: a new and powerful nonderivatizing solvent for cellulose. *Macromolecules*, v. 38, n. 20, p. 8272-8277, 2005.
- [66] GIRARD, Anne-Lise et al. Insights on recyclable catalytic system composed of task-specific ionic liquids for the chemical fixation of carbon dioxide. *Green Chemistry*, v. 16, n. 5, p. 2815-2825, 2014.
- [67] XU, Airong; GUO, Xin; XU, Rui. Understanding the dissolution of cellulose in 1-butyl-3-methylimidazolium acetate+ DMAc solvent. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 1000-1004, 2015.
- [68] YIN, Min-Jean; YAMAMOTO, Yumi; GAYNOR, Richard B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature*, v. 396, n. 6706, p. 77, 1998.
- [69] WILKES, John S. et al. Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. *Inorganic Chemistry*, v. 21, n. 3, p. 1263-1264, 1982.
- [70] BURCHARD, Walther. Solubility and solution structure of cellulose derivatives. *Cellulose*, v. 10, n. 3, p. 213-225, 2003.
- [71] ZHOU, Jinping et al. Structure and properties of composite films prepared from cellulose and nanocrystalline titanium dioxide particles. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 101, n. 6, p. 3600-3608, 2006.

[72] LIU, Zhen et al. Characterization of the regenerated cellulose films in ionic liquids and rheological properties of the solutions. *Materials Chemistry and Physics*, v. 128, n. 1-2, p. 220-227, 2011.

[73] PARK, Sunkyu et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for biofuels*, v. 3, n. 1, p. 10, 2010.

[74] COLE, M. D. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays—a critical review. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 22, n. 8, p. 837-856, 1994.

[75] BICALHO, Beatriz et al. Antimicrobial compounds of fungi vectored by *Clusia* spp.(Clusiaceae) pollinating bees. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 58, n. 9-10, p. 746-751, 2003.

[76] VASCONCELLOS, Suzan Pantaroto de et al. Atividades enzimáticas e de biodegradação de microorganismos do petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul). 218 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. 2006.

[77] BENDLE, Julian S. et al. Resistance determinants in strains of *Clostridium difficile* from two geographically distinct populations. *International journal of antimicrobial agents*, v. 24, n. 6, p. 619-621, 2004.