



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
COORDENADORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**Preparação, Caracterização e Aplicação de Filmes Finos de PAH/PAA
com Nanopartículas de Prata no Tratamento Microbiológico de
Efluentes Industriais para Reuso**

Fabiana Zarpelon

Caxias do Sul, 2013

Fabiana Zarpelon

Preparação, Caracterização e Aplicação de Filmes Finos de PAH/PAA
com Nanopartículas de Prata no Tratamento Microbiológico de
Efluentes Industriais para Reuso

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais”, com a orientação do Prof. Dr. Marcelo Giovanela e coorientação da Prof^a. Dr^a. Janaina da Silva Crespo.

Caxias do Sul, 2013.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

Z38p Zarpelon, Fabiana

Preparação, caracterização e aplicação de filmes finos de PAH/PAA com nanopartículas de prata no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso / Fabiana Zarpelon. – 2013.

81 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2013.

“Orientação: Prof. Dr. Marcelo Giovanela”

1. Nanotecnologia. 2. Filmes finos. 3. Ciência dos materiais.
4. Resíduos industriais – Tratamento. I. Título.

CDU 2.ed. : 620.3

Índice para o catálogo sistemático:

1. Nanotecnologia	620.3
2. Filmes finos	620.3
3. Ciência dos materiais	620.1
4. Resíduos industriais – Tratamento	628.54

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Márcia Servi Gonçalves – CRB 10/1500

"Preparação, caracterização e aplicação de filmes finos de PAH/PAA com nanopartículas de prata no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso".

Fabiana Zarpelon

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais, Área de Concentração: Processamento e Simulação de Materiais.

Caxias do Sul, 29 de agosto de 2013.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Marcelo Giovanela (orientador)
Universidade de Caxias do Sul



Prof. Dra. Janaina da Silva Crespo (co-orientadora)
Universidade de Caxias do Sul



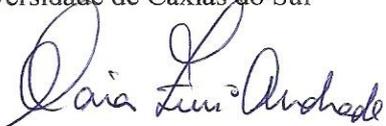
Prof. Dr. Marcelo Barbalho Pereira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dra. Larissa Nardini Carli
Universidade de Caxias do Sul



Prof. Dr. Cesar Aguzzoli
Universidade de Caxias do Sul



Prof. Dra. Mára Zeni Andrade
Universidade de Caxias do Sul

TRABALHOS ACEITOS PARA APRESENTAÇÃO EM CONGRESSOS

Congresso: 13th International Conference on Environmental Science and Technology (CEST), 2013, Atenas.

Título: Thin Films of PAH/PAA Decorated with Silver Nanoparticles as Potential Bactericidal Agents in the Biological Treatment of Industrial Wastewater.

Autores: Fabiana Zarpelon, Deise Galiotto, Larissa N. Carli, Janaina S. Crespo, Marcelo Giovanela.

Forma de apresentação: ORAL

Congresso: 12^o Congresso Brasileiro de Polímeros (12^oCBPol), 2013, Florianópolis.

Título: Filmes Finos de PAH/PAA Decorados com Nanopartículas de Prata como Potencial Agente Bactericida no Tratamento Biológico de Efluentes Industriais.

Autores: Fabiana Zarpelon, Deise Galiotto, Larissa N. Carli, Janaina S. Crespo, Marcelo Giovanela.

Forma de apresentação: PÔSTER

Congresso: XX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, (SBRH), 2013, Bento Gonçalves.

Título: Filmes Finos de PAH/PAA Decorados com Nanopartículas de Prata como Potencial Agente Bactericida no Tratamento Biológico de Efluentes Industriais.

Autores: Fabiana Zarpelon, Deise Galiotto, Larissa N. Carli, Janaina S. Crespo, Marcelo Giovanela.

Forma de apresentação: ORAL/PÔSTER

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Giovanela e à minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Janaina da Silva Crespo pela confiança em mim depositada, bem como pelo apoio, ensinamentos, dedicação, incentivo, disponibilidade e amizade;

Às colegas Ana Cláudia Rangel Faria e Rosiana Boniatti, pela disponibilidade, ensinamentos e amizade;

À colega Nicolle Dal Acqua, por toda ajuda, paciência, amizade e pelas colaborações neste trabalho;

À Deise Galiotto, bolsista de iniciação científica, pela ajuda na preparação dos filmes;

Ao professor Prof. Dr. César Aguzzoli pela ajuda com as análises de RBS e GD-OES, bem como pela disponibilidade em esclarecer essas técnicas;

À Prof^a. Dr^a. Larissa Nardini Carli pelas análises de MET das soluções de AgNPs;

À Prof^a. Dr^a. Giovanna Machado pelas análises de MET dos filmes;

Aos meus colegas de trabalho pela compreensão e pela substituição durante minhas ausências;

Aos meus pais, minha irmã e meu namorado, pela compreensão, apoio, incentivo e pelas contribuições neste trabalho;

Aos demais professores e colegas do Mestrado, e a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

À UCS pelo apoio financeiro.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a
quem se atreve e a vida é "muito" para ser insignificante.”*

(Augusto Branco)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Filmes Finos Nanoestruturados	18
2.2 Técnicas de Preparação de Filmes	18
2.3 Filmes Automontados por <i>Layer-by-Layer</i>	19
2.3.1 A Técnica LbL	19
2.3.2 Tipos de Filmes Automontados e Mecanismo de Adsorção	21
2.3.3 LbL por <i>Dip Coating</i>	22
2.3.4 LbL por <i>Spin Coating</i>	23
2.3.5 LbL por <i>Casting</i>	23
2.4 Polieletrólitos	24
2.4.1 Definição do pH dos Polieletrólitos	25
2.5 Nanopartículas de Prata	27
2.6 Glutaraldeído	29
2.7 Bactérias	30
2.7.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	32
2.7.2 <i>Escherichia coli</i>	33
2.8 Filmes com Nanopartículas no Tratamento de Efluentes	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Materiais	37
3.2 Síntese e Caracterização das AgNPs	37
3.2.1 Síntese das AgNPs	37
3.2.2 UV-Vis das Soluções de AgNPs	37
3.2.3 MET das Soluções de AgNPs	38
3.3 Preparação e Caracterização dos Filmes com AgNPs	38
3.3.1 Limpeza dos Substratos	38
3.3.2 Preparação dos Filmes com AgNPs	38
3.4 Teste de Difusão em Ágar	40
3.5 Caracterização dos Filmes com AgNPs	42
3.5.1 UV-Vis	43

3.5.2 GD-OES	43
3.5.3 RBS	43
3.5.4 MET	43
3.6 Tratamento Microbiológico de Efluente Industrial para Reuso	44
3.6.1 Contagem de Coliformes Totais	44
3.6.2 Utilização dos Filmes com AgNPs no Tratamento de um Efluente Industrial.....	44
3.6.2.1 Quantificação de Prata no Efluente Industrial	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Caracterização das AgNPs	47
4.1.1 UV-Vis	47
4.1.2 MET	48
4.2 Teste de Difusão em Ágar	50
4.3 Caracterização dos Filmes com AgNPs.....	52
4.3.1 UV-Vis	52
4.3.2 GD-OES	55
4.3.3 RBS	58
4.3.4 MET	59
4.4 Tratamento Microbiológico de Efluente Industrial para Reuso	60
4.4.1 Utilização dos Filmes com AgNPs no Tratamento de um Efluente Industrial	60
4.4.1.1 Quantificação de Prata no Efluente Industrial	62
5 CONCLUSÃO	65
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
7 REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Representação esquemática do processo de preparação de um filme pela técnica LbL sobre um substrato sólido. (b) Estrutura idealizada de um filme contendo as duas primeiras camadas de polieletrólitos	20
Figura 2. Representação esquemática do processo de preparação de filmes por <i>dip coating</i> .	22
Figura 3. Representação esquemática do processo de obtenção de filmes por <i>spin coating</i> ...	23
Figura 4. Representação esquemática do processo de obtenção de filmes por <i>casting</i>	23
Figura 5. Fórmulas estruturais dos polieletrólitos PAH e PAA em meio ácido.....	25
Figura 6. Representação das cadeias poliméricas dos polieletrólitos nos diferentes pHs e sua conformação nas multicamadas.....	26
Figura 7: Fórmula estrutural do glutaraldeído.....	29
Figura 8. Estrutura celular de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos.....	31
Figura 9. Micrografia eletrônica de varredura do micro-organismo <i>Staphylococcus aureus</i> .	32
Figura 10. Micrografia eletrônica de varredura do micro-organismo <i>Escherichia coli</i>	33
Figura 11. Fluxograma esquemático da preparação dos filmes	39
Figura 12: Imagem do espalhamento da solução de bactérias sobre o ágar.....	40
Figura 13: Imagem da colocação da lâmina de vidro sobre o ágar	41
Figura 14. Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis das AgNPs em pH = 3,0 e em pH = 6,0	47
Figura 15. Representação das AgNPs estabilizadas por citrato de sódio em: (a) pH = 6,0 e (b) pH = 3,0	48
Figura 16. Imagem de MET das AgNPs em: (a) pH = 3,0 e (b) pH = 6,0.....	49
Figura 17: Imagem do teste de difusão em ágar do filme (PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imerso por 1 h em solução de AgNPs em pH = 6,0 e reticulado com glutaraldeído	50
Figura 18: Imagem do teste de difusão em ágar do filme (PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imerso por 1 h em solução de AgNPs em pH = 3,0 e reticulado com glutaraldeído	51
Figura 19. Resultado do ensaio microbiológico para o filme (PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ com AgNPs em pH = 6,0 e reticulado com glutaraldeído: (a) imersão por 1 h; (b) imersão por 2 h; (c) imersão por 4 h em solução de AgNPs contra <i>E. coli</i> ; (d) imersão por 1 h; (e) imersão por 2 h; (f) imersão por 4 h em solução de AgNPs contra <i>S. aureus</i>	52
Figura 20. Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes (PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído	53

Figura 21. (a) Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes (PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. (b) Detalhe de (a) para melhor visualização dos picos	54
Figura 22. (a) Perfil de concentração de prata dos filmes (PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. (b) Detalhe de (a) para melhor visualização do filme polimérico e das AgNPs	55
Figura 23. (a) Perfil de concentração de prata dos filmes (PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. (b) Detalhe de (a) para melhor visualização do filme polimérico (continua na página seguinte).....	57
Figura 23. (c) Detalhe de (a) para melhor visualização das AgNPs	58
Figura 24. Densidade areal dos filmes (PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ e (PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído	59
Figura 25. Imagem de MET do filme (PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído. O <i>inset</i> ao lado representa o histograma da distribuição de tamanhos das AgNPs no filme analisado.....	60
Figura 26. Influência do tempo de contato dos filmes (PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulados com glutaraldeído, na remoção de coliformes totais do efluente industrial.....	61
Figura 27. Influência do tempo de contato do filme (PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀ , imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído, na remoção de coliformes totais do efluente industrial em uma primeira utilização e na reutilização	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos filmes utilizados nos ensaios microbiológicos	42
Tabela 2: Parâmetros do efluente industrial utilizado no primeiro ensaio do tratamento de efluente industrial para reuso	45
Tabela 3: Parâmetros do efluente industrial utilizado no segundo ensaio do tratamento de efluente industrial para reuso	46
Tabela 4. Concentração de prata no efluente industrial para reuso após o tratamento com o filme (PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	63
Tabela 5. Concentração de prata no efluente industrial para reuso na primeira utilização e na reutilização dos filmes	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

λ : comprimento de onda

°C: graus Celsius

μm : micrometro

μg : micrograma

AgNPs: nanopartículas de prata

CETENE: Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

COO^- : grupo carboxilato

COOH : grupo carboxila

FTO: óxido de estanho dopado com flúor (*fluored tin oxide*)

GA: glutaraldeído

HNO_3 : ácido nítrico

H_3O^+ : íon hidrônio

ITO: óxido de estanho dopado com índio (*indium doped tin oxide*)

K_a : constante de acidez

LB: Langmuir-Blodgett

LbL: *Layer-by-Layer*

log: logaritmo

m: massa

MET: microscopia eletrônica de transmissão

mg: miligrama

mL: mililitro

M_w : massa molar

mm: milímetro

mmol: milimol

NH_2 : grupo amino

NH_3^+ : grupo amino protonado

nm: nanômetro

OH: grupo hidroxila

PAA: poli(ácido acrílico)

PAH: poli(hidrocloreto de alilamina)

PEM: multicamadas de polieletrólitos

pH: potencial hidrogeniônico

pK_a : cologaritmo da constante de acidez

SAMs: automontagem de monocamadas

SO₃H: grupo ácido sulfônico

UV: ultravioleta

Vis: visível

RESUMO

O rápido crescimento da nanotecnologia tem despertado cada vez mais o interesse de diversos pesquisadores pela produção de econanomateriais, visando sua posterior aplicação em temáticas relacionadas às questões ambientais. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo preparar e caracterizar filmes de poli(hidrocloro de alilamina) (PAH) e poli(ácido acrílico) (PAA) com nanopartículas de prata (AgNPs) e reticulados com glutaraldeído, visando o desenvolvimento de um novo material que pudesse ser utilizado como agente bactericida no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso. Após a automontagem, os filmes foram caracterizados por meio de diferentes técnicas instrumentais, incluindo a espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), a espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente (GD-OES), a espectrometria de retroespalhamento Rutherford (RBS) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Testes microbiológicos foram igualmente realizados em ágar nutriente para se avaliar a atividade inibitória dos mesmos frente a micro-organismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativos (*Escherichia coli*). Em geral, a incorporação das nanopartículas nos filmes foi dependente tanto do pH da solução coloidal de prata, como do pH das soluções dos polieletrólitos. Dentre todos os sistemas avaliados, o filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀ imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído, foi aquele que apresentou a maior atividade inibitória, tanto em relação ao *S. aureus* como à *E. coli*. A maior inibição, entretanto, foi observada para a *E. coli* que apresenta uma camada de peptidoglicanos menos espessa do que a *S. aureus*, o que acaba facilitando a migração de prata para o interior das células desses micro-organismos. O tratamento do efluente industrial para reuso com os filmes produzidos neste trabalho, por sua vez, reduziu em cerca de 90% a contagem total de coliformes presentes na amostra inicial, tanto pelo contato como pela lixiviação de prata. Finalmente, considerando-se a facilidade de aplicação, o baixo impacto ambiental, os custos reduzidos e ação inibidora satisfatória, os filmes desenvolvidos neste trabalho apresentam um grande potencial para serem utilizados como auxiliares no tratamento microbiológico de efluentes industriais.

Palavras-chave: nanopartículas de prata (AgNPs), filmes finos, atividade bactericida, tratamento de efluentes.

ABSTRACT

The rapid growth of nanotechnology has attracted increasing interest from many researchers for producing econanomaterials, aiming its subsequent application in thematics related to environmental issues. In this context, the present study aimed to prepare and characterize films of polyallylamine hydrochloride (PAH) and acrylic polyacid (PAA) with silver nanoparticles (AgNPs) and cross-linked with glutaraldehyde, aiming to develop a new material that could be used as bactericidal agent in microbiological treatment of industrial wastewater for reuse. After the self-assembling, the films were characterized by means of different instrumental techniques, including molecular absorption spectroscopy in the ultraviolet and visible region (UV-Vis), glow discharge optical emission spectroscopy (GD-OES), Rutherford backscattering spectrometry (RBS) and transmission electron microscopy (TEM). Microbiological tests were also carried out on nutrient agar to evaluate the inhibitory activity of the films against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) microorganisms. In general, the results showed that the incorporation of the nanoparticles in the films was dependent both on the pH of the silver colloidal solution as the pH of solutions of polyelectrolytes. Among all systems evaluated, the film (PAH_{8.0}/PAA_{4.0})₂₀ immersed in AgNPs solution at pH = 6.0 for 4 h and cross-linked with glutaraldehyde it was one that showed the highest inhibitory activity, both in relation to *S. aureus* as the *E. coli*. The greatest inhibition was, however, observed for *E. coli* which has a less thick peptidoglycan layer of the *S. aureus*, which ultimately facilitating the migration of silver into the interior of the cells of these microorganisms. The industrial wastewater treatment for reuse with the films produced in this work, in turn, by reduced about 90% the total count of coliform bacteria presents in the initial sample, both the contact and the leaching of silver. Finally, considering the ease of application, low environmental impact, reduced costs and satisfactory inhibitory action, the films developed in this work have a great potential to be used as auxiliaries in microbiological treatment of industrial wastewaters.

Keywords: silver nanoparticles (AgNPs), thin films, antibacterial activity, wastewaters treatment.

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia, ciência e tecnologia que foca as propriedades dos materiais em escala nanométrica, está se tornando um dos mais promissores campos de pesquisa da atualidade. Ela não possui uma tecnologia específica, mas interdisciplinar, baseada na física, química, biologia, engenharia, computação e medicina. A possibilidade de desenvolver novos materiais neste campo cria a expectativa de evolução acentuada em diversas áreas do conhecimento, das ciências humanas e exatas (Sahoo et al., 2007).

Em virtude do seu tamanho, os nanomateriais têm demonstrado possuir propriedades químicas, catalíticas, eletrônicas, magnéticas, mecânicas e ópticas distintas (Jortner e Rao, 2002). Em pouco mais de 15 anos, a “explosão” do nano tem levado ao desenvolvimento de uma vasta gama de novas tecnologias para aplicações domésticas e industriais, que vão desde a liberação controlada de medicamentos até novos métodos para o tratamento de águas contaminadas (Crane e Scott, 2012).

Neste contexto, os filmes automontados com polieletrólitos de cargas opostas ganharam um considerável interesse científico, devido às suas inúmeras aplicações (Ferreira et al., 2004; Cheng et al., 2005). Um dos métodos mais utilizados para a fabricação desses materiais baseia-se na automontagem de multicamadas poliméricas diferenciadas por meio da técnica de camada por camada (do inglês “*layer-by-layer*” – LbL).

Essa técnica, que se difundiu rapidamente na literatura principalmente nesta última década (Decher, 1997), consiste basicamente em submergir um substrato apropriado (uma lâmina de vidro, por exemplo) em um béquer contendo a solução do polycation ou do poliânion por um determinado período de tempo. Uma vez em contato com a solução de depósito, as moléculas carregadas dos poli-íons adsorvem-se na superfície do substrato por interação eletrostática (Jesus, 2009). O substrato é, então, lavado para remover as moléculas que não foram satisfatoriamente adsorvidas. O sistema substrato/filme está agora carregado eletrostaticamente, o que permite a adsorção de uma nova camada carregada com carga oposta por meio da imersão em outra solução polimérica. Após a adsorção desta segunda camada, o substrato é novamente lavado e, ao término da deposição das camadas, o mesmo é seco ao ar.

Esses sistemas automontados são considerados um bom meio para nanopartículas, devido à facilidade de controle das propriedades dos mesmos, possibilitando a produção de materiais com características diferentes. A incorporação dessas espécies que possuem elevada área superficial pode afetar significativamente as propriedades dos filmes finos (Dubas et al., 2006; Li et al., 2006). Os materiais obtidos podem apresentar melhorias nas propriedades

ópticas, térmicas, mecânicas, elétricas, magnéticas, entre outras (Decher, 1997; Qin et al., 2005). Além disso, as propriedades desses materiais dependem da maneira como a incorporação das nanopartículas é realizada, do seu tamanho e forma, da concentração e do tipo de interação com a matriz polimérica (Sówka et al., 2006).

Uma classe de grande interesse para a preparação de nanocompósitos de matrizes poliméricas são as nanopartículas de metais nobres sintetizadas em meio aquoso (Crespilho et al., 2006). Essas nanopartículas têm despertado grande atenção em áreas como catálise (Qiu et al., 2006), nanoeletrônica (Colvin et al., 1994; Dabbousi et al., 1995), meio ambiente (Jain e Pradeep, 2005; Yoon et al., 2008), e paralelamente no estudo de suas potencialidades na área médica (Lima, 2011).

A maioria destes estudos está relacionada às nanopartículas de prata (AgNPs), uma vez que as mesmas apresentam ação bactericida contra uma ampla faixa de micro-organismos como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. O efeito bactericida da prata na forma iônica (Ag^+) foi avaliado pela primeira vez pelo cientista suíço Karl Wihelm Von Naegelis, em 1983, contra células de algas (Damm et al., 2005). A utilização das AgNPs (Key e Maass, 2001), no entanto, tem sido relatada em documentos que datam do fim do século XVIII, sendo seu uso intensificado entre 1910 e 1920 (Gibbs, 1999).

Dentro desse contexto, o objetivo principal deste trabalho foi preparar e caracterizar filmes obtidos a partir de soluções de polieletrólitos fracos (poli(hidrocloro de alilamina) – PAH, e poli(ácido acrílico) – PAA) com AgNPs e reticulados com glutaraldeído, visando o desenvolvimento de um novo material que pudesse ser utilizado como agente bactericida no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Filmes Finos Nanoestruturados

O desenvolvimento de filmes finos está em constante e acentuada aprimoração, pois permite sua aplicação em diversas áreas do campo científico-tecnológico, envolvendo profissionais das mais variadas áreas do conhecimento, como físicos, biólogos, químicos e engenheiros em geral.

Filme é o termo que se aplica à matéria condensada distribuída em uma geometria planar, cuja espessura, em geral, é muito menor que as outras dimensões. Quanto à espessura, os filmes finos podem ser classificados em nanométricos (0,1 – 100 nm), micrométricos (0,1 – 100 μ m) e milimétricos (0,1 – 100 mm) (Galembeck, 1998).

O *substrato*, por sua vez, é a superfície que suporta fisicamente um filme. O substrato ideal é aquele que fornece um suporte mecânico adequado para o filme sem que influencie nas características do mesmo (Galembeck, 1998). Existem diversos tipos de substratos, cada um com uma finalidade específica. Os tipos de substratos mais utilizados são vidros modificados, metais, cerâmicas policristalinas e monocristalinas, óxidos metálicos como FTO e ITO (óxidos de estanho dopado com flúor e com índio, respectivamente), materiais poliméricos, dentre outros (Jesus, 2009).

O termo *deposição* refere-se ao método no qual átomos ou moléculas são adicionados à superfície do filme que está sendo preparado sobre um determinado substrato, que por sua vez é uma fase condensada distinta da fase que atua como fonte de material (Galembeck, 1998).

Existem inúmeras técnicas para a preparação de filmes finos (Jesus, 2009; Popiolski, 2011). As principais técnicas utilizadas para essa finalidade são apresentadas a seguir.

2.2 Técnicas de Preparação de Filmes

A necessidade de obtenção de estruturas com controle de espessura e propriedades em escala molecular impulsionou o desenvolvimento de diversas técnicas para a montagem de filmes finos. As técnicas mais utilizadas para a deposição em fase úmida são as de Langmuir-Blodgett (LB) e LbL, pois permitem arranjar as moléculas individuais em estruturas organizadas, favorecendo as propriedades finais desejadas (Decher et al., 1992). A técnica de automontagem de monocamadas ou *self-assembled monolayers* (SAMs) também é utilizada como estratégia para a preparação de filmes ultrafinos, porém a mesma não é adequada para a montagem de estruturas multicamadas (Ariga et al., 2007).

A técnica LB é promissora na preparação de filmes finos, uma vez que permite o controle da espessura das monocamadas, a deposição homogênea das monocamadas sobre o substrato, a possibilidade de se fazer multicamadas com diferentes composições (Jesus, 2009), além de contemplar um grande número de aplicações (Ferreira et al., 2004; Durán et al., 2006; Wohnrath et al., 2006). Entretanto, a técnica LB requer equipamentos especiais e apresenta muitas limitações. Em muitos casos, a deposição das monocamadas pode ser bastante lenta, além de proporcionar uma baixa resistência mecânica e problemas com a estabilidade dos filmes. A técnica exige também ambientes sofisticados e laboratórios extremamente limpos e isolados, o que eleva o custo de fabricação em relação a outros tipos de filmes (Paterno et al., 2001; Durán et al., 2006), além de não ser útil para todos os tipos de aplicações, sendo mais empregada para materiais solúveis em solventes orgânicos, não miscíveis em água (Ariga et al., 2007).

Em contrapartida, a técnica LbL vem se mostrando cada vez mais atraente, devido à simplicidade experimental (Tsuge et al., 2006; Jesus, 2009), o que permite a produção de filmes ultrafinos e multicamadas de diversos tipos de materiais poliméricos, biológicos, metálicos, entre outros.

Esta técnica surgiu como uma alternativa mais simples à técnica LB, que é mais onerosa, embora determinadas características, como a organização dos filmes produzidos pela técnica LB sejam superiores à técnica LbL (Decher, 1997; Nakane e Kubo, 2009). Esta técnica será discutida a seguir e em detalhes, uma vez que foi a técnica utilizada para a preparação dos filmes deste trabalho.

2.3 Filmes Automontados por *Layer-by-Layer*

2.3.1 A Técnica LbL

A técnica de automontagem, baseada em adsorção química, foi proposta pela primeira vez no início da década de 1980, no trabalho pioneiro de Sagiv (Durán et al., 2006), onde foi proposto um método que utilizava um substrato quimicamente modificado e uma solução de moléculas bifuncionais, contendo fosfanatos metálicos e organossilanos. Essas moléculas são capazes de estabelecer uma ligação química com o substrato e, por serem bifuncionais, sua outra extremidade serve como sítio de ancoragem para a adsorção da monocamada subsequente. A repetição deste procedimento resulta em um filme com multicamadas. No entanto, este fato requeria a síntese de moléculas com funções específicas, limitando a técnica (Siqueira Jr, 2006).

Anos mais tarde, essa técnica foi reformulada por Decher e colaboradores, passando a basear-se na interação eletrostática (Paterno et al., 2001) entre camadas contendo grupos com cargas opostas, como descrito por Iler, já na década de 1960 (Siqueira Jr, 2006). Oposta à técnica descrita por Sagiv, nenhuma ligação covalente precisa ocorrer entre as bicamadas formadas no filme (Zucolotto, 2003).

Essa técnica caracteriza-se pela formação de filmes através do depósito de camadas alternadas de materiais de cargas opostas, com etapas de lavagem entre as camadas. As **Figuras 1a** e **1b** ilustram, esquematicamente, o mecanismo de preparação de um filme por LbL via interação eletrostática entre um polycation e um poliânion, e a estrutura idealizada de um filme contendo uma bicamada, respectivamente.

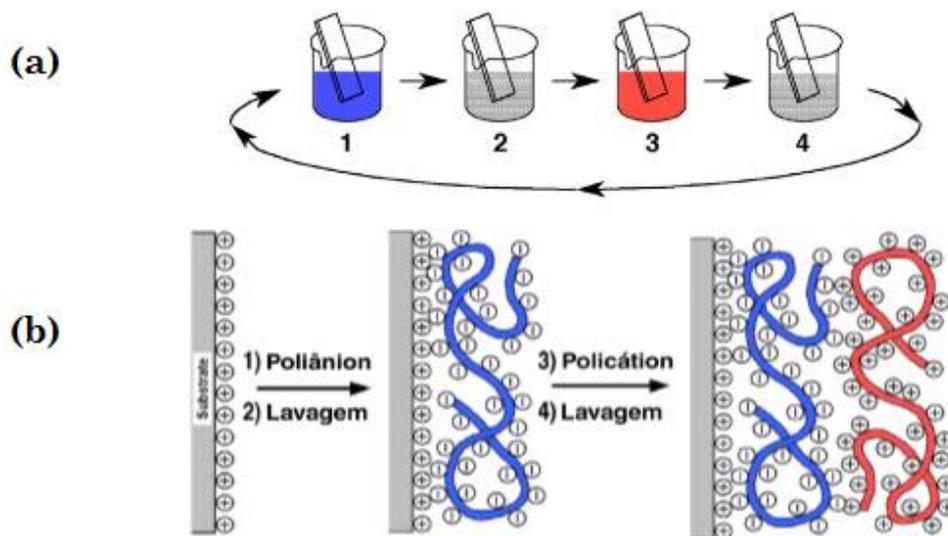


Figura 1. (a) Representação esquemática do processo de preparação de um filme pela técnica LbL sobre um substrato sólido. (b) Estrutura idealizada de um filme contendo as duas primeiras camadas de polieletrólitos. Adaptado de Decher (1997).

Após a adsorção do poliânion (etapa 1), a rede de cargas da superfície torna-se negativa. Este substrato é então imerso em uma solução de lavagem para a remoção do material fracamente adsorvido (etapa 2). Em seguida, imerge-se o substrato em uma solução contendo o polieletrólito carregado positivamente (etapa 3) que gera uma nova rede de cargas positivas na superfície, seguida novamente da imersão em uma solução de lavagem (etapa 4). Como resultado final, obtém-se uma bicamada de polieletrólitos sobre o substrato. Este processo pode ser repetido várias vezes, possibilitando a montagem de filmes com estruturas e espessuras desejadas.

A versatilidade da técnica está na formação de novas arquiteturas moleculares, baseadas em ligações não-covalentes. As interações eletrostáticas entre os poli-íons em solução e a superfície são fundamentais para a estrutura final do filme. É importante ressaltar que a estruturação das moléculas também pode ocorrer por outros tipos de interação como quimiossorção, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras (Tang et al., 2006).

Outro benefício oferecido por essa técnica reside na capacidade de revestir peças de geometrias complexas mantendo, de maneira simples, a mesma estruturação de filmes depositados sobre superfícies planas. Os filmes obtidos a partir da técnica de LbL podem ser montados sobre superfícies de diferentes tamanhos e formas, incluindo metais, vidro, silício, e polímeros com morfologias diferentes, membranas porosas e coloides (Caruso et al., 1998; Dal'Acqua, 2013), utilizando uma variedade de compostos, como polieletrólitos naturais e sintéticos (Crouzier et al., 2010), e nanopartículas (Lan et al., 2006), tais como os nanotubos de carbono (Zhang et al., 2010).

A técnica LbL também permite uma variabilidade da arquitetura dos filmes, no que diz respeito à espessura, composição, conformação e molhabilidade. O controle é realizado através de parâmetros como concentração química dos constituintes, pH, tempo de deposição, força iônica e temperatura (Decher, 1997; Shiratori e Rubner, 2000). Além disso, a estrutura das multicamadas também pode ser modificada pós-montagem por exposição do filme a condições diferentes das utilizadas durante a montagem do mesmo (Wong et al., 2010).

O processo de formação das multicamadas pode ser feito de diversas maneiras, incluindo as técnicas de *dip coating*, *spin coating* e *casting*. Uma breve descrição destas técnicas será apresentada a seguir.

2.3.2 Tipos de Filmes Automontados e Mecanismo de Adsorção

Os filmes nanoestruturados obtidos por LbL podem ser classificados em dois grandes grupos: filmes obtidos por adsorção química e filmes obtidos por adsorção física (Durán et al., 2006).

Na adsorção química, as camadas são adsorvidas sobre o suporte através do estabelecimento de ligações químicas, formando camadas monomoleculares. Uma vez que a adsorção ocorre via reação química, o material depositado deve ter afinidade pelo suporte e ainda manter funcionalidades disponíveis para a adsorção de uma camada subsequente. No entanto, a continuidade de deposição depende de reações químicas com alto rendimento, o que pode ser significativamente diminuído pela presença de impurezas, que podem proteger

os grupos funcionais, e por fatores de geometria molecular, como impedimentos estéreos. Tais fatores ocasionam uma constante diminuição de material adsorvido a cada camada depositada, o que resulta na interrupção do processo de preparação do filme (Durán et al., 2006).

Na adsorção física, por outro lado, as camadas são adsorvidas por meio de interações físicas, tais como atração eletrostática, ligações de hidrogênio e interação hidrofóbica. As energias envolvidas nesses tipos de interação são obviamente menores do que aquelas de uma adsorção química. Contudo, como estas interações são comuns em sistemas poliméricos, o grande número de ligações estabelecidas entre as cadeias dos polímeros e o suporte torna as camadas fortemente aderidas e estáveis. Além disso, esta variedade de interações permite que um número maior de materiais possa ser depositado, sem necessidade de reações químicas (Durán et al., 2006).

2.3.3 LbL por *Dip Coating*

A técnica de *dip coating* consiste em mergulhar verticalmente um substrato dentro de uma solução que contém a substância de interesse e depois de certo tempo retirá-lo do mesmo (Jesus, 2009). Devido à aderência entre as moléculas da solução e a superfície do substrato, uma fina camada será formada. A espessura das camadas é principalmente afetada pela viscosidade e densidade do fluido, e pela tensão superficial.

O processo de imersão e emersão deve apresentar velocidade controlada e nenhum tipo de vibração, a fim de permitir uma deposição homogênea. Além disso, o tempo de deposição também é um fator importante na qualidade do filme. A **Figura 2** ilustra esquematicamente o processo de preparação de filmes pela técnica de *dip coating*.

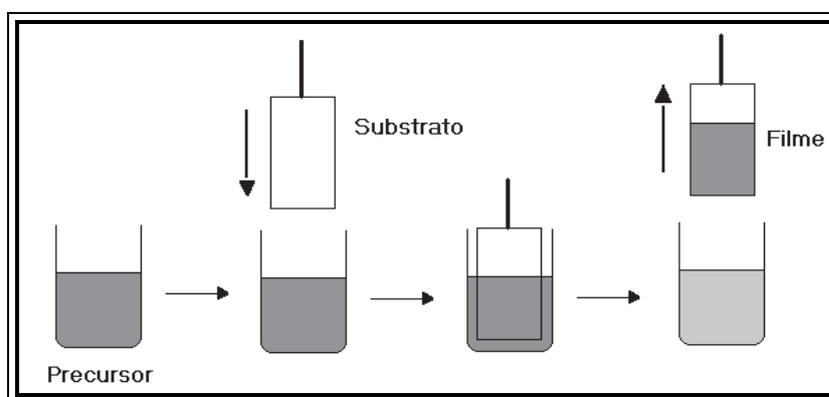


Figura 2. Representação esquemática do processo de preparação de filmes por *dip coating* (Jesus, 2009).

2.3.4 LbL por *Spin Coating*

A técnica de *spin coating* (representada esquematicamente na **Figura 3**) consiste em depositar gotas da solução inicial sobre um substrato que é então acelerado rapidamente até a velocidade de rotação desejada. O líquido flui radialmente, devido à ação da força centrífuga, e o excesso é ejetado para fora da borda do substrato (Hall et al., 1998). A evaporação dos solventes mais voláteis no momento da deposição permite acelerar os processos de hidrólise e condensação iniciados, quando em contato com a umidade do ambiente (Jesus, 2009).

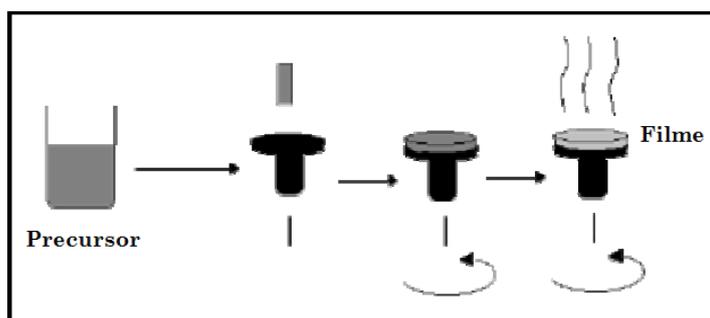


Figura 3. Representação esquemática do processo de obtenção de filmes por *spin coating* (Jesus, 2009).

Nesta técnica, a viscosidade da solução, o tempo e a velocidade de rotação são parâmetros importantes para a deposição de um filme estável e homogêneo (Jesus, 2009).

A técnica por *spin coating* é mais utilizada na indústria de microeletrônica para a produção de fotorresistentes (Hall et al., 1998).

2.3.5 LbL por *Casting*

A técnica de *casting* baseia-se no espalhamento da solução precursora da amostra sobre um substrato (geralmente, uma placa de vidro) (**Figura 4**). Após a evaporação total do solvente utilizado, o filme é formado sobre a superfície do substrato. A evaporação do solvente pode ser acelerada por aquecimento (Jesus, 2009).

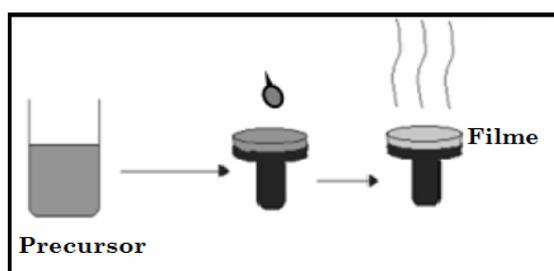


Figura 4. Representação esquemática do processo de obtenção de filmes por *casting* (Jesus, 2009).

A espessura do filme pode ser controlada, ajustando-se a concentração da amostra na solução. Esse método não é tão eficiente na preparação de filmes muito finos como os produzidos pelas técnicas de *spin* e *dip-coating* (Jesus, 2009), uma vez que é necessária uma quantidade de solução considerável para que o filme seja depositado de forma homogênea, sem “buracos”.

2.4 Polieletrólitos

Um polieletrólito é um polímero no qual os monômeros são sais de grupos iônicos e não-metálicos (Popiolski, 2011). Possuem uma grande quantidade de monômeros ionizáveis e são, em geral, solúveis em solventes polares (Silva, 2006).

Os polieletrólitos apresentam grande utilidade em indústrias químicas e possuem um amplo campo de aplicação, como auxiliares de filtração, estabilizantes de suspensões cerâmicas (para aumentar a resistência à compressão em cimentos e argamassas), auxiliares na clarificação de água nas estações de tratamento, como coagulantes em estações de tratamento de esgoto, na indústria de papel, entre outras (Honse, 2008).

Os polieletrólitos podem ser classificados de acordo com vários critérios. Com base na origem, eles podem ser naturais ou sintéticos. Com base na composição, eles podem ser homopolímeros (resultante da polimerização de um único monômero) ou copolímeros (resultante da polimerização de dois ou mais monômeros). Baseado na arquitetura molecular, podem ser lineares ou ramificados (possuem pequenas cadeias laterais), e podem ou não possuir ligações cruzadas entre as cadeias. Finalmente, quanto à natureza química dos grupos ionizáveis, eles podem ser classificados como poliácidos, polibases e polianfóteros (Lankalapalli e Kolapalli, 2009).

Os poliácidos com grupos funcionais $-\text{COOH}$ e $-\text{SO}_3\text{H}$ podem se dissociar em poliânions e prótons. As polibases com grupos $-\text{NH}_2$, por outro lado, podem se ligar a um próton gerando policátions. Polieletrólitos que possuem tanto grupos ácidos como básicos são denominados de polianfóteros, sendo carregados positivamente ou negativamente em pH baixo ou alto, respectivamente (Silva, 2006).

Outra classificação para os polieletrólitos pode ser dada em função do pK_a do grupo ácido. Para um ácido fraco HA qualquer, sua dissociação em água fica sujeito a um equilíbrio (**Equação 1**):



A constante de acidez, ou constante de dissociação ácida K_a (**Equação 2**), é definida como sendo:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (2)$$

A constante de acidez K_a é proporcional à concentração dos íons formados. Quanto maior o valor de K_a , mais ionizado estará o ácido em meio aquoso, e conseqüentemente maior será a sua força. Como o pK_a é o cologaritmo negativo da constante de acidez, um baixo valor de pK_a implicará igualmente em uma maior força (Silva, 2006).

Na preparação dos filmes finos deste trabalho foram utilizados dois polieletrólitos fracos de cargas opostas, sendo o PAH o policátion, e o PAA o poliânion (**Figura 5**).

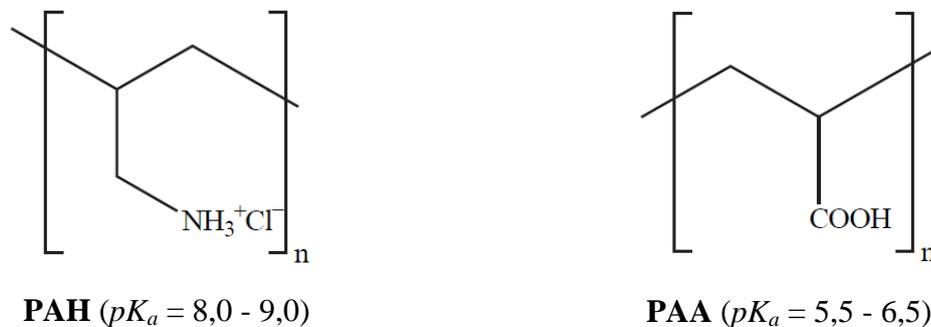


Figura 5. Fórmulas estruturais dos polieletrólitos PAH e PAA em meio ácido.

A principal vantagem em se utilizar esses polieletrólitos na preparação de filmes finos reside no fato de que os mesmos apresentam densidades de carga que podem ser alteradas pelo ajuste do pH da solução de imersão, o que permite o controle da espessura da camada e da organização das cadeias de polímero adsorvidas (Machado et al., 2009).

2.4.1 Definição do pH dos Polieletrólitos

Os filmes automontados de polieletrólitos fracos estão sujeitos a alterações estruturais quando as condições do meio, como pH e força iônica, são alteradas. Variações no pH podem alterar significativamente o grau de ionização dos polieletrólitos em solução, o que acaba contribuindo para o aumento ou a diminuição da espessura e rugosidade dos filmes, à medida que os mesmos vão sendo depositados. Estas mudanças acabam acontecendo uma vez que as moléculas tendem a enovelar-se ou estender-se, dependendo da intensidade de repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas (Choi e Rubner, 2005).

A polibase fraca (PAH) tem valor de pK_a entre 8,0-9,0 (Choi e Rubner, 2005). Assim, em valores de pH inferiores ao pK_a , esse polieletrólito está parcialmente protonado, ou seja, carregado na forma $-\text{NH}_3^+$. As cadeias poliméricas estão mais lineares, devido à repulsão entre as cargas eletrostáticas, e as camadas geradas nos filmes são mais finas. Por outro lado, quando o pH do meio é superior ao valor de pK_a , o PAH encontra-se com parte dos seus grupos amino desprotonados na forma $-\text{NH}_2$. Dessa forma, suas cadeias estão mais enoveladas devido à diminuição da repulsão entre as cargas eletrostáticas, e as camadas geradas nos filmes são mais espessas (Choi e Rubner, 2005).

O poliácido fraco (PAA) tem valor de pK_a entre 5,5-6,5 (Choi e Rubner, 2005). Assim, em valores de pH inferiores ao pK_a , esse encontra-se protonado, ou seja, a maioria dos grupos ácidos está na forma não ionizada ($-\text{COOH}$). Nessa condição de pH, as cadeias poliméricas ficam mais enoveladas, gerando camadas mais espessas nos filmes. Por outro lado, quando o pH do meio é superior ao valor de pK_a , o PAA está desprotonado, com a maioria dos grupos ácidos na forma de carboxilato ($-\text{COO}^-$). Dessa forma, suas cadeias ficam mais lineares e as camadas geradas nos filmes são mais finas (Choi e Rubner, 2005).

A **Figura 6** apresenta a conformação das cadeias poliméricas dos polieletrólitos nos pHs utilizados para a deposição dos filmes desenvolvidos neste trabalho.

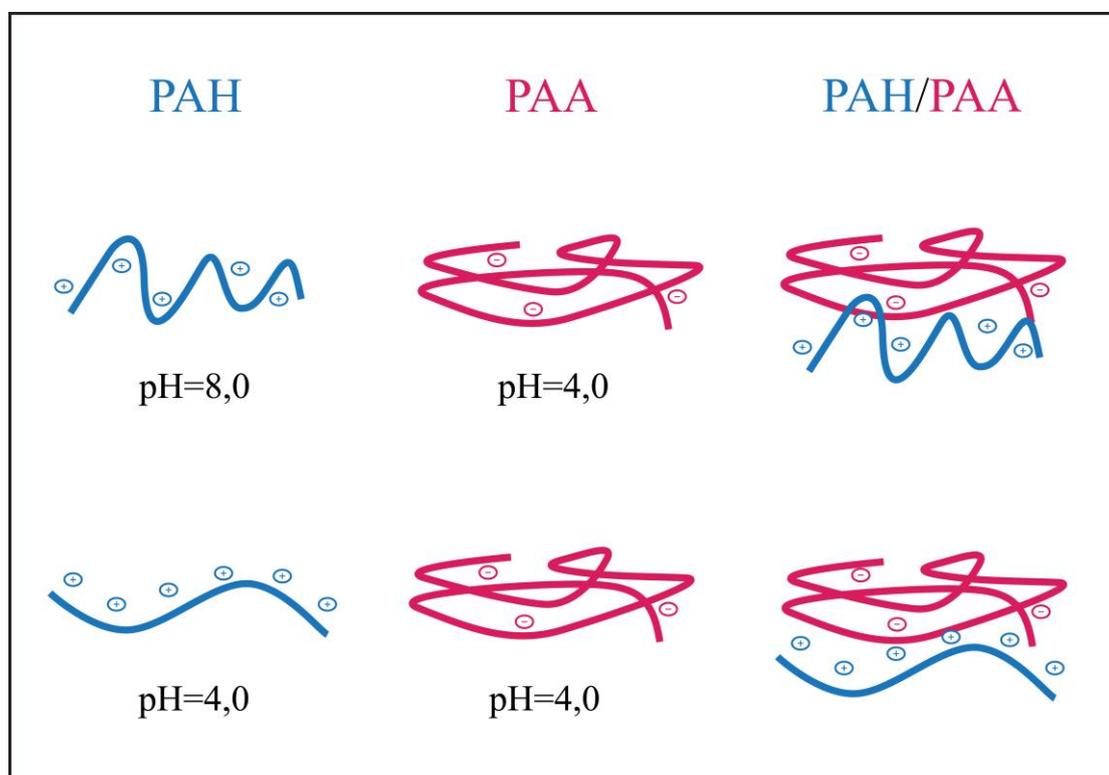


Figura 6. Representação das cadeias poliméricas dos polieletrólitos nos diferentes pHs e sua conformação nas multicamadas.

O grau de ionização de um polieletrólito fraco também pode alterar significativamente quando o mesmo é incorporado em um meio de múltiplas camadas (Vonklitzing e Moehwald, 1995; Mendelsohn et al., 2000; Shiratori e Rubner, 2000; Rmaile e Schlenoff, 2002; Xie e Granick, 2002; Burke e Barrett, 2003; Petrov et al., 2003; Sui e Schlenoff, 2004). Este efeito é mais pronunciado quando a montagem ocorre entre dois polieletrólitos de cargas opostas, como é o caso do PAA e do PAH (Choi e Rubner, 2005).

Nas soluções em que o PAH e o PAA apresentam pHs iguais a 8,0 e 4,0, respectivamente, as cadeias do PAA possuem baixo grau de ionização (~7%) em relação às cadeias de PAH (~68%). Nesses valores de pH, durante a formação do filme, o grau de ionização do PAA é aumentado de ~7% para ~63% (Choi e Rubner, 2005). Dessa forma, a maioria dos grupos $-\text{NH}_3^+$ do PAH neutralizam as cargas dos grupos $-\text{COO}^-$, restando uma pequena fração de grupos $-\text{NH}_3^+$ livres nas multicamadas (Decher e Schlenoff, 2002; Choi e Rubner, 2005). O grau de ionização do PAA aumenta ainda mais quando o filme é colocado em contato com uma solução de pH maior do que 2,5, como é o caso deste trabalho, onde as soluções de AgNPs apresentam pHs iguais a 3,0 e 6,0 (Choi e Rubner, 2005).

Nas soluções em que o PAH e o PAA apresentam pHs iguais a 4,0, por outro lado, as cadeias do PAH apresentam elevado grau de ionização (~95%). As cadeias do PAA, por outro lado, estão apenas 7% ionizadas neste pH. Entretanto, quando o filme está sendo formado, o grau de ionização do PAA aumenta para ~70% (Yoo et al., 1998). Isso resulta em um filme onde os grupos $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{COO}^-$ estão totalmente interligados eletrostaticamente não restando grupos $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{COO}^-$ livres no PAH e PAA, respectivamente, para promover a interação com espécies de cargas opostas (Decher e Schlenoff, 2002; Choi e Rubner, 2005). Essa condição de pH implicou em uma menor incorporação de nanopartículas de ouro (MACHADO et al., 2011) e a ausência do sal de ouro (Chia et al., 2008) em trabalhos anteriores.

No caso do PAH, no entanto, a diferença entre o grau de ionização em solução e o grau de ionização no processo de formação do filme é menor do que no caso de PAA (Choi e Rubner, 2005). Em $\text{pH} = 7,8$, por exemplo, o grau de ionização do PAH em solução é de ~73%, ao passo que o valor do grau de ionização nas multicamadas é de ~89% (Petrov et al., 2003).

2.5 Nanopartículas de Prata

A prata é conhecida pela comunidade médica por sua eficácia antimicrobiana desde o início do século XVIII. O efeito antimicrobiano da prata tem sido utilizado em diferentes

campos da medicina como, por exemplo, na profilaxia da oftalmia neonatal, na cicatrização de feridas e em biomateriais (Lima, 2011). Sais de prata, principalmente o nitrato de prata, já foram usados para o tratamento de úlceras (Klasen, 2000). A atividade antimicrobiana da prata foi reconhecida pelo meio acadêmico no século XIX; no entanto, somente na década de 1920 seu uso foi aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA).

Com o descobrimento dos antibióticos, por volta de 1940, e sua introdução no uso medicinal, os coloides à base de nanopartículas metálicas acabaram sendo descartados. Todavia, as bactérias se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, forçando assim a síntese constante de novas drogas, o que na maioria das vezes não acompanha a velocidade de imunogenicidade dos vírus e bactérias (Gibbs, 1999).

Na década de 1960, a prata ganhou popularidade novamente, agora como antisséptico no tratamento de feridas abertas, sob a forma de solução de 0,5% (m/V) de nitrato de prata (Moyer et al., 1965; Price e Wood, 1966). Em 1968, esse sal de prata foi combinado com o antibiótico sulfonamida para produzir o creme de sulfadiazina de prata (SSD), prescrito até os dias de hoje, principalmente para casos de queimadura (Fox, 1968; George et al., 1997).

Na busca por novos medicamentos antimicrobianos, os coloides de prata também voltaram a despertar o interesse na comunidade científica e, nesta linha, inúmeros trabalhos (Rhim et al., 2006; Sanpui et al., 2008; Sahni et al., 2013) sobre nanocompósitos contendo prata têm sido publicados, sendo o estudo focado no tratamento de doenças provocadas por bactérias como a *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus*, entre outras (Sanpui et al., 2008).

Mais recentemente, no início do século XX, a prata começou a ser usada sob um novo e mais interessante formato: o nanoparticulado. Soluções de prata desenvolvidas sob a luz da nanotecnologia possuem partículas de porte extremamente reduzido (variando de 10 a 1 nm de diâmetro), que caracterizam uma maior superfície de contato, ampliando assim as conhecidas ações antimicrobianas da prata (Carreira, 2009).

Partículas de prata em dimensões maiores (micrométricas) causam a obstrução das membranas celulares, promovendo um envenenamento por prata, conhecido por argiria. Isto não acontece com o uso de partículas de prata em dimensões nanométricas. Essas partículas são tão finamente dispersas e estão em baixa concentração que podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos aos organismos superiores, visto que a concentração efetiva para a atuação contra micro-organismos é de 0,1 µg/L e a concentração tóxica para os seres humanos é de 10 mg/L (Oliveira, 2006).

As nanopartículas de prata (AgNPs) podem ser sintetizadas a partir de corrente elétrica ou por redutores químicos. O tipo de síntese não interfere na eficácia antimicrobiana; no

entanto, o tamanho das partículas de prata e a sua dispersão na solução interferem no seu desempenho. Quanto menor a partícula, maior será sua ação antimicrobiana. Estabilizantes são acrescentados no processo de produção para prevenir a agregação das AgNPs (Carreira, 2009).

Uma investigação recente sobre o efeito antimicrobiano das AgNPs revelou que o mesmo está relacionado a outros fatores além da dimensão, como forma e área de superfície das partículas, sendo ainda sensível à temperatura (Drelich et al., 2011).

As AgNPs são utilizadas para as mais diversas finalidades, especialmente como agentes antimicrobianos (Jones et al., 2008), além de serem empregadas em produtos têxteis (Dubas et al., 2006), películas poliméricas para embalagens de alimentos (Loher et al., 2008), tintas e pigmentos (Kumar et al., 2008), filtros para o tratamento de água (Jain e Pradeep, 2005) ou ar (Yoon et al., 2008), entre outras.

2.6 Glutaraldeído

O glutaraldeído (GA) (**Figura 7**) é um dialdeído saturado que surgiu como uma alternativa em substituição ao formol, principalmente em tratamentos de beleza, por se tratar de um reagente químico menos nocivo (Pepper e Lieberman, 1962).

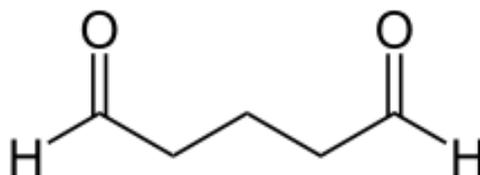


Figura 7: Fórmula estrutural do glutaraldeído.

Desde a sua descoberta no início da década de 1970, o GA tem sido amplamente utilizado para a desinfecção e esterilização em muitas áreas (Gorman et al., 1980). Soluções esterilizantes de GA são utilizadas em hospitais para desinfetar e limpar equipamentos sensíveis ao calor, como instrumentos de diálise, instrumentos cirúrgicos, frascos de sucção, broncoscópios, endoscópios e instrumentos de orelha, nariz e garganta (HSDB, 1996; NIOSH, 2001). Este reagente químico é também utilizado como fixador de tecidos em histologia e como um agente de endurecimento no desenvolvimento de raios X (NIOSH, 2001). É um dos principais componentes de detergentes (Emmanuel et al., 2005), além de ser utilizado no curtimento de couro (Kiernan, 2000).

A atividade esterilizante e desinfetante do GA é influenciada por fatores como pH, temperatura e concentração (Gorman et al., 1980).

O GA foi definido como um agente químico que, quando utilizado adequadamente, poderia destruir todas as formas de vida microbiana, incluindo esporos bacterianos aeróbios e anaeróbios, fungos, leveduras, algas, bacilos da tuberculose e vírus (Borick, 1968; FEI, 2001). Trabalhos anteriores demonstram que o GA é eficaz contra uma ampla gama de vírus (Stonehill et al., 1963; Borick et al., 1964; Snyder e Cheatele, 1965; Blough, 1966; O'Brien et al., 1966; Graham e Jaeger, 1968; Shen et al., 1977), além de possuir potencial atividade antibacteriana (Li et al., 2013) e antifúngica (Stonehill et al., 1963).

O GA é também utilizado como um agente de reticulação convencional, normalmente usado na formação de redes de polipeptídios e proteínas, devido à reatividade dos grupos aldeídicos (carbonilas), que prontamente formam bases de Schiff com os grupos amino das proteínas. É também usado como agente reticulante do poli(álcool vinílico) (Chowdhury et al., 2009) e alguns polissacarídeos, tais como a heparina, o ácido hialurônico e a quitosana (Lin et al., 2006; Rokhade et al., 2007; Webster et al., 2007; Wei et al., 2008). A reticulação da quitosana com GA a torna mais resistente do ponto de vista físico, químico e microbiológico (Beppu et al., 1999).

Devido a essa característica, o GA foi utilizado neste trabalho como uma última camada de “revestimento”, com a finalidade de reduzir a solubilidade dos polieletrólitos em meio aquoso.

2.7 Bactérias

Encontradas em todos os ambientes que compõem a biosfera, as bactérias (do grego *bakteria*: bastão) estão incluídas entre os menores seres vivos conhecidos, tendo dimensões muito pequenas da ordem de micrometros (Soares, 1997) e, possivelmente, representam o grupo de organismos mais numeroso do mundo vivo (Paulino, 2001). São unicelulares e procariontes.

As bactérias podem ser classificadas de acordo com a estrutura de sua parede celular que se localiza externamente à membrana plasmática. É uma estrutura rígida, responsável pela forma da célula bacteriana, que age como uma membrana seletiva e permeável, além de proteger contra choques osmóticos. São as características da parede celular que determinam se a bactéria é Gram-positiva ou Gram-negativa (Salle, 1961; Romeiro, 1995). O principal constituinte da parede celular de todas as bactérias é um polímero denominado

peptidoglicano, encontrado apenas em organismos procariontes (Romeiro, 1995). A **Figura 8** mostra a estrutura celular de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos.

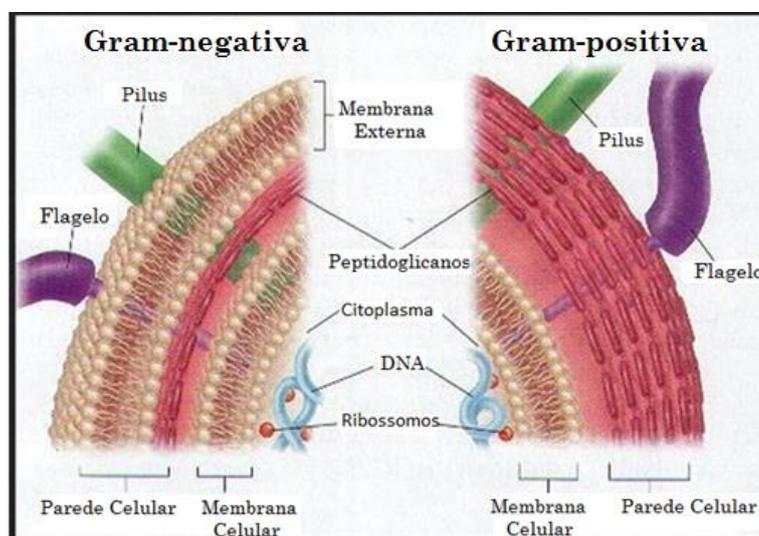


Figura 8. Estrutura celular de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (http://www.americanaquariumproducts.com/aquarium_medication.html).

Nas bactérias Gram-positivas, a parede é composta basicamente por peptidoglicanos, que constituem uma espessa camada ao redor da célula. Imersos nesta camada podem estar presentes outros polímeros, como ácidos lipoteicoicos e polissacarídeos. Nas bactérias Gram-negativas, os peptidoglicanos constituem uma camada basal delgada, sobre a qual se encontra outra camada, composta por lipoproteínas, fosfolipídios, proteínas e lipossacarídeos, denominada membrana externa (Marczwski e Vélez, 1999; Moraes et al., 2000).

O termo *Gram* é atribuído ao médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram, que foi o pioneiro no desenvolvimento do método para a coloração de bactérias, em 1884. Esse método, conhecido como *coloração de Gram*, permite distinguir bactérias com diferentes estruturas de parede celular, a partir das colorações que estas adquirem após o tratamento com agentes químicos específicos, e é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona, enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem. Dessa forma, quando examinadas ao microscópio óptico, as bactérias Gram-negativas aparecem coradas de vermelho e as Gram-positivas de azul-violeta (Madani, 2003).

Neste contexto, os testes microbiológicos com os filmes deste trabalho foram realizados com uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma bactéria Gram-

negativa (*Escherichia coli*). Essas bactérias são as mais comumente encontradas no organismo humano, sendo as maiores responsáveis por várias doenças infecciosas.

2.7.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* (**Figura 9**) é um importante patógeno humano capaz de causar uma grande variedade de infecções. Nos últimos 25 anos, a incidência de infecções adquiridas em hospitais ou no convívio social por *S. aureus* aumentou significativamente (Steinberg et al., 1996; Staphylococcus Laboratory, 2003). Considera-se que a maior parte das infecções são derivadas do transporte nasal (Yu et al., 1986; Luzar et al., 1990; Kluytmans et al., 1997; Nguyen et al., 1999; Von Eiff et al., 2001), uma vez que o nariz é o principal reservatório ecológico de *S. aureus* em humanos (Moss et al., 1948; Kluytmans et al., 1997; Lowy, 1998). O *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, esférica, com um diâmetro de 1,0 a 1,3 μm e que quando vista ao microscópio, aparece em aglomerados, semelhante a cachos de uvas (The Food Safety File: *Staphylococcus aureus*, 2008).

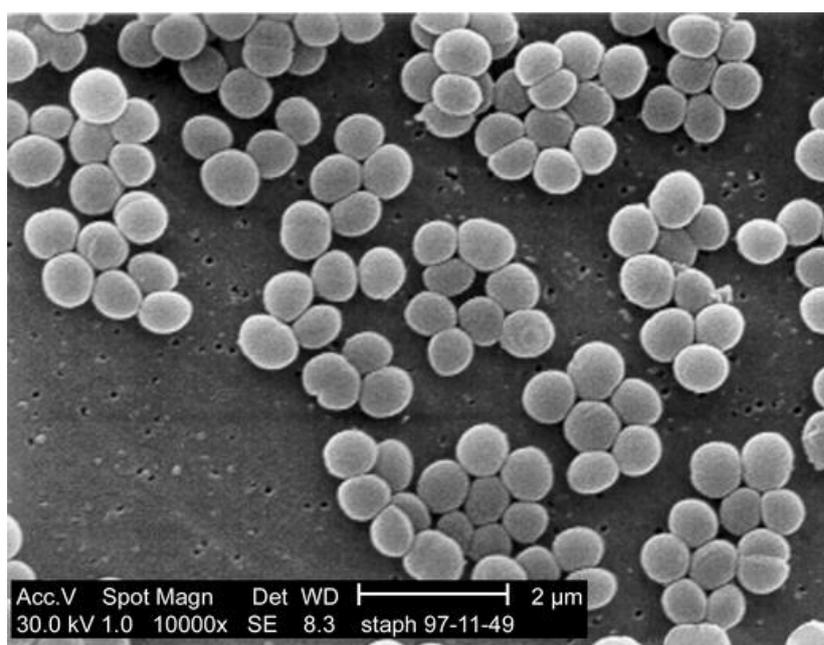


Figura 9. Micrografia eletrônica de varredura do micro-organismo *Staphylococcus aureus*. (<http://annarenatav3.wordpress.com/2011/04/04/bacteria-gram-positiva-e-gram-negativa/>).

A eficiência da disseminação de *S. aureus* se deve, em parte, à grande versatilidade desse micro-organismo. A capacidade de se adaptar rapidamente a diferentes ambientes, muitas vezes hostis devido ao pH, umidade, pressão osmótica ou deficiência de nutrientes, possibilita não só a colonização no homem como no ambiente ao seu redor, criando

reservatórios de células aptas a colonizar outros indivíduos (Cepeda et al., 2005; Kniehl et al., 2005). De fato, a *S. aureus* é uma bactéria comum na microbiota humana, colonizando de forma persistente as narinas de cerca de 20% da população e de forma intermitente de 30%. A maioria dos portadores são assintomáticos e o processo de infecção normalmente está associado a algum fator que diminui a resposta imunológica do indivíduo, como doenças, tratamentos mais agressivos, ou procedimentos médicos invasivos, que abrem uma via de acesso para os micro-organismos (Kuroda et al., 2001; Gordon e Lowy, 2008).

Outra característica da *S. aureus* é a capacidade de desenvolver rapidamente resistência a agentes antimicrobianos. O uso extensivo de antibióticos resultou em um aumento na resistência de *S. aureus* aos isolados clínicos (Fattom et al., 2004). Dessa forma, o *S. aureus* transformou-se em um incrível agente patológico, com capacidade de causar uma vasta gama de infecções associadas a altas taxas de mortalidade e morbidade (Sheagren, 1984; Archer, 1998).

2.7.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (**Figura 10**) é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Kaper et al., 2004). A grande maioria dessas bactérias encontra-se junto à microbiota intestinal, tanto de seres humanos, quanto de outros animais de sangue quente. No entanto, apenas aproximadamente 10% dessas são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e infecções extra-intestinais (Russo e Johnson, 2000; Kaper et al., 2004; Johnson e Russo, 2005).

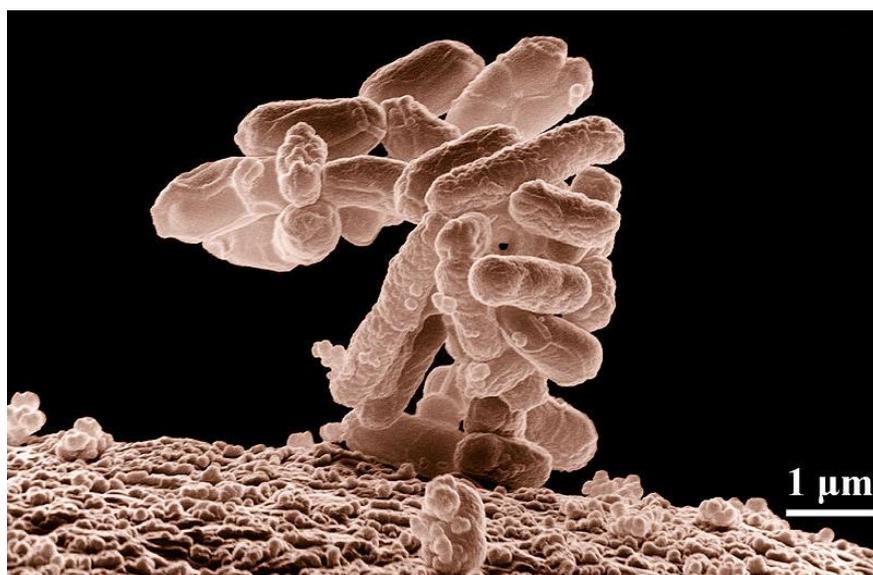


Figura 10. Micrografia eletrônica de varredura do micro-organismo *Escherichia coli* (http://en.wikipedia.org/wiki/File:E_coli_at_10000x,_original.jpg).

A *E. coli* geralmente permanece inofensivamente confinada ao lúmen intestinal de todos os indivíduos. No entanto, nos hospedeiros debilitados ou imunossuprimidos, ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, as estirpes de *E. coli* podem provocar a infecção. Além disso, mesmo os seres humanos mais saudáveis podem ser suscetíveis à infecção por um dos vários clones altamente adaptados de *E. coli* que se desenvolveram e que são capazes de causar uma ampla gama de doenças humanas. Infecções causadas pela *E. coli* patogênica podem ser limitadas a superfícies mucosas ou podem difundir-se através do corpo (Nataro e Kaper, 1998).

Em geral, pode-se identificar três síndromes clínicas de infecção por *E. coli*: meningite/sepsse, doença entérica/diarréia e infecção do trato urinário (Nataro e Kaper, 1998). As mesmas podem ser adquiridas através da ingestão de água ou alimentos contaminados com *E. coli* ou através do contato com a bactéria em ambientes hospitalares. Em um estudo realizado pelo Programa de Vigilância SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program), os bacilos Gram-negativos foram responsáveis por mais de 53,8% das infecções hospitalares no Brasil.

2.8 Filmes com Nanopartículas no Tratamento de Efluentes

A água é uma substância essencial para toda a forma de vida na Terra e um recurso precioso para a civilização humana. O acesso seguro à água potável é considerado um dos objetivos humanitários mais básicos, e continua sendo um grande desafio global para o século XXI (Qu et al., 2013).

Atualmente, cerca de 780 milhões de pessoas ainda não têm acesso a fontes de água potável em todo o mundo (WHO, 2012). Nesse sentido, a implementação de políticas para o tratamento básico de água nas áreas mais afetadas (principalmente nos países em desenvolvimento), onde a água potável e a infraestrutura dos esgotos são muitas vezes inexistentes (Qu et al., 2013), deve ser assunto prioritário.

A demanda cada vez maior por água, nestes últimos anos, está tornando o uso de recursos hídricos não convencionais (como águas pluviais, água salobra, águas residuais e água do mar) uma nova rotina, especialmente em regiões com histórico de escassez de água. Além disso, as atuais tecnologias de tratamento de água e esgoto e sua infraestrutura estão prestes a atingir o limite para o fornecimento adequado de água com qualidade que possa satisfazer as necessidades humanas e ambientais (Qu et al., 2013).

A atividade industrial é um dos principais responsáveis pela poluição das águas, devido à geração de diferentes tipos de efluentes (Ribeiro et al., 2004). Os poluentes

encontrados nas águas e que são gerados pelo desenvolvimento industrial incluem contaminantes inorgânicos e orgânicos (Priya et al., 2009). Tendo em vista o aumento na produção de esgoto, a reutilização de águas residuais está se tornando uma necessidade comum, até mesmo como fonte de água potável (Qu et al., 2012).

Nesse contexto, novas abordagens estão sendo estudadas para enfrentar os problemas associados à qualidade das águas. A aplicação de nanopartículas no tratamento de água é uma área emergente e nanocatalisadores provaram ter um potencial para a remoção de contaminantes orgânicos, desempenhando um papel importante na resolução de diversos problemas ambientais e de poluição graves (Chen e Mao, 2007). Durante as últimas décadas, várias pesquisas envolvendo a utilização de zeólitas sintéticas e naturais, filmes de polímeros e íons metálicos (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ti^{3+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) como bactericidas para a desinfecção da água têm sido realizadas (McLean et al., 1993; Feng et al., 2000; Shearer et al., 2000; Cík et al., 2001; Ülküseven et al., 2002; Chen et al., 2003; Islam et al., 2003; Chohan et al., 2004).

Os recentes avanços na nanotecnologia oferecem oportunidades de desenvolver sistemas de abastecimento ou tratamento de água de última geração. Os processos altamente eficientes, modular e multifuncional ativados por nanotecnologia, estão previstos para proporcionar alto desempenho, água a preços mais acessíveis e soluções de tratamento de águas residuais que dependem cada vez menos de grandes infraestruturas (Qu et al., 2013). Além disso, a utilização da nanotecnologia no tratamento de água e de efluentes promete não só superar os principais desafios enfrentados pelas tecnologias de tratamento existentes, mas também fornecer novas possibilidades de tratamento que poderiam permitir a utilização econômica dos recursos hídricos não convencionais, visando expandir o abastecimento de água (Qu et al., 2013).

O desenvolvimento de filmes com nanopartículas ou semicondutores, como uma alternativa ao tratamento de águas residuais, já é uma realidade. Na literatura destacam-se estudos sobre materiais semicondutores fotocatalíticos com polímeros, como o dióxido de titânio (Yu et al., 2007; Priya et al., 2009; Zhu e Dan, 2010; Solís-Casados et al., 2013) e óxido de zinco (Sapkál et al., 2012) que podem ser utilizados para remover diversos tipos de contaminantes orgânicos, que não são adequadamente removidos dos efluentes por tecnologias convencionais de tratamento de água.

A preparação de filmes com AgNPs também vem sendo abordada em estudos relacionados ao desenvolvimento de materiais com atividade antimicrobiana. No entanto, os poucos trabalhos publicados versam basicamente sobre a eficiência bactericida destes

materiais em relação a cepas isoladas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Dubas et al., 2006; Li et al., 2006). A utilização de filmes com AgNPs no tratamento microbiológico de efluentes industriais, por sua vez, ainda não foi reportada na literatura. Dessa forma, esse trabalho acaba contribuindo diretamente para o desenvolvimento de um novo material que poderá ser utilizado para essa finalidade, o que certamente irá contribuir para a gestão sustentável da água e sua reutilização de maneira adequada e segura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes utilizados neste trabalho foram o poli(ácido acrílico) (PAA, $M_w = 90.000 \text{ g.mol}^{-1}$, Polysciences), o poli(hidrocloro de alilamina) (PAH, $M_w = 70.000 \text{ g.mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich), o nitrato de prata (AgNO_3 , Merck), o boroidreto de sódio (NaBH_4 , Merck) e o citrato de sódio tribásico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich). Além disso, a água utilizada na preparação de todas as soluções foi obtida a partir de um sistema Milli-Q (com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) da Millipore.

3.2 Síntese e Caracterização das AgNPs

3.2.1 Síntese das AgNPs

As AgNPs foram sintetizadas em meio aquoso através da redução química de íons Ag^+ por boroidreto de sódio, na presença de citrato de sódio tribásico dihidratado (como agente estabilizante), sob agitação e ao abrigo da luz, a 23°C . Este procedimento foi realizado com base no método proposto por Jana et al. (2001).

Inicialmente, 250 mL de nitrato de prata $0,25 \text{ mmol/L}$ foram adicionados a 250 mL de citrato de sódio tribásico dihidratado $0,25 \text{ mmol/L}$ por 30 s, sob agitação magnética vigorosa. Imediatamente após a mistura dessas duas soluções, uma alíquota de 10 mL de boroidreto de sódio $1,00 \text{ mmol/L}$ foi adicionada a esse sistema (Pinto et al., 2010). Em seguida, o sistema foi mantido sob agitação por mais 1 min e a solução resultante (de tonalidade amarelo-ouro) foi imediatamente utilizada para a incorporação das AgNPs nos filmes.

A fim de se avaliar o efeito do pH da solução de AgNPs na incorporação das nanopartículas nos filmes, e conseqüentemente na atividade bactericida, a solução contendo as AgNPs foi dividida em duas partes iguais, mantendo-se o pH de uma das partes em torno de 6,0 e reduzindo-se o pH da outra metade para 3,0. Estudo realizado com nanopartículas de ouro mostrou que a incorporação dessas nanopartículas nos filmes ocorreu de maneira satisfatória, tanto para soluções em $\text{pH} = 3,0$, quanto para soluções em $\text{pH} = 6,0$ (Machado et al., 2011).

3.2.2 UV-Vis das Soluções de AgNPs

As soluções contendo as AgNPs (em $\text{pH} = 3,0$ e $\text{pH} = 6,0$) foram analisadas em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60, na faixa de comprimento de onda situada entre 200 e 800 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm.

3.2.3 MET das Soluções de AgNPs

As soluções contendo as AgNPs foram previamente diluídas em água deionizada (1 gota da solução coloidal de prata em 20 mL desse solvente), utilizando um ultrassom (Unique USC 1400) por 30 min. Em seguida, uma gota dessa nova solução foi depositada sobre um *grid* de cobre com filme de Formvar (300 mesh) e deixada secar por 48 h. Finalmente, a análise de MET foi realizada em um microscópio Jeol JEM-1200 Ex II, operando com uma tensão de 80 kV.

O software Origin 7.5 foi utilizado para graficar os histogramas de distribuição de tamanhos das AgNPs, que por sua vez foram determinados com o auxílio do software *Image Tool for Windows*. Para a construção desse histograma foram realizadas aproximadamente 200 contagens.

3.3 Preparação e Caracterização dos Filmes com AgNPs

Os filmes foram depositados em lâminas de vidro para os testes microbiológicos e para a caracterização por espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), em poliestireno para análise de MET, e em silício para as análises de espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente (GD-OES) e espectrometria de retroespalhamento Rutherford (RBS).

3.3.1 Limpeza dos Substratos

Os substratos utilizados para a deposição dos filmes foram inicialmente esfregados, um a um, com algodão e detergente, sendo posteriormente colocados em um ultrassom (Unique USC 1400) contendo Extran neutro a 10% (v/v) por 10 min. Em seguida, os mesmos foram sonificados por 3 min em uma solução de NaOH 1,0 mol/L, e novamente em acetona por mais 10 min. Ao término de cada etapa, os substratos foram enxaguados abundantemente com água destilada. Para a secagem, os mesmos foram colocados em uma estufa (Nova Ética 420-1D) a 50°C, por um período de 1 h.

3.3.2 Preparação dos Filmes com AgNPs

A montagem dos filmes foi feita em um equipamento NanoStracto Sequence, de acordo com o fluxograma apresentado na **Figura 11**.

Os substratos de vidro foram inicialmente imersos em uma solução aquosa de PAH na concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L (baseada na massa molar do polímero) durante 15 min sendo, em seguida, retirados da solução e lavados por imersão em água deionizada durante 2,

1 e 1 min, consecutivamente. Na sequência, os mesmos foram imersos em outra solução aquosa de PAA de mesma concentração, durante 15 min, sendo lavados em água deionizada de maneira análoga ao que foi descrito anteriormente.

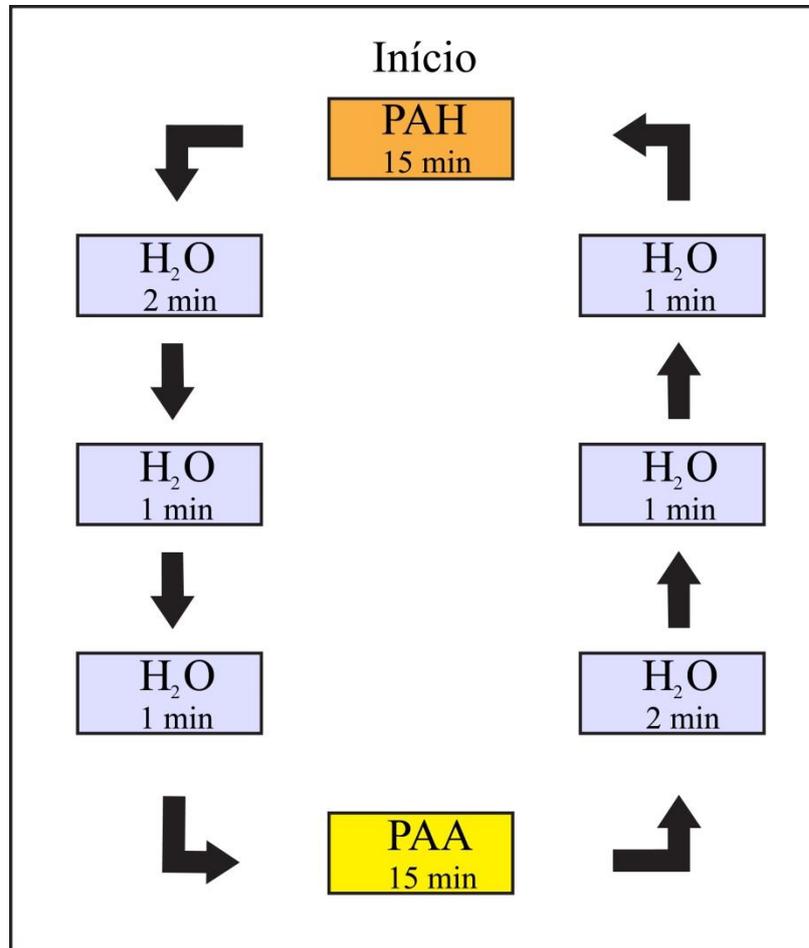


Figura 11. Fluxograma esquemático da preparação dos filmes.

As multicamadas foram obtidas a partir de soluções aquosas compostas por $(PAH_x/PAA_{4,0})_{20}$, onde x e $4,0$ são os valores de pH das soluções do polícatión e do poliânion durante a montagem dos filmes, respectivamente; e 20 é o número de camadas. Os filmes foram preparados para duas combinações de experimentos: $(PAH_{4,0}/PAA_{4,0})_{20}$ e $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$. A escolha do pH das soluções e da quantidade de camadas foi feita com base em trabalhos anteriores (Machado et al., 2011), em que se observou que para filmes produzidos com os mesmos polieletrólitos, e em condições semelhantes, nanopartículas de ouro concentravam-se preferencialmente na superfície dos mesmos.

Após a preparação, os filmes foram imersos nas soluções de AgNPs (em pH = 3,0 e pH = 6,0) por um período de 1 h, sendo em seguida enxaguados em água deionizada durante

30 s. A incorporação das AgNPs foi realizada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, assim como a secagem dos mesmos, por um período de 24 h.

Visando minimizar a solubilidade dos filmes em meio aquoso, os mesmos foram reticulados através da imersão em uma solução aquosa de glutaraldeído 2,5% (v/v) por 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo em seguida enxaguados em água deionizada durante 30 s e secos ao ar e ao abrigo da luz por um período de 24 h. Ao término da etapa de preparação, os filmes apresentaram uma área de aproximadamente 14,3 cm².

3.4 Teste de Difusão em Ágar

Os ensaios microbiológicos foram realizados em placas de Petry com ágar nutriente (HIMEDIA) e ágar estoque. A eficácia antimicrobiana foi testada sobre a inibição do crescimento de *Escherichia coli* (ATCC – 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC – 25923).

As amostras das culturas dessas duas bactérias foram inicialmente diluídas em uma solução salina peptonada 0,1% (m/v). Em seguida, foram adicionadas alçadas de cada micro-organismo em tubos separados, cada um contendo uma solução salina, até se obter uma turvação compatível à escala 0,5 de McFarland, de densidade celular bacteriana em torno de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

As suspensões das duas bactérias foram então espalhadas de forma homogênea (**Figura 12**) no meio de cultura de cada placa de Petry para que os filmes pudessem ser depositados na parte superior do ágar (**Figura 13**), sendo posteriormente incubados em uma estufa bacteriológica (Quimis Q-317B) a uma temperatura de 37°C, por um período de 48 h.

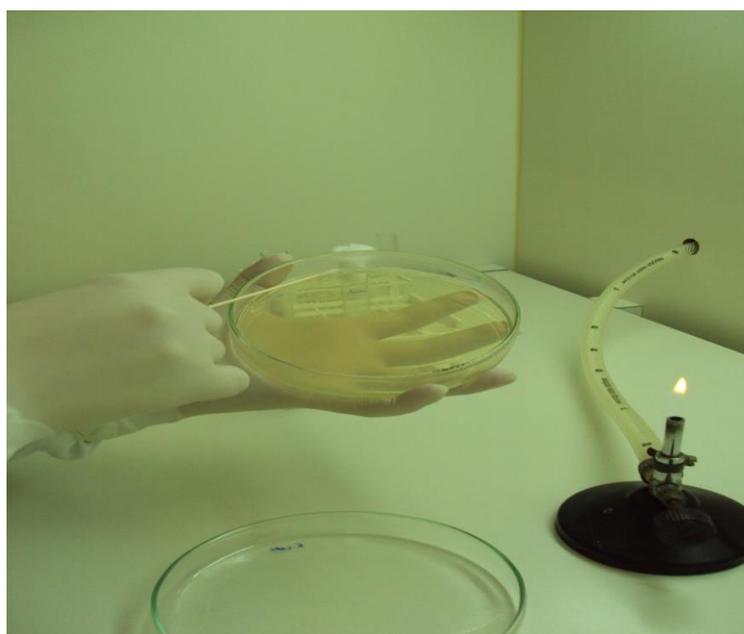


Figura 12. Imagem do espalhamento da solução de bactérias sobre o ágar.

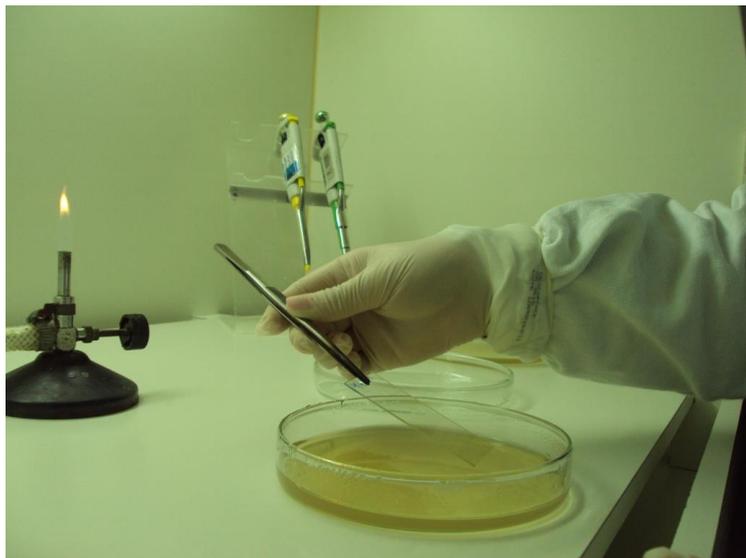


Figura 13. Imagem da colocação da lâmina de vidro sobre o ágar.

Após o período de incubação, as placas de Petry foram analisadas com o objetivo de se avaliar a inibição do crescimento bacteriano nas amostras, através da formação de halos ao redor, sob e sobre os filmes.

Os ensaios microbiológicos preliminares foram realizados em ágar estoque, utilizando-se apenas a cultura de *E. coli*, e um tempo de imersão nas soluções coloidais de prata (em pH = 3,0 e pH = 6,0) de 1 h. Os filmes avaliados nestes primeiros ensaios encontram-se listados na **Tabela 1**.

Após a finalização destes primeiros testes, foram realizados novos ensaios microbiológicos utilizando-se apenas o último filme (assinalado em “verde” na **Tabela 1**), tendo em vista que o mesmo apresentou o melhor resultado em termos de inibição com relação aos demais filmes avaliados. Para esses novos ensaios, o tempo de difusão das AgNPs nos filmes foi de 1, 2 e 4 h; o ágar utilizado foi o do tipo nutriente; e os micro-organismos testados foram a *E. coli* e o *S. aureus*.

Os ágares estoque e nutriente são utilizados como meios de cultura em geral. O ágar estoque é composto por peptona bacteriológica, extrato de levedura, extrato de carne, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico e ágar. Para a preparação desse meio de cultura deve-se pesar os constituintes em um recipiente adequado e adicionar o volume correspondente de água, deixar a mistura em repouso por 15 min e, em seguida, aquecer a mesma até a completa dissolução. Em seguida, o pH é ajustado para $7,4 \pm 0,2$ e a solução é distribuída em frascos identificados. Por fim, o meio de cultura é autoclavado a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. A preparação do ágar nutriente é realizada de forma análoga a do ágar estoque, sendo este

composto basicamente pelos mesmos componentes do ágar estoque, porém em concentrações diferentes, com exceção do fosfato de sódio dibásico que não é utilizado na mistura. A validade de ambos os ágares é de três meses.

Tabela 1. Descrição dos filmes utilizados nos ensaios microbiológicos.

Filme	AgNPs	pH da solução de AgNPs	Reticulação com glutaraldeído
(PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Não	–	Não
(PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Não	–	Sim
(PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Sim	3,0	Não
(PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Sim	3,0	Sim
(PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Sim	6,0	Não
(PAH _{4,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Sim	6,0	Sim
(PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Não	–	Não
(PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Não	–	Sim
(PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Sim	3,0	Não
(PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Sim	3,0	Sim
(PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Sim	6,0	Não
(PAH _{8,0} /PAA _{4,0}) ₂₀	Sim	6,0	Sim

3.5 Caracterização dos Filmes com AgNPs

Os filmes com AgNPs foram caracterizados por meio das técnicas de espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão óptica por descarga luminescente (GD-OES), espectrometria de retroespalhamento Rutherford (RBS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

As amostras foram identificadas com a sigla *ABC*, onde *A* e *B* representam os valores de pH das soluções de PAH e PAA durante a montagem dos filmes, respectivamente; e *C* é a quantidade de horas de imersão dos filmes em solução de AgNPs.

3.5.1 UV-Vis

Os filmes foram analisados em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60 na faixa de comprimento de onda situada entre 200 e 800 nm. As análises foram realizadas somente para os filmes (PAH_{4,0}/PAA_{4,0})₂₀ e (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀, imersos em solução de prata em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. O branco foi medido com uma lâmina de vidro contendo apenas os filmes de PAH/PAA reticulados com glutaraldeído.

3.5.2 GD-OES

A análise de GD-OES foi utilizada para verificar a presença de Ag nos filmes. A análise permite identificar em profundidade todos os elementos químicos que constituem o material.

As medidas foram realizadas em um equipamento Horiba GD Profiler 2 do Laboratório de Propriedades Nanomecânicas da UCS. Anteriormente à análise das amostras, o equipamento foi calibrado com alumínio.

A cada nova medida foi efetuada a limpeza do anodo do equipamento. O tempo de ensaio para cada amostra foi de 30 s. As análises foram realizadas somente para os filmes (PAH_{4,0}/PAA_{4,0})₂₀ e (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀, imersos em solução de prata em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído.

3.5.3 RBS

Essa técnica foi utilizada para estimar a concentração (em átomos/cm²) e a distribuição das AgNPs nos filmes.

As medidas foram realizadas em um acelerador de íons tipo Tandem de 3,0 MeV, utilizando um feixe de íons monoenergético de He⁺ de 2,0 MeV e um ângulo de detecção de retroespalhamento de 165°, no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da UFRGS.

As análises foram realizadas somente para os filmes (PAH_{4,0}/PAA_{4,0})₂₀ e (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀, imersos em solução de prata em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído.

3.5.4 MET

Essa técnica foi utilizada para avaliar a distribuição e o tamanho das AgNPs nos filmes automontados de PAH/PAA. As análises foram realizadas apenas com o filme

(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀, imersos em solução de prata em pH = 6,0 por 4 h e reticulados com glutaraldeído.

As amostras foram inicialmente embutidas em resina epóxi e curadas em uma estufa a 60°C, por um período de 24 h. Em seguida, as amostras foram trimadas com uma faca de vidro e, em seguida, secções transversais ultrafinas foram obtidas usando uma navalha de diamante Diatome com 45°, à temperatura ambiente. As secções ultrafinas de cerca de 80 nm de espessura foram coletadas e imediatamente depositadas sobre *grids* de cobre (200 mesh), sendo posteriormente analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni 268D com tensão de aceleração de 80 kV.

A preparação dos filmes para a análise de MET, bem como a aquisição das imagens, foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

O software Origin 7.5 foi utilizado para graficar os histogramas de distribuição de tamanhos das AgNPs, que por sua vez foram determinados com o auxílio do software *Image Tool for Windows*. Para a construção desse histograma foram realizadas aproximadamente 200 contagens.

3.6 Tratamento Microbiológico de Efluente Industrial para Reuso

3.6.1 Contagem de Coliformes Totais

A contagem de coliformes totais foi realizada no Laboratório de Análise e Pesquisa em Alimentos (LAPA) da UCS, de acordo com a Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

O método baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob teste em ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA), e posterior contagem das colônias suspeitas. O ágar cristal violeta vermelho neutro bile apresenta em sua composição sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição de micro-organismos Gram-positivos e vermelho neutro (um indicador de pH) que revela a fermentação da lactose pelos micro-organismos presentes.

3.6.2 Utilização dos Filmes com AgNPs no Tratamento de um Efluente Industrial

A avaliação da eficiência bactericida, frente a um efluente industrial para reuso, foi realizada utilizando-se apenas o filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀ imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído.

No primeiro ensaio, os substratos de vidro contendo esse filme foram inicialmente colocados em erlenmeyers de 500 mL (um por frasco). Em seguida, os mesmos foram

recobertos com 250 mL de um efluente industrial que apresentava uma contagem total de coliformes de 900 UFC/mL, pH igual a 7,1 e os parâmetros apresentados na **Tabela 2**. Na sequência, os erlenmeyers foram agitados em uma mesa orbital a 180 rpm por intervalos de tempo de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240 e 360 min, respectivamente. Ao término deste procedimento, as amostras de efluente foram acondicionadas em frascos âmbar, previamente sanitizados e esterilizados, e encaminhados ao LAPA para uma nova contagem.

Tabela 2. Parâmetros do efluente industrial utilizado no primeiro ensaio do tratamento de efluente industrial para reuso.

Parâmetro	Quantidade (mg/L)
Cobre total	0,0068
Cromo total	0,018
DBO	16
DQO	54,9
Fósforo total	0,28
Nitrogênio amoniacal	2,33
Nitrogênio total Kjeldahl	3,79
Óleos e graxas minerais	< 1
Sólidos sedimentáveis	< 0,1
Sólidos suspensos totais	19
Zinco total	0,09

Visando avaliar também a possível reutilização desses filmes, foi realizado um segundo ensaio, porém considerando-se apenas os tempos em que foram observados os maiores percentuais de redução de coliformes totais no primeiro ensaio (ou seja, em 5, 10, 15, 30 e 120 min, respectivamente). O efluente utilizado para a realização deste segundo ensaio possuía uma contagem de coliformes totais de 1300 UFC/mL, pH igual a 6,7 e os parâmetros descritos na **Tabela 3**.

Os substratos de vidro utilizados neste segundo ensaio foram reaproveitados, sendo colocados, após a lavagem com água deionizada e imediatamente ao término de cada tempo,

em um novo erlenmeyer contendo o efluente industrial sem tratamento, pelo mesmo tempo e sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Tabela 3. Parâmetros do efluente industrial utilizado no segundo ensaio do tratamento de efluente industrial para reuso.

Parâmetro	Quantidade (mg/L)
Cobre total	0,013
Cromo total	0,0036
DBO	16
DQO	543,1
Fósforo total	0,067
Nitrogênio amoniacal	0,49
Nitrogênio total Kjeldahl	2,62
Óleos e graxas minerais	< 1
Sólidos sedimentáveis	< 0,1
Sólidos suspensos totais	6
Zinco total	0,113

3.6.2.1 Quantificação de Prata no Efluente Industrial

A prata lixiviada durante o tratamento do efluente industrial com o filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀ foi quantificada por meio da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), utilizando o método 3120B do Standard Methods 22st (Standard, 2012). O limite de detecção do método é de 0,001 mg/L.

A quantificação de prata presente no filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀, anteriormente ao tratamento do efluente, foi igualmente realizada. Para tanto, efetuou-se a dissolução desse filme em HNO₃ 65% (v/v) por 24 h.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das AgNPs

4.1.1 UV-Vis

Os espectros das soluções coloidais de AgNPs obtidos em pH = 3,0 e pH = 6,0 (**Figura 14**) evidenciaram a presença de uma única banda de absorção centrada em 395 nm e 393 nm, respectivamente.

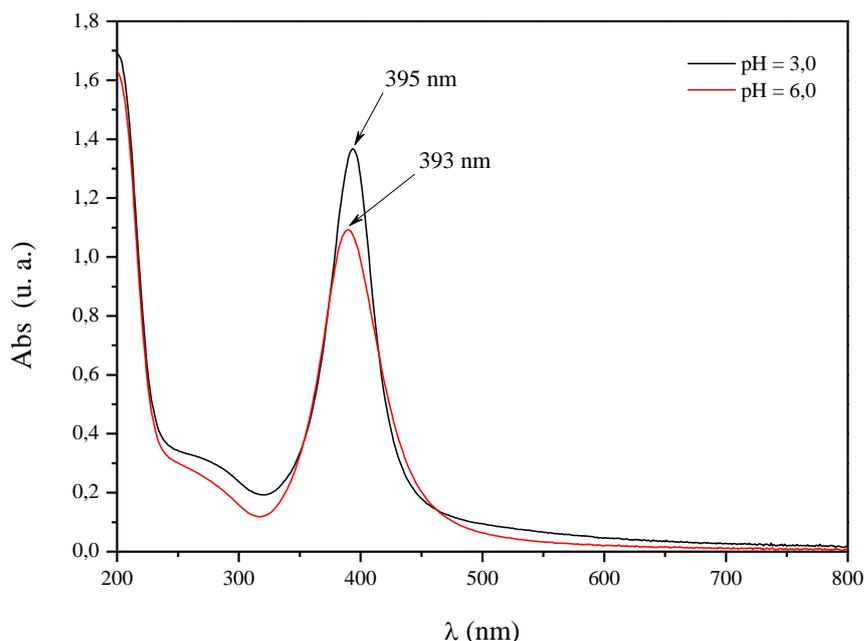


Figura 14. Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis das AgNPs em pH = 3,0 e em pH = 6,0.

De acordo com a literatura, espectros dessa natureza podem fornecer informações importantes a respeito do tamanho e da geometria das nanopartículas estudadas (Pal et al., 2007). Geralmente, uma banda de absorção em torno de 400 nm indica a presença de AgNPs de formato esférico (Noguez, 2007). Essa constatação foi corroborada pela análise de MET (**item 4.1.2**), onde foi possível observar nanopartículas com esse formato.

A absorvância da solução coloidal de prata em pH = 3,0 é maior, pois ao reduzir o pH da solução, a densidade de carga negativa (citrato) presente ao redor das nanopartículas também é reduzida, conforme ilustra a **Figura 15**. Dessa forma, as mesmas ficam mais susceptíveis à interação com a radiação UV, o que faz com que a absorvância seja maior do que em pH = 6,0.

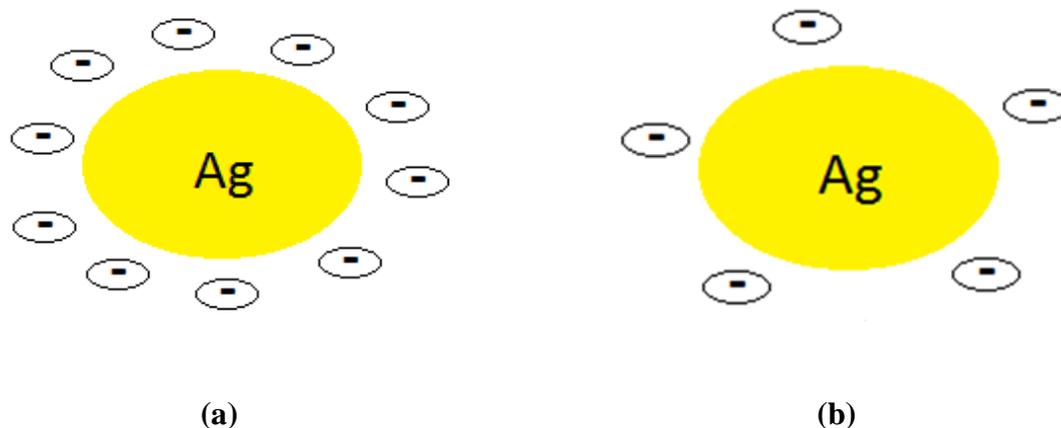
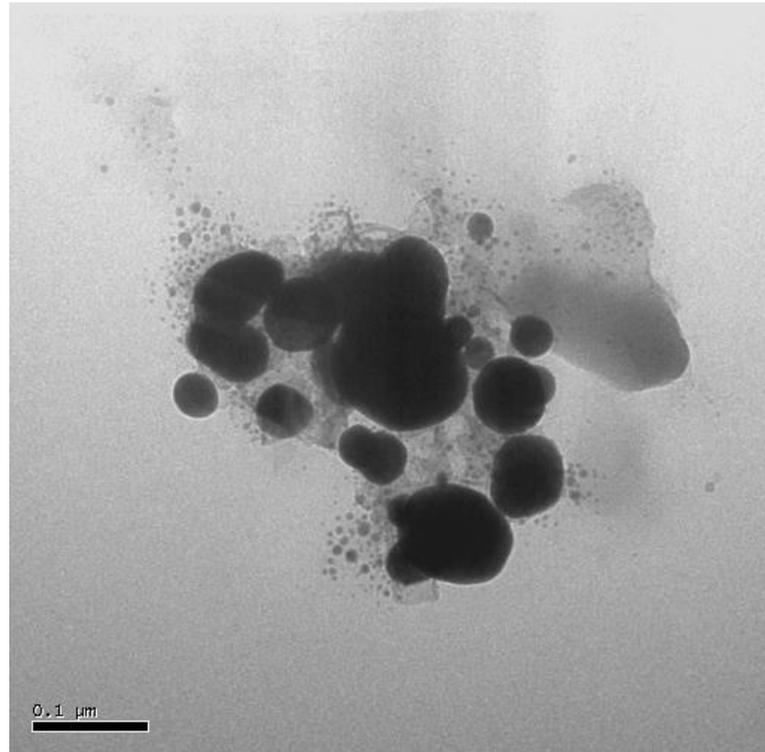


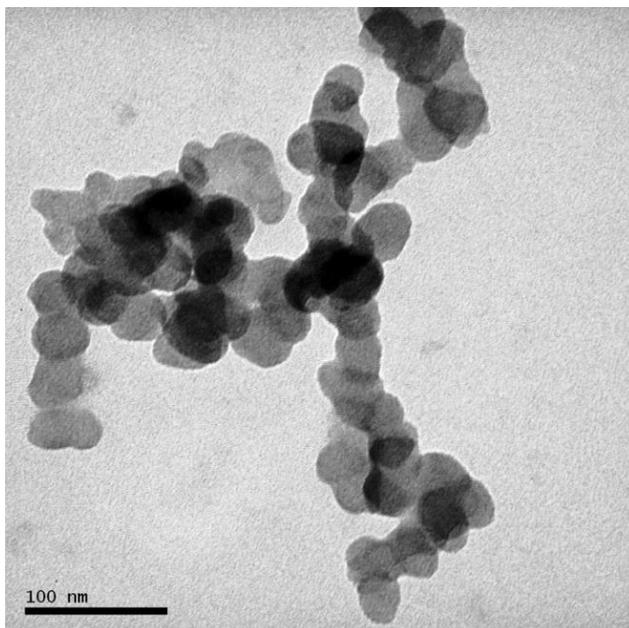
Figura 15. Representação das AgNPs estabilizadas por citrato de sódio em: **(a)** pH = 6,0 e **(b)** pH = 3,0.

4.1.2 MET

A **Figura 16** apresenta as imagens de MET das AgNPs em pH = 3,0 e pH = 6,0. Como pode ser observado, as AgNPs encontram-se menos aglomeradas em pH = 6,0 do que em pH = 3,0. Isto ocorre porque, à medida que a concentração de íons H_3O^+ aumenta (menor valor de pH), a densidade de carga sobre os íons citrato diminui, fazendo com que as AgNPs fiquem menos estabilizadas (Bao et al., 2005) e conseqüentemente mais aglomeradas. Além disso, as nanopartículas de ambas as soluções apresentaram formato esférico e o diâmetro médio das AgNPs em pH = 6,0 foi de aproximadamente 28 nm, como pode ser observado no histograma da distribuição de tamanhos da **Figura 16b**.



(a)



(b)

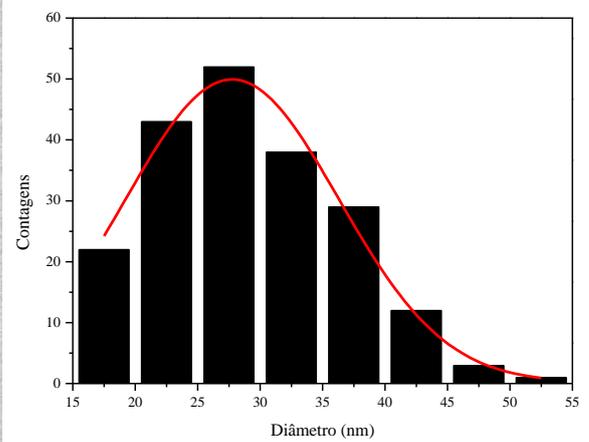


Figura 16. Imagem de MET das AgNPs em: (a) pH = 3,0 e (b) pH = 6,0. O *inset* em (b) representa o histograma da distribuição de tamanhos das AgNPs.

4.2 Teste de Difusão em Ágar

Como foi mencionado anteriormente, apenas o sistema $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$ com AgNPs em $pH = 6,0$ e reticulado com glutaraldeído apresentou *halo* que sugere inibição no crescimento do micro-organismo *E. coli* (bactéria Gram-negativa). Esse resultado preliminar mostrou que a incorporação das AgNPs nos filmes depende tanto do pH da solução coloidal de prata, como do pH das soluções dos polieletrólitos.

Além disso, o segundo conjunto de ensaios mostrou que os filmes com AgNPs apresentam igualmente ação inibitória contra bactérias Gram-positivas, como é o caso do *S. aureus*. De modo geral, a maior atividade de inibição foi observada nos filmes testados contra a bactéria *E. coli*, uma vez que micro-organismos Gram-negativos apresentam uma camada de peptidoglicanos a nível de parede celular muito menos espessa do que os micro-organismos Gram-positivos, o que acaba facilitando a entrada e conseqüentemente a migração das AgNPs para o interior da *E. coli*, aumentando a eficiência de inibição (Durán et al., 2010).

Uma vez que a área de contato dos substratos de vidro com o ágar é muito pequena, devido à fina espessura das mesmas, os *halos* formados nas placas de Petry são discretos (**Figura 17**), tendo em vista que provavelmente não ocorreu a lixiviação de prata neste teste (Li et al., 2006).

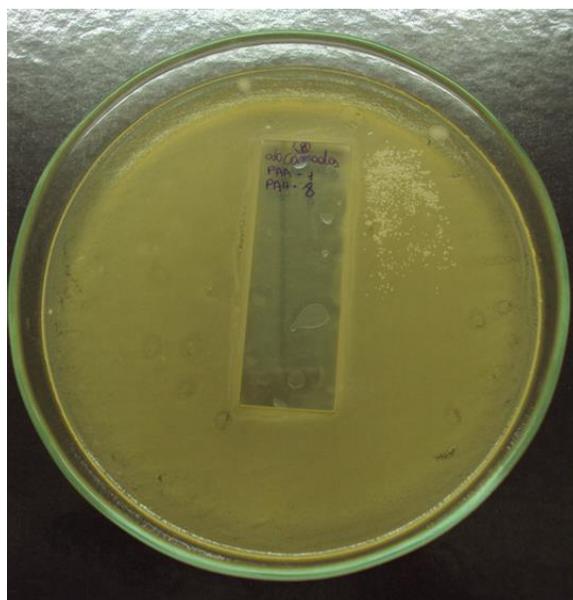


Figura 17. Imagem do teste de difusão em ágar do filme $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$, imerso por 1 h em solução de AgNPs em $pH = 6,0$ e reticulado com glutaraldeído.

Os filmes $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$ imersos em solução de AgNPs a $pH = 3,0$ não apresentaram atividade bactericida, pois nessas condições as AgNPs estão menos estabilizadas pelos ânions citrato, o que acaba dificultando a incorporação das mesmas no PEM (Machado et al., 2011).

A atividade bactericida também é pouco evidenciada nos filmes $(PAH_{4,0}/PAA_{4,0})_{20}$, pois nessas condições os grupos $-NH_3^+$ do PAH estão totalmente interligados eletrostaticamente com os grupos $-COO^-$ do PAA, não restando grupos $-NH_3^+$ livres para promover interações com as cargas negativas da solução coloidal de prata (Decher e Schlenoff, 2002; Choi e Rubner, 2005), o que reduz a incorporação das AgNPs nos filmes finos. Na **Figura 18** pode-se visualizar a formação de um pequeno *halo* ao redor do slide que contém o filme $(PAH_{4,0}/PAA_{4,0})_{20}$, imerso por 1 h em solução de AgNPs em $pH = 3,0$, porém o resultado não foi o esperado, uma vez que houve um crescimento considerável da colônia de bactérias embaixo da lâmina de vidro, levando ao deslocamento da mesma.

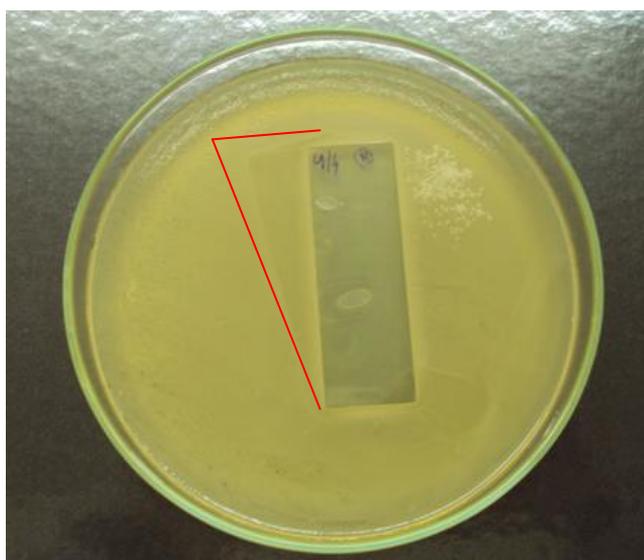


Figura 18. Imagem do teste de difusão em ágar do filme $(PAH_{4,0}/PAA_{4,0})_{20}$, imerso por 1 h em solução de AgNPs em $pH = 3,0$ e reticulado com glutaraldeído.

Finalmente, os ensaios microbiológicos mostraram igualmente que o tempo de incorporação das AgNPs interfere diretamente na atividade bactericida dos filmes. Um maior tempo de imersão em solução coloidal de prata potencializa a ação bactericida, devido a uma maior incorporação de nanopartículas. O teste realizado após a difusão das AgNPs por 4 h apresentou uma maior transparência em relação àqueles de 1 e 2 h, tanto para *E. coli* (**Figuras**

19a, 19b e 19c) como para *S. aureus* (Figuras 19d, 19e e 19f), praticamente não evidenciando crescimento de nenhuma cepa bacteriana sob e sobre o slide.

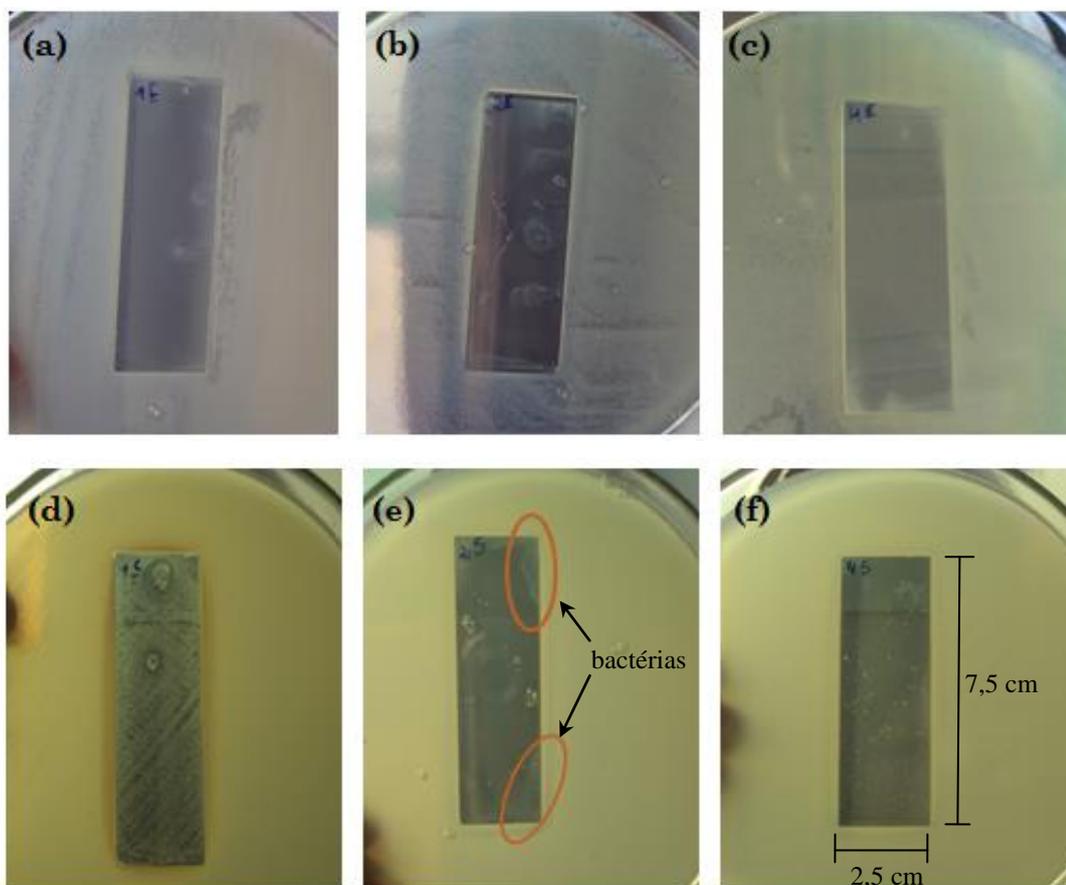


Figura 19. Resultado do ensaio microbiológico para o filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀ com AgNPs em pH = 6,0 e reticulado com glutaraldeído: (a) imersão por 1 h; (b) imersão por 2 h; (c) imersão por 4 h em solução de AgNPs contra *E. coli*; (d) imersão por 1 h; (e) imersão por 2 h; (f) imersão por 4 h em solução de AgNPs contra *S. aureus*.

4.3 Caracterização dos Filmes com AgNPs

4.3.1 UV-Vis

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀ imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído (**Figura 20**) mostram a presença de uma única banda de absorção centrada em 423, 427 e 433 nm, respectivamente. A presença da banda de absorção característica da prata em torno de 400 nm (Revina et al., 2001; Pal et al., 2007) evidencia a incorporação de AgNPs nos filmes produzidos.

A absorvância do filme imerso em solução de AgNPs por 4 h apresentou a maior intensidade, conforme era esperado. No entanto, a absorvância do filme imerso em solução de

AgNPs por 2 h apresentou intensidade menor do que a do filme que foi imerso em solução de AgNPs por 1 h.

Ao permanecer por apenas 1 h na solução de prata, ocorre a incorporação superficial das AgNPs no filme, não havendo tempo para as nanopartículas migrarem para as camadas mais internas. Na imersão por 2 h, as AgNPs iniciam a migração nas camadas do filme, mas como a última camada depositada (PAA) é também carregada negativamente, ocorre a repulsão entre as cargas de mesmo sinal e as AgNPs acabam sendo repelidas pelo filme reduzindo, inclusive, sua incorporação na superfície. Quando a imersão é de 4 h, as AgNPs migram para as camadas mais internas chegando até a camada de PAH, que é carregada positivamente, e ocorrem interações entre as AgNPs e os grupos $-\text{NH}_3^+$ livres do PAH, ocasionando assim uma maior incorporação de prata nos filmes.

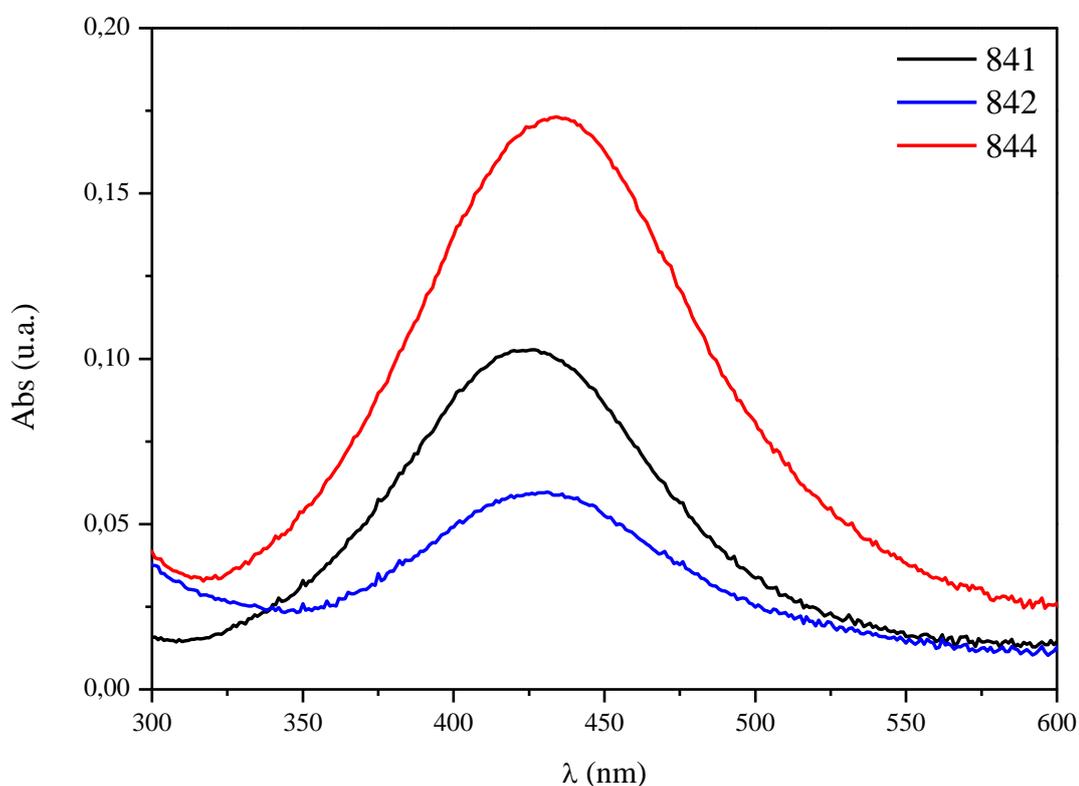


Figura 20. Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$, imersos em solução de AgNPs em $\text{pH} = 6,0$ por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído.

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$, imersos em solução de AgNPs em $\text{pH} = 6,0$ por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído (**Figura 21**), apresentam uma banda em 450, 483 e 465 nm, respectivamente. Embora essas bandas não sejam tão bem definidas como para o filme

(PAH_{8,0}/PAA_{4,0}), as mesmas encontram-se igualmente na região de absorção característica da prata, o que sugere que a incorporação das AgNPs também aconteceu.

A menor intensidade de absorção visualizada nos espectros da **Figura 21**, em comparação aos da **Figura 20**, comprovam que ocorreu uma menor incorporação das AgNPs nos filmes em que ambos os polieletrólitos apresentam pH = 4,0. Esse comportamento é explicado, uma vez que nesse pH os grupos $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{COO}^-$ estão totalmente interligados eletrostaticamente não restando grupos $-\text{NH}_3^+$ no PAH para promover a interação com as AgNPs (Choi e Rubner, 2005). Ainda, nessa condição de pH, os filmes formados são mais finos do que em pHs distintos (8,0/4,0), pois as cadeias do PAH estão em uma conformação mais linear do que em pH superior. Dessa forma, a superfície para a incorporação das AgNPs é reduzida, o que justifica a não formação de *halos* de inibição nos ensaios microbiológicos.

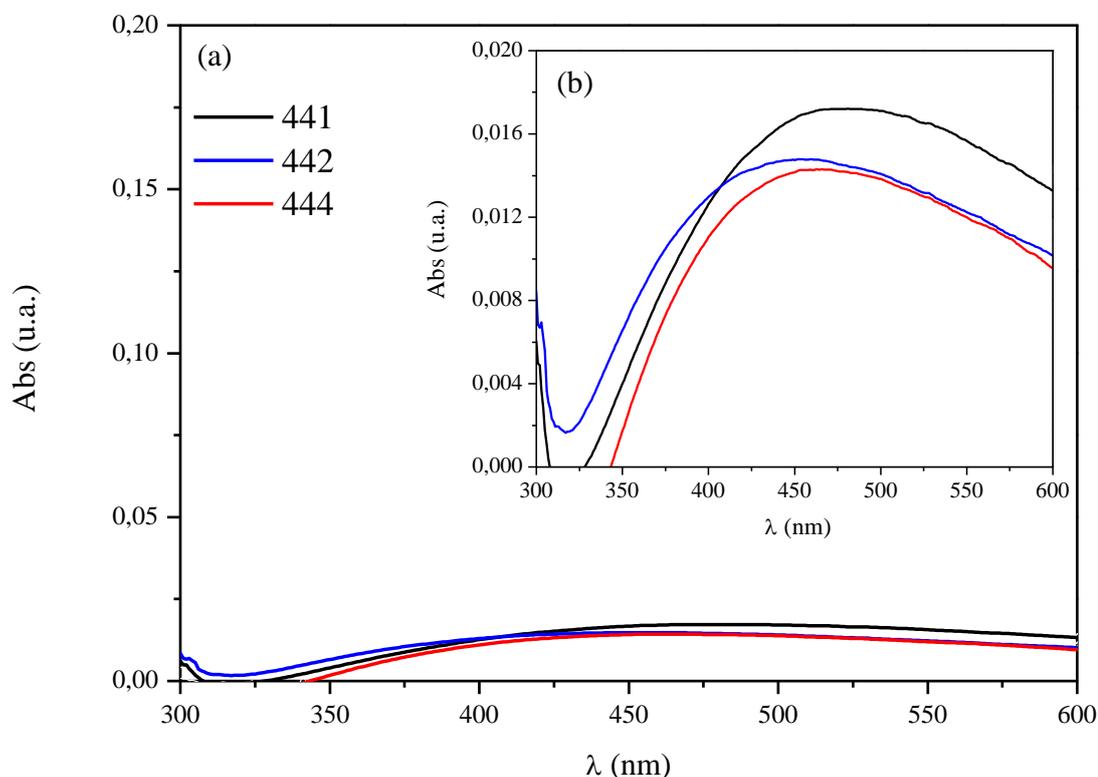


Figura 21. (a) Espectros de absorção molecular na região do UV-Vis dos filmes (PAH_{4,0}/PAA_{4,0})₂₀, imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. (b) Detalhe de (a) para melhor visualização dos picos.

4.3.2 GD-OES

Os perfis de concentração de prata, bem como do filme polimérico nas amostras produzidas, estão representados nas **Figuras 22 e 23**.

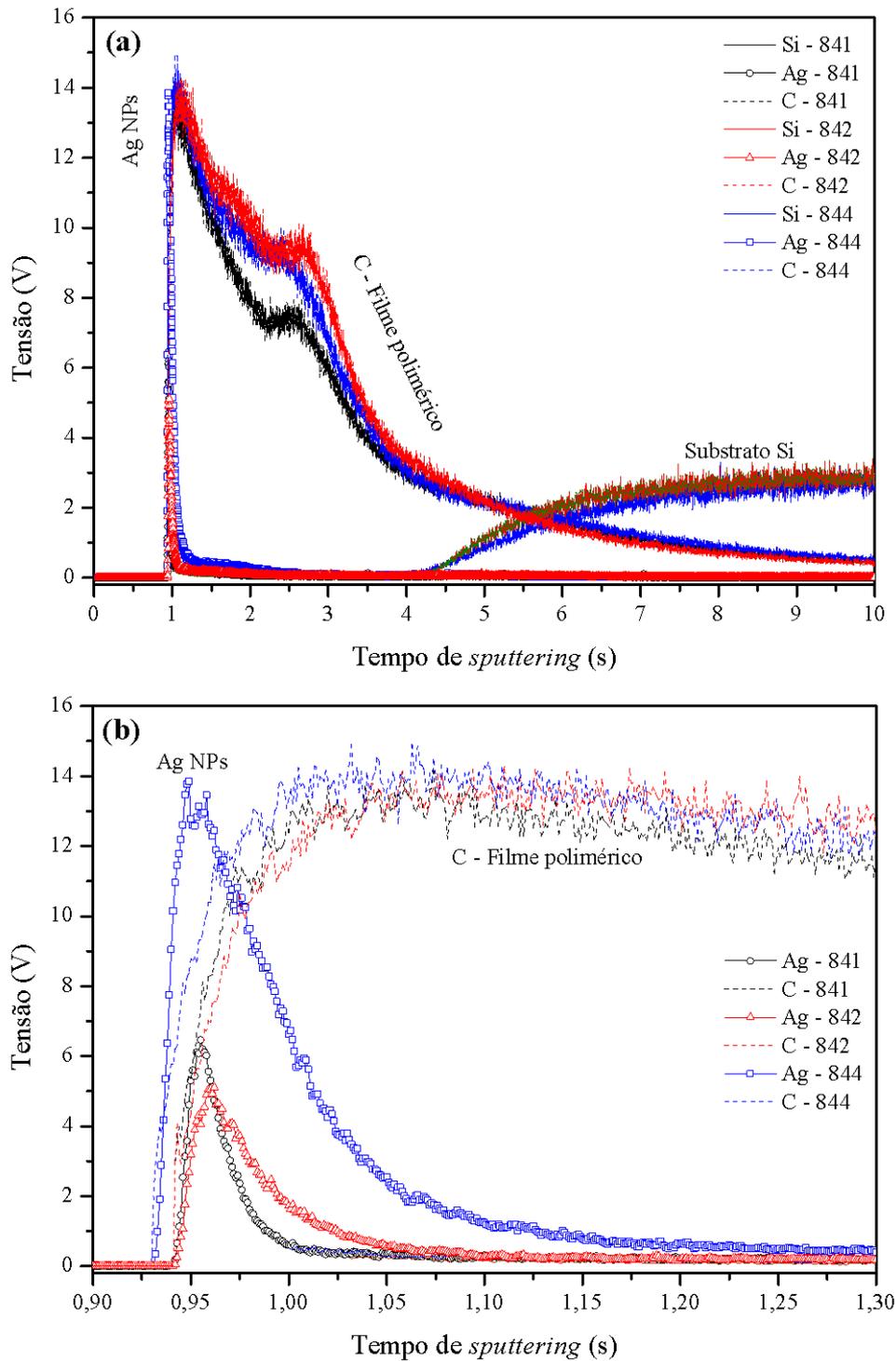


Figura 22. (a) Perfil de concentração de prata dos filmes $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$, imersos em solução de AgNPs em $\text{pH} = 6,0$ por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. (b) Detalhe de (a) para melhor visualização do filme polimérico e das AgNPs.

Na **Figura 22a**, o filme polimérico pode ser visualizado no tempo de *sputtering* de 1,0 a 5,0 s. Após 5,0 s, ocorre a identificação do substrato de silício e a tensão do filme polimérico diminui. Comparando as **Figuras 22a** e **23a**, pode-se concluir que o filme produzido em pHs distintos (8,0/4,0) possui maior espessura em relação ao filme produzido em pHs iguais (4,0/4,0), o que é corroborado pela **Figura 6** que representa a conformação dos polieletrólitos no filme.

Ao analisar a **Figura 23a**, pode-se verificar que o filme polimérico aparece no tempo de *sputtering* de 0,8 a 2,0 s, momento em que o silício (substrato utilizado na deposição do filme) aparece, evidenciando que a partir deste tempo não há mais filme polimérico, restando apenas o substrato.

Com relação à camada de prata presente nas amostras, as **Figuras 22b** e **23b** mostram que para ambos os filmes (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀ e (PAH_{4,0}/PAA_{4,0})₂₀ a camada de prata formada concentra-se em sua maior parte na superfície do filme. Para o sistema em que os pHs são iguais, verifica-se que a tensão da prata apresenta valores maiores para o filme que ficou 4 h imerso em solução de prata, seguido dos filmes imersos por 2 e 1 h, respectivamente. Já para o sistema em que os pHs dos polieletrólitos são distintos (8,0/4,0), observa-se o mesmo comportamento apresentado pela técnica de UV-Vis. A maior tensão de prata é apresentada pelo filme imerso por 4 h, seguido pelos filmes imersos por 1 e 2 h, respectivamente.

Comparando as tensões de prata apresentadas nas **Figuras 22b** e **23c**, que são um detalhe das **Figuras 22a** e **23a**, respectivamente, torna-se evidente que nos filmes para o sistema (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀ ocorreu maior incorporação de AgNPs do que nos filmes para o sistema (PAH_{4,0}/PAA_{4,0})₂₀, pois em pHs iguais, a protonação dos polieletrólitos propicia a interação entre os grupos funcionais do PAH e PAA, diminuindo a densidade de carga no filme, o que dificulta a incorporação das AgNPs.

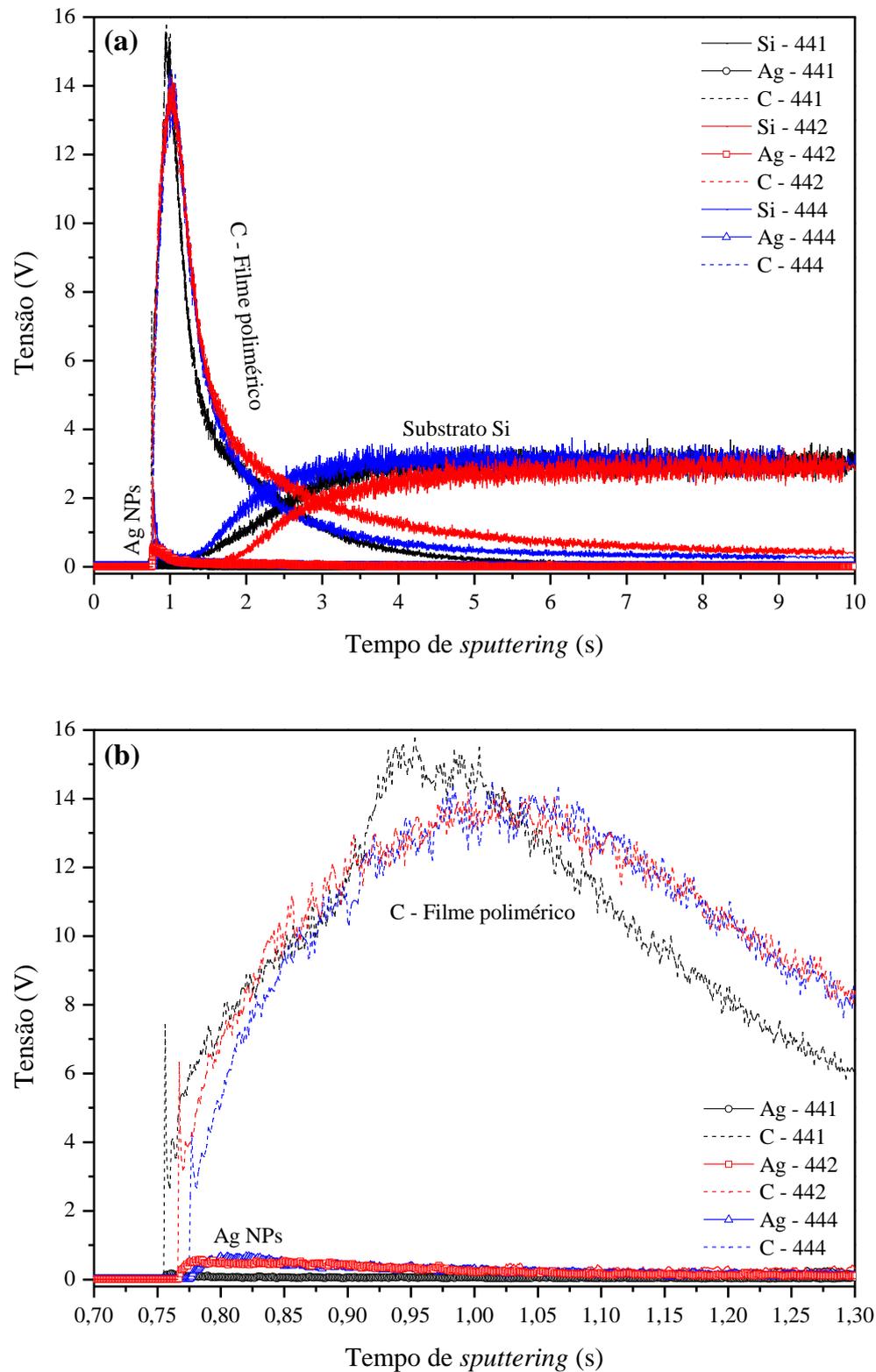


Figura 23. (a) Perfil de concentração de prata dos filmes (PAH_{4,0}/PAA_{4,0})₂₀, imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído. (b) Detalhe de (a) para melhor visualização do filme polimérico (continua na página seguinte).

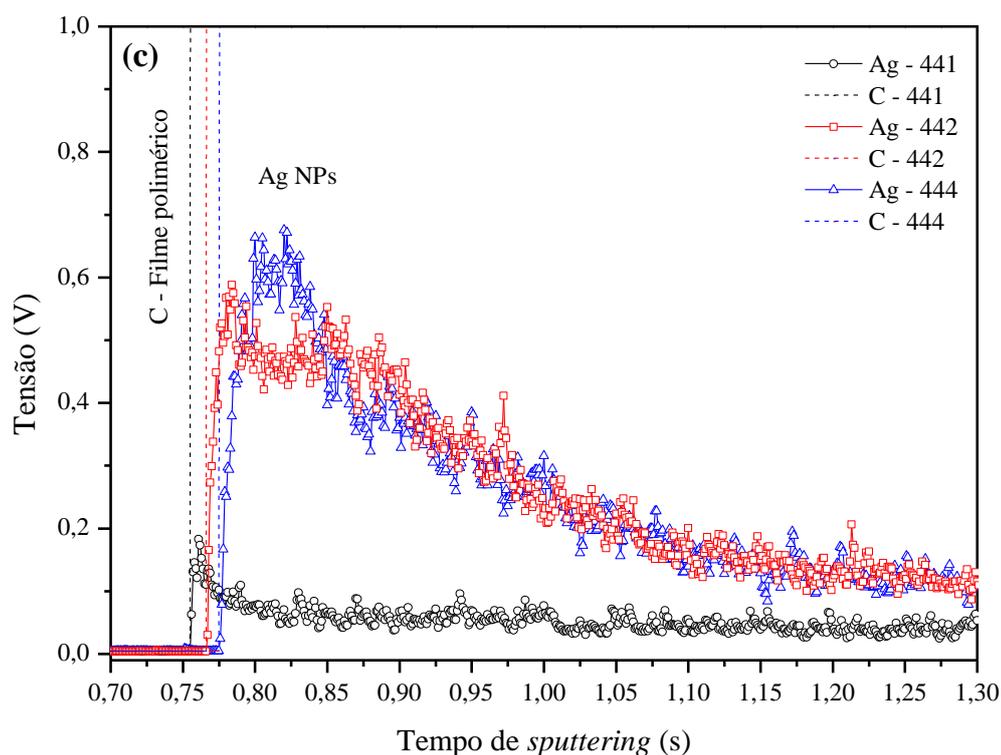


Figura 23. Continuação. (c) Detalhe de (a) para melhor visualização das AgNPs.

4.3.3 RBS

A **Figura 24** apresenta a concentração de átomos de prata por cm^2 dos filmes $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$ e $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$, imersos em solução de AgNPs em $\text{pH} = 6,0$ por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído.

As amostras do sistema $(\text{PAH}_{4,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$ apresentaram uma menor quantidade de átomos de prata em cada tempo de imersão, quando comparadas às amostras do sistema $(\text{PAH}_{8,0}/\text{PAA}_{4,0})_{20}$, corroborando as análises de UV-Vis e GD-OES. A única exceção observada foi para a amostra 442. A explicação para este resultado é que quando os polieletrólitos PAH e PAA estão combinados em multicamadas, em pHs iguais (4,0/4,0), não existem grupos funcionais livres para interagir com as cargas negativas das AgNPs. Dessa forma, as AgNPs não conseguem entrar nas multicamadas dos filmes, mas também não são repelidas. Assim, a incorporação das AgNPs ocorre de forma cumulativa: quanto maior o tempo de imersão, maior será a quantidade de prata incorporada. Para o sistema em que os pHs do PAH e do PAA são distintos (8,0/4,0), na imersão por 2 h, as AgNPs são repelidas pelos grupos ácidos do PAA (última camada depositada), conforme já foi discutido na seção 4.3.1.

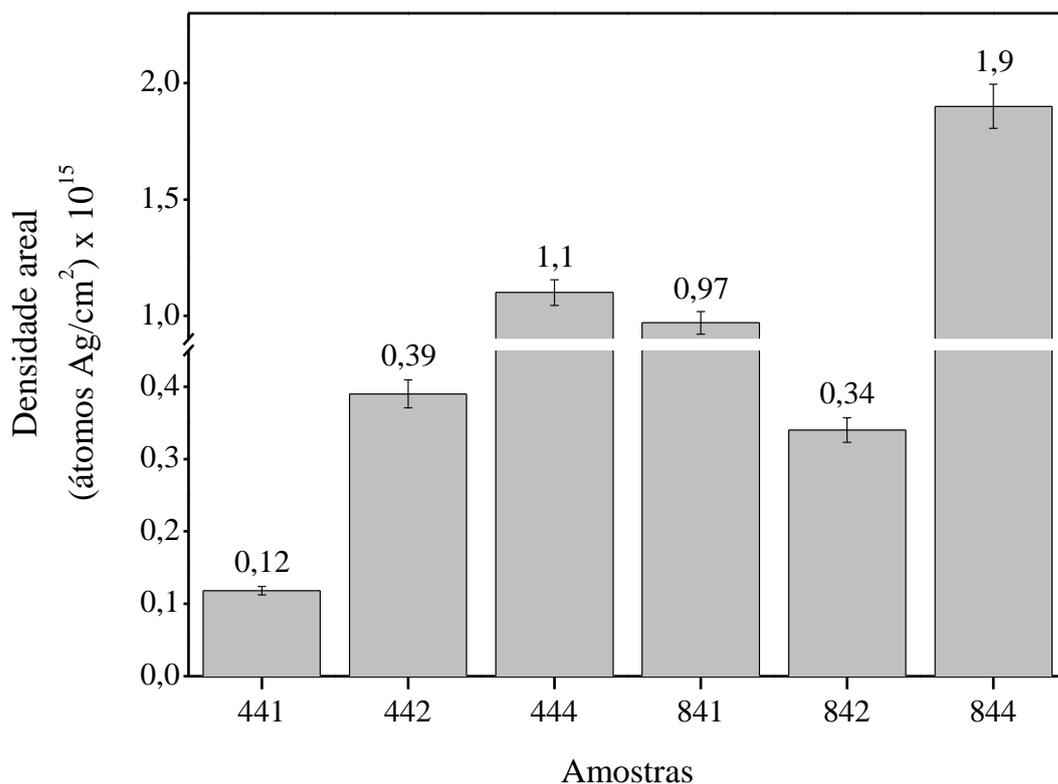


Figura 24. Densidade areal dos filmes $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$ e $(PAH_{4,0}/PAA_{4,0})_{20}$, imersos em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 1, 2 e 4 h e reticulados com glutaraldeído.

Os valores para a densidade areal das AgNPs em cada amostra evidenciam que a maior incorporação de AgNPs ocorreu para o filme $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$ com AgNPs em pH = 6,0, através da imersão por 4 h em solução coloidal de prata e reticulado com glutaraldeído. Esses resultados justificam a maior eficiência bactericida observada com o aumento do tempo de incorporação da solução de AgNPs.

4.3.4 MET

A técnica de MET foi utilizada para avaliar a morfologia e distribuição das AgNPs nos filmes automontados. A **Figura 25** mostra apenas a secção transversal do filme $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$, imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído.

Como pode ser observado, as AgNPs encontram-se distribuídas de maneira aleatória (não uniforme) e estão ligeiramente mais “concentradas” na superfície do filme analisado. Além disso, a imagem de MET revela a presença de alguns aglomerados de nanopartículas (pontos maiores e mais escuros) e que as AgNPs possuem formato esférico e um diâmetro

médio de aproximadamente 30 nm, que é similar ao tamanho das AgNPs em pH = 6,0 (Figura 16 b).

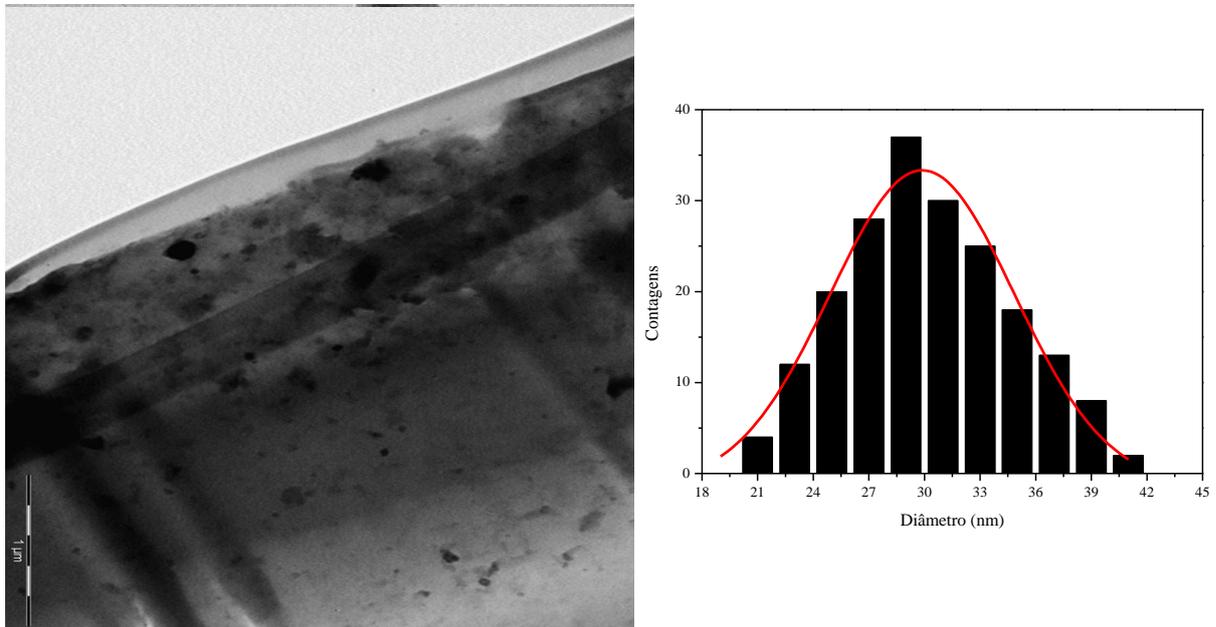


Figura 25. Imagem de MET do filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀, imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído. O *inset* ao lado representa o histograma da distribuição de tamanhos das AgNPs no filme analisado.

4.4 Tratamento Microbiológico de Efluente Industrial para Reuso

4.4.1 Utilização dos Filmes com AgNPs no Tratamento de um Efluente Industrial

O filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀ foi escolhido para ser utilizado no tratamento de um efluente industrial para reuso pelo fato de ter apresentado o melhor resultado em termos de eficiência bactericida nos testes de difusão em ágar, bem como por ter incorporado a maior quantidade de prata, de acordo com os resultados de caracterização que serão discutidos a seguir.

Em um primeiro ensaio, os filmes produzidos foram imersos em 250 mL de efluente industrial para reuso em diferentes tempos de contato. No final do tratamento, procedeu-se à contagem dos coliformes totais em cada um dos ensaios realizados. A influência do tempo de contato dos filmes no percentual de remoção de coliformes totais pode ser visualizada na **Figura 26**. É possível observar que após 5 min ocorreu uma redução de aproximadamente 27% dos coliformes presentes na amostra inicial (efluente sem tratamento). Após 15 min, mais da metade dos micro-organismos haviam sido eliminados e, após 360 min, em torno de 89,6% dos coliformes foram removidos.

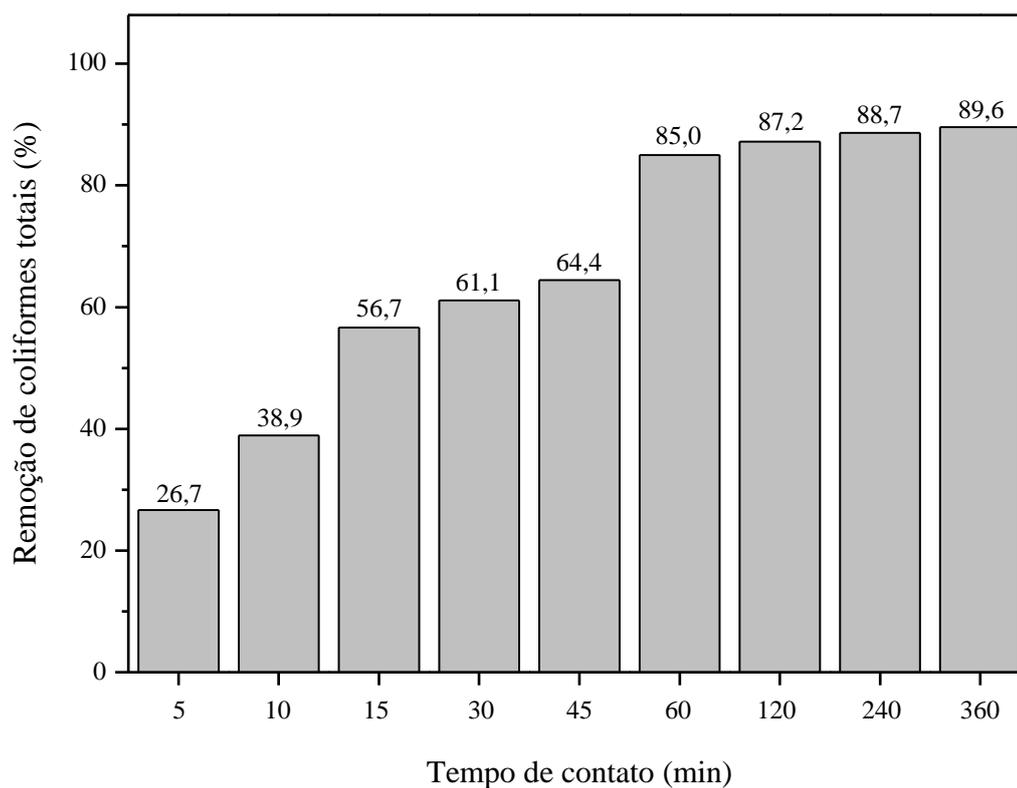


Figura 26. Influência do tempo de contato dos filmes $(PAH_{8,0}/PAA_{4,0})_{20}$, imersos em solução de AgNPs em $pH = 6,0$ por 4 h e reticulados com glutaraldeído, na remoção de coliformes totais do efluente industrial.

A **Figura 27** mostra o percentual de remoção dos coliformes em cada tempo, bem como os resultados da remoção na reutilização em um segundo ensaio. Como pode ser observado, os valores de remoção no segundo ensaio (**Figura 27**) são muito semelhantes aos encontrados no primeiro ensaio (**Figura 26**).

No segundo ensaio, verificou-se que quando os filmes foram reutilizados, a remoção de coliformes foi maior do que na primeira utilização, uma vez que a quantidade de prata lixiviada é superior àquela da primeira utilização.

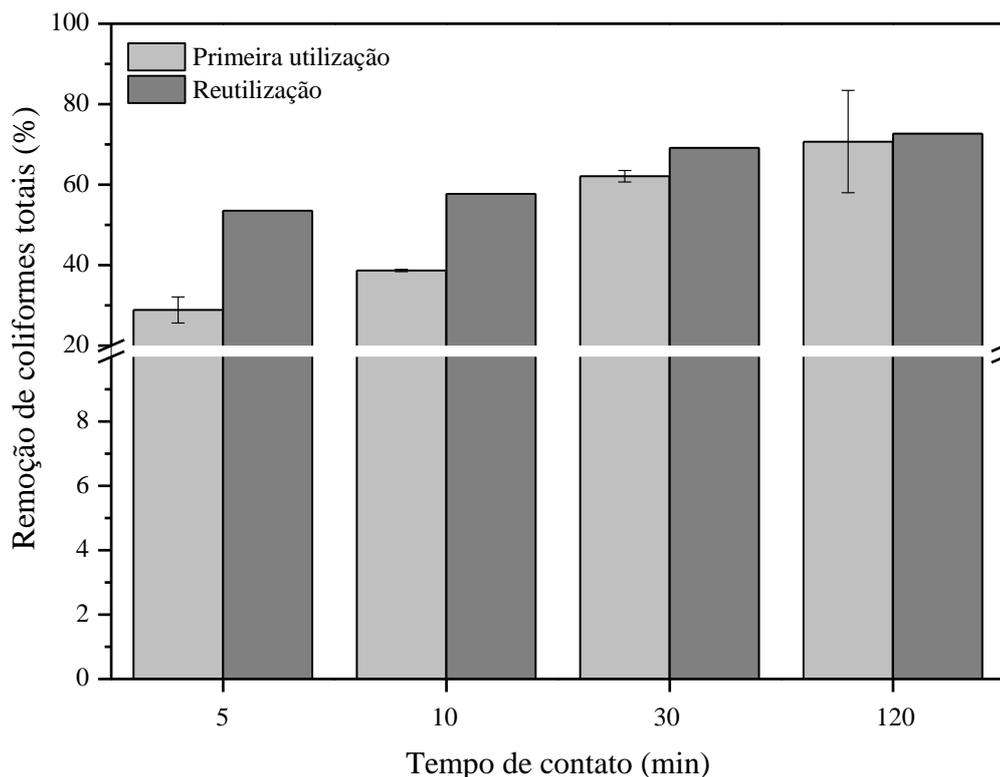


Figura 27. Influência do tempo de contato do filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀, imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído, na remoção de coliformes totais do efluente industrial em uma primeira utilização e na reutilização.

4.4.1.1 Quantificação de Prata no Efluente Industrial

A **Tabela 4** apresenta os resultados referentes à concentração de prata no efluente industrial para reuso, no primeiro ensaio realizado, após o tratamento do mesmo com o filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀, imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído.

Como pode ser observado, o efluente bruto não possui prata na sua composição e, além disso, os filmes produzidos nesse trabalho possuem atividade bactericida sobre os coliformes, tanto através do contato como pela lixiviação da prata no efluente, uma vez que no tempo de 5 min apesar de não ocorrer lixiviação de prata, 26,7% dos coliformes foram removidos. Nos tempos seguintes, a lixiviação ocorreu, mas foi pequena chegando ao máximo de 0,003 mg/L após 360 min de tratamento, o que representa apenas 3% da quantidade máxima de prata permitida por lei em efluentes para reuso (Brasil, 2011).

A quantificação total de prata presente nos filmes produzidos foi realizada para verificar o percentual de prata que é lixiviado em cada teste, bem como para avaliar a

possibilidade de reutilização dos filmes em novos tratamentos de efluentes. A quantidade de prata presente em um filme não utilizado foi de 0,058 mg/L.

Tabela 4. Concentração de prata no efluente industrial para reuso após o tratamento com o filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀.

Tempo (min)	Quantidade de prata (mg/L)
0	< L.D.*
5	< L.D.
10	0,001
15	0,001
30	0,002
45	0,002
60	0,002
120	0,002
240	0,002
360	0,003

*L.D.: limite de detecção do método

No primeiro ensaio realizado verificou-se que apenas 5% da prata total do filme foi lixiviada após 360 min. Dessa forma realizou-se um segundo ensaio, utilizando apenas os tempos em que foram observados os maiores percentuais de redução de coliformes totais. Além de uma primeira utilização, os filmes foram reutilizados para avaliar a eficiência bactericida, bem como a quantidade de prata lixiviada no efluente tratado em um processo de reutilização.

Os resultados da **Tabela 5** mostram que na reutilização dos filmes houve maior lixiviação de prata do que na primeira utilização. Isso se deve ao fato de que no ensaio em que os substratos foram reutilizados, o filme encontra-se inchado devido ao contato com o efluente, o que provavelmente facilita esse processo. Dessa forma, para um mesmo tempo de imersão dos filmes no efluente, a remoção dos coliformes foi superior quando os filmes foram reutilizados.

Tabela 5. Concentração de prata no efluente industrial para reuso na primeira utilização e na reutilização dos filmes.

Tempo (min)	Quantidade de prata (mg/L) Primeira utilização	Quantidade de prata (mg/L) Reutilização
0	< L.D.*	< L.D.
5	< L.D.	< L.D.
10	0,002	0,002
30	0,002	0,003
120	0,002	0,003

*L.D.: limite de detecção do método

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram produzidos e caracterizados filmes de poli(hidrocloro de alilamina) (PAH) e poli(ácido acrílico) (PAA) com nanopartículas de prata (AgNPs), visando o desenvolvimento de um novo material que pudesse ser utilizado como agente bactericida no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso.

Em geral, a incorporação das nanopartículas nos filmes foi dependente tanto do pH da solução coloidal de prata, como do pH das soluções dos polieletrólitos, conforme mostraram os resultados das análises de caracterização.

Dentre todos os sistemas avaliados, o filme (PAH_{8,0}/PAA_{4,0})₂₀ imerso em solução de AgNPs em pH = 6,0 por 4 h e reticulado com glutaraldeído, foi aquele que apresentou a maior atividade bactericida, tanto em relação a micro-organismos Gram-positivos (*S. aureus*) como Gram-negativos (*E. coli*). A maior inibição, entretanto, foi observada para a *E. coli* que apresenta uma camada de peptidoglicanos menos espessa do que a *S. aureus*.

O tratamento do efluente industrial para reuso com os filmes produzidos neste trabalho reduziu em cerca de 90% a contagem total de coliformes presentes na amostra inicial, tanto pelo contato como pela lixiviação de prata.

Finalmente, considerando-se a facilidade de aplicação, o baixo impacto ambiental, os custos reduzidos e ação inibidora satisfatória, os filmes desenvolvidos neste trabalho apresentam um grande potencial para serem utilizados como auxiliares no tratamento microbiológico de efluentes industriais.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A presente dissertação apresentou contribuições significativas para a gestão sustentável da água e sua reutilização através do desenvolvimento de um material que pode ser utilizado no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso.

Visando aprimorar ainda mais a qualidade do material que foi desenvolvido neste trabalho, pretende-se realizar as seguintes ações no doutorado:

- Sintetizar AgNPs utilizando métodos diferentes do utilizado nesta dissertação e avaliar a influência dessas novas nanopartículas de prata (em termos de tamanho e morfologia) frente a micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos;
- Avaliar a eficiência bactericida destas novas nanopartículas de prata diante de outros micro-organismos (*Salmonella sp.*; *Enterobacter sp.*, entre outros);
- Avaliar a eficiência bactericida destas novas nanopartículas de prata no tratamento microbiológico de diferentes tipos de efluentes industriais que contenham coliformes;
- Variar o número de camadas dos polieletrólitos nos filmes, alterando a camada final para PAH e verificar se a incorporação de AgNPs aumenta ou diminui;
- Avaliar a vida útil do material desenvolvido, reutilizando-o mais vezes em um mesmo ensaio.

7 REFERÊNCIAS

Archer, G. L. *Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen*, *Clinical Infectious Diseases*, v. 26, p. 1179-1181, 1998.

Ariga, K.; Hill, J. P.; Ji, Q. *Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application*, *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 9, p. 2319-2340, 2007.

Bao, H.; Chumanov, G.; Czerw, R.; Carroll, D.; Foulger, S. *Synthesis of core-shell silver colloidal particles by surface immobilization of an azo-initiator*, *Colloid and Polymer Science*, v. 283, p. 653-661, 2005.

Beppu, M. M.; Arruda, E. J.; Santana, C. C. *Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana*, *Polímeros*, v. 9, p. 163-169, 1999.

Blough, H. A. *Selective inactivation of biological activity of myxoviruses by glutaraldehyde*, *Journal of Bacteriology*, v. 92, p. 266-268, 1966.

Borick, P. M.; Dondershine, F. H.; Chandler, V. L. *Alkalinized glutaraldehyde, a new antimicrobial agent*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, p. 1273-1275, 1964.

Borick, P. M. *Chemical sterilizers (chemosterilizers)*, *Advances in Applied Microbiology*, v. 10, p. 291-312, 1968.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, *Instrução Normativa SDA nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água*. Diário Oficial da União, 18 set. 2003.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente - Conselho Nacional do Meio Ambiente, *Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA*. Diário Oficial da União, 16 maio 2011.

Burke, S. E.; Barrett, C. J. *Acid-base equilibria of weak polyelectrolytes in multilayer thin films*, *Langmuir*, v. 19, p. 3297-3303, 2003.

Carreira, C. d. M. Avaliação in vitro do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata, Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 2009.

Caruso, F.; Caruso, R. A.; Möhwald, H. Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating, *Science*, v. 282, p. 1111-1114, 1998.

Cepeda, J. A.; Whitehouse, T.; Cooper, B.; Hails, J.; Jones, K.; Kwaku, F.; Taylor, L.; Hayman, S.; Cookson, B.; Shaw, S.; Kibbler, C.; Singer, M.; Bellingan, G.; Wilson, A. P. R. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two centre study, *The Lancet*, v. 365, p. 295-304, 2005.

Chen, Y.; Wang, L.; Jiang, S.; Yu, H. Study on novel antibacterial polymer materials (I) preparation of zeolite antibacterial agents and their antibacterial properties, *Journal of Polymer Materials*, v. 20, p. 279-284, 2003.

Chen, X.; Mao, S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications, *Chemical Reviews*, v. 107, p. 2891-2959, 2007.

Cheng, Y.; Wang, X.; Cheng, J.; Sun, L.; Xu, W.; Zhao, B. Structure and phase transition in self-assembled films of an anti-ferroelectric liquid crystal studied by two-dimensional correlation FTIR spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 61, p. 905-911, 2005.

Chia, K.-K.; Cohen, R. E.; Rubner, M. F. Amine-rich polyelectrolyte multilayer nanoreactors for in situ gold nanoparticle synthesis, *Chemistry of Materials*, v. 20, p. 6756-6763, 2008.

Chohan, Z. H.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A. Metalloantibiotics: synthesis and antibacterial activity of cobalt(II), copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of kefzol, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 79-84, 2004.

Choi, J.; Rubner, M. F. Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly, *Macromolecules*, v. 38, p. 116-124, 2005.

Chowdhury, P.; Singha, B.; Mukherjee, A.; Pandit, S. K. Synthesis of cross-linked graft copolymer from acrylic acid, poly(vinyl alcohol), and glutaraldehyde for extraction of lead ion from aqueous solution, *Fibers and Polymers*, v. 10, p. 562-567, 2009.

Cík, G.; Bujdaková, H.; Sersen, F. Study of fungicidal and antibacterial effect of the Cu(II)-complexes of thiophene oligomers synthesized in ZSM-5 zeolite channels, *Chemosphere*, v. 44, p. 313-319, 2001.

Colvin, V. L.; Schlamp, M. C.; Alivisatos, A. P. Light-emitting diodes made from cadmium selenide nanocrystals and a semiconducting polymer, *Nature*, v. 370, p. 354-357, 1994.

Crane, R. A.; Scott, T. B. Nanoscale zero-valent iron: Future prospects for an emerging water treatment technology, *Journal of Hazardous Materials*, v. 211–212, p. 112-125, 2012.

Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Brett, C. M. A.; Oliveira, O. N.; Nart, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, p. 17478-17483, 2006.

Crouzier, T.; Boudou, T.; Picart, C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 15, p. 417-426, 2010.

Dabbousi, B. O.; Bawendi, M. G.; Onitsuka, O.; Rubner, M. F. Electroluminescence from CdSe quantum-dot/polymer composites, *Applied Physics Letters*, v. 66, p. 1316-1318, 1995.

Dal'Acqua, N. Preparação e caracterização de filmes nanoestruturados suportados em membrana de celulose contendo nanopartículas de Au e TiO₂ para produção de H₂, Universidade de Caxias do Sul, Dissertação de Mestrado, 2013.

Damm, C.; Neumann, M.; Münstedt, H. Properties of nanosilver coatings on polymethyl methacrylate, *Soft Materials*, v. 3, p. 71-88, 2005.

Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, *Science*, v. 277, p. 1232-1237, 1997.

Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces, *Thin Solid Films*, v. 210–211, p. 831-835, 1992.

Decher, G.; Schlenoff, J. B. *Multilayer thin film*. Weinheim, Wiley-VCH, 2002.

Drelich, J.; Li, B.; Bowen, P.; Hwang, J.-Y.; Mills, O.; Hoffman, D. Vermiculite decorated with copper nanoparticles: novel antibacterial hybrid material, *Applied Surface Science*, v. 257, p. 9435-9443, 2011.

Dubas, S. T.; Kumlangdudsana, P.; Potiyaraj, P. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 289, p. 105-109, 2006.

Durán, N.; Matosso, L. H. C.; Morais, P. C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e Exemplos de Aplicação. Artliber, 2006.

Durán, N.; Marcato, P. D.; Conti, R. D.; Alves, O. L.; Costa, F. T. M.; Brocchi, M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 949-959, 2010.

Emmanuel, E.; Hanna, K.; Bazin, C.; Keck, G.; Clément, B.; Perrodin, Y. Fate of glutaraldehyde in hospital wastewater and combined effects of glutaraldehyde and surfactants on aquatic organisms, *Environment International*, v. 31, p. 399-406, 2005.

Fattom, A. I.; Horwith, G.; Fuller, S.; Propst, M.; Naso, R. Development of staphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials, *Vaccine*, v. 22, p. 880-887, 2004.

FEI (Finnish Environment Institute). Report on glutaraldehyde. Document II—Risk assessment. FEI, Finland; 2001.

Feng, Q. L.; Wu, J.; Chen, G. Q.; Cui, F. Z.; Kim, T. N.; Kim, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 52, p. 662-668, 2000.

Ferreira, M.; Dinelli, L., R.; Wohnrath, K.; Batista, A. A.; Oliveira Jr, O. N. Langmuir–Blodgett films from polyaniline/ruthenium complexes as modified electrodes for detection of dopamine, *Thin Solid Films*, v. 446, p. 301-306, 2004.

Ferreira, M.; Fiorito, P. A.; Oliveira Jr, O. N.; Córdoba de Torresi, S. I. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the layer-by-layer (LbL) adsorption technique, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 19, p. 1611-1615, 2004.

Fox, C. L. J. Silver sulfadiazine—a new topical therapy for pseudomonas in burns: Therapy of pseudomonas infection in burns, *Archives of Surgery*, v. 96, p. 184-188, 1968.

Galembeck, A. Aplicação da técnica de decomposição dos precursores metalorgânicos (MOD) à obtenção de filmes finos de óxidos e heteroestruturas planares óxido/polímero condutor, Universidade Estadual de Campinas, Tese de Doutorado, 1998.

George, N.; Faoagali, J.; Muller, M. Silvazine™ (silver sulfadiazine and chlorhexidine) activity against 200 clinical isolates, *Burns*, v. 23, p. 493-495, 1997.

Gibbs, R.J.; Silver colloids: Do they work. [S. l.]: Edição do Autor, 1999.

Gordon, R. J.; Lowy, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. S350-S359, 2008.

Gorman, S. P.; Scott, E. M.; Russell, A. D. Antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde, *Journal of Applied Microbiology*, v. 48, p. 161-190, 1980.

Graham, J. L.; Jaeger, R. F. Inactivation of yellow fever virus by glutaraldehyde, *Applied microbiology*, v. 16, p. 177, 1968.

Hall, D. B.; Underhill, P.; Torkelson, J. M. Spin coating of thin and ultrathin polymer films, *Polymer Engineering & Science*, v. 38, p. 2039-2045, 1998.

Honse, O. S. Aplicações de polieletrólitos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Trabalho de Conclusão de Curso, 2008.

HSDB (Hazardous Substances Data Bank), 1996 HSDB (Hazardous Substances Data Bank). National Library of Medicine, National Toxicology Information Program, Bethesda, MD (TOMES CD-ROM Version). Micromedex, Denver, CO Edition expires 7/31/96).

http://www.americanaquariumproducts.com/aquarium_medication.html) acessado em 03/11/2012.

<http://annarenatav3.wordpress.com/2011/04/04/bacteria-gram-positiva-e-gram-negativa/> acessado em 20/05/13.

http://en.wikipedia.org/wiki/File:E_coli_at_10000x,_original.jpg acessado em 20/05/13.

The Food Safety File: *Staphylococcus aureus*, 2008 disponível em: http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/1485/1/2008_GustavoBalduinoLeite_reduzida.pdf (acessado em 20/05/13).

Islam, M. S.; Motahar, H. M.; Banu; Arjuman, L.; Sultana, C.; Quadir, M. A. Antibacterial and antifungal activity of mixed ligand complexes of oxovanadium (IV), titanium (III) and cadmium (II) metal ions. , *Oriental Journal Of Chemistry*, v. 19, p. 547-554, 2003.

Jain, P.; Pradeep, T. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 90, p. 59-63, 2005.

Jana, N. R., Gearheart, L., Murphy, C. J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio, *Chemical Communications*, p. 617-618, 2001.

Jesus, G. C. Filmes automontados do cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano e ftalocianina de cobre obtidos pela técnica LbL: preparação, caracterização e aplicações, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Dissertação de Mestrado, 2009.

Johnson, J. R.; Russo, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*, *International Journal of Medical Microbiology*, v. 295, p. 383-404, 2005.

Jones, N.; Ray, B.; Ranjit, K. T.; Manna, A. C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, v. 279, p. 71-76, 2008.

Jortner, J.; Rao, C. N. R. Nanostructured advanced materials. Perspectives and directions, *Pure and Applied Chemistry* v. 74, p. 1491-1506, 2002.

Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat Rev Micro*, v. 2, p. 123-140, 2004.

Key, F. S.; Maass G. Ions, atoms and charged particles. 2001. Disponível em <<http://www.silver-colloids.com/Papers/IonsAtoms&ChargedParticles.PDF>> acesso em: 14/09/2012.

Kiernan, J. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do, *Microscopy Today*, v. 00-1, p. 8-12, 2000.

Klasen, H. J. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses, *Burns*, v. 26, p. 117-130, 2000.

Kluytmans, J.; van Belkum, A.; Verbrugh, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks, *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, p. 505-520, 1997.

Kniehl, E.; Becker, A.; Forster, D. H. Bed, bath and beyond: pitfalls in prompt eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrier status in healthcare workers, *Journal of Hospital Infection*, v. 59, p. 180-187, 2005.

Kumar, A.; Vemula, P. K.; Ajayan, P. M.; John, G. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil, *Nat Mater*, v. 7, p. 236-241, 2008.

Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.-i.; Nagai, Y.; Lian, J.; Ito, T.; Kanamori, M.; Matsumaru, H.; Maruyama, A.; Murakami, H.; Hosoyama, A.; Mizutani-Ui, Y.; Takahashi, N. K.; Sawano, T.; Inoue, R.-i.; Kaito, C.; Sekimizu, K.; Hirakawa, H.; Kuhara, S.; Goto, S.; Yabuzaki, J.; Kanehisa, M.; Yamashita, A.; Oshima, K.; Furuya, K.; Yoshino, C.; Shiba, T.; Hattori, M.; Ogasawara, N.; Hayashi, H.; Hiramatsu, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *The Lancet*, v. 357, p. 1225-1240, 2001.

Lan, Y.; Wang, E.; Song, Y.; Song, Y.; Kang, Z.; Xu, L.; Li, Z. An effective layer-by-layer adsorption and polymerization method to the fabrication of polyoxometalate-polypyrrole nanoparticle ultrathin films, *Polymer*, v. 47, p. 1480-1485, 2006.

Lankalapalli, S.; Kolapalli, V. R. M. Polyelectrolyte complexes: a review of their applicability in drug delivery technology, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 71, p. 481-487, 2009.

Li, Z.; Lee, D.; Sheng, X.; Cohen, R. E.; Rubner, M. F. Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities, *Langmuir*, v. 22, p. 9820-9823, 2006.

Li, B.; Shan, C.-L.; Zhou, Q.; Fang, Y.; Wang, Y.-L.; Xu, F.; Han, L.-R.; Ibrahim, M.; Guo, L.-B.; Xie, G.-L.; Sun, G.-C. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde, *Marine Drugs*, v. 11, p. 1534-1552, 2013.

Lima, T. H. d. Modificação do cimento ortopédico com nanopartículas de prata., Universidade Federal de Minas Gerais, Dissertação de Mestrado, 2011.

Lin, W.-C.; Yu, D.-G.; Yang, M.-C. Blood compatibility of novel poly(γ -glutamic acid)/polyvinyl alcohol hydrogels, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 47, p. 43-49, 2006.

Loher, S.; Schneider, O. D.; Maienfisch, T.; Bokorny, S.; Stark, W. J. Micro-organism-triggered release of silver nanoparticles from biodegradable oxide carriers allows preparation of self-sterilizing polymer surfaces, *Small*, v. 4, p. 824-832, 2008.

Lowy, F. D. Staphylococcus aureus infections, *New England Journal of Medicine*, v. 339, p. 520-532, 1998.

Luzar, M. A.; Coles, G. A.; Faller, B.; Slingeneyer, A.; Dah, G. D.; Briat, C.; Wone, C.; Knefati, Y.; Kessler, M.; Peluso, F. Staphylococcus aureus nasal carriage and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis, *New England Journal of Medicine*, v. 322, p. 505-509, 1990.

Machado, G.; Beppu, M. M.; Feil, A. F.; Figueroa, C. A.; Correia, R. R. B.; Teixeira, S. R. Silver nanoparticles obtained in PAH/PAA-based multilayers by photochemical reaction, *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 113, p. 19005-19010, 2009.

Machado, G.; Feil, A. F.; Migowski, P.; Rossi, L.; Giovanela, M.; Crespo, J. S.; Miotti, L.; Sortica, M. A.; Grande, P. L.; Pereira, M. B.; Correia, R. R. B. Structural control of gold nanoparticles self-assemblies by layer-by-layer process, *Nanoscale*, v. 3, p. 1717-1723, 2011.

Madani, K. Dr. Hans Christian Joachim Gram: inventor of the Gram stain, *Primary Care Update for OB/GYNS*, v. 10, p. 235-237, 2003.

Marczwski, M.; Vélez, E. Ciências Biológicas. São Paulo, FTD, 1999.

McLean, R. J.; Hussain, A. A.; Sayer, M.; Vincent, P. J.; Hughes, D. J.; Smith, T. J. Antibacterial activity of multilayer silver copper surface-films on catheter material, *Canadian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 895-899, 1993.

Mendelsohn, J. D.; Barrett, C. J.; Chan, V. V.; Pal, A. J.; Mayes, A. M.; Rubner, M. F. Fabrication of microporous thin films from polyelectrolyte multilayers, *Langmuir*, v. 16, p. 5017-5023, 2000.

Moraes, J. C.; Fontoura, M. M. C.; Benvegnú, S. A. *Microbiologia – atividades Práticas*. Passo Fundo, Ed. Danielli, 2000.

Moss, B.; Squire, J. R.; Topley, E.; Johnston, C. M. Nose and skin carriage of *Staphylococcus aureus* in patients receiving penicillin, *The Lancet*, v. 251, p. 320-325, 1948.

Moyer, C. A.; Brentano, L.; Gravens, D. L.; Margraf, H. W.; Monafó, W. W.; Jr. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution, *Archives of Surgery*, v. 90, p. 812-867, 1965.

Nakane, Y.; Kubo, I. Layer-by-layer of liposomes and membrane protein as a recognition element of biosensor, *Thin Solid Films*, v. 518, p. 678-681, 2009.

Nataro, J. P.; Kaper, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 142-201, 1998.

Nguyen, M. H.; Kauffman, C. A.; Goodman, R. P.; Squier, C.; Arbeit, R. D.; Singh, N.; M. Wagener, M.; Yu, V. L. Nasal carriage of and infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patients, *Annals of Internal Medicine*, v. 130, p. 221-225, 1999.

NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health). Glutaraldehyde - occupational hazards in hospital. NIOSH, Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services, Cincinnati, OH, 2001.

Noguez, C. Surface Plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment, *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 111, p. 3806-3819, 2007.

O'Brien, H. A.; Mitchell, J. D.; Haberman, S.; Rowan, D. F.; Winford, T. E.; Pellet, J. The use of activated glutaraldehyde as a cold sterilizing agent for urological instruments, *The Journal of urology*, v. 95, p. 429-435, 1966.

Oliveira, E. M. N. Universidade Federal de Santa Catarina, Trabalho de conclusão de curso, 2006.

Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. Does the Antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 1712-1720, 2007.

Paterno, L. G.; Mattoso, L. H. C.; Oliveira Jr., O. N. d. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações, *Química Nova*, v. 24, p. 228-235, 2001.

Paulino, W. R. *Biologia: Volume único*. São Paulo, Ática, 2001.

Pepper, R. E.; Lieberman, E. R. (1962). Dialdehyde alcoholic sporicidal compositions. United States Patent No. 3,016,328.

Petrov, A. I.; Antipov, A. A.; Sukhorukov, G. B. Base–acid equilibria in polyelectrolyte systems: from weak polyelectrolytes to interpolyelectrolyte complexes and multilayered polyelectrolyte shells, *Macromolecules*, v. 36, p. 10079-10086, 2003.

Pinto, V. V.; Ferreira, M. J.; Silva, R.; Santos, H. A.; Silva, F.; Pereira, C. M. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: effect of the synthesis and storage conditions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 364, p. 19-25, 2010.

Popiolski, T. M. Avaliação da incorporação de nanopartículas de ouro em filmes automontados de polieletrólitos fracos, Universidade de Caxias do Sul, Dissertação de Mestrado, 2011.

Price, W. R.; Wood, M. Silver nitrate burn dressing: treatment of seventy burned persons, *The American Journal of Surgery*, v. 112, p. 674-680, 1966.

Priya, D. N.; Modak, J. M.; Raichur, A. M. LbL fabricated poly(styrene sulfonate)/TiO₂ multilayer thin films for environmental applications, *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 1, p. 2684-2693, 2009.

Qin, S.; Qin, D.; Ford, W. T.; Zhang, Y.; Kotov, N. A. Covalent cross-linked polymer/single-wall carbon nanotube multilayer films, *Chemistry of Materials*, v. 17, p. 2131-2135, 2005.

Qiu, H.; Bednarova, L.; Lee, W. Y. Infiltration and immobilization of catalyst particles into the confined space of microstructured reactors via layer-by-layer self-assembly, *Applied Catalysis A: General*, v. 314, p. 200-207, 2006.

Qu, X.; Brame, J.; Li, Q.; Alvarez, P. J. J. Nanotechnology for a safe and sustainable water supply: enabling integrated water treatment and reuse, *Accounts of Chemical Research*, v. 46, p. 834-843, 2012.

Qu, X.; Alvarez, P. J. J.; Li, Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment, *Water Research*, v. 47, p. 3931-3946, 2013.

Revina, A. A.; Dokuchaev, A. G.; Khailova, E. B.; Tedoradze, M. G. Optical and electrical characteristics of polymer films modified with nanostructured silver aggregates, *High Energy Chemistry*, v. 35, p. 74-78, 2001.

Rhim, J.-W.; Hong, S.-I.; Park, H.-M.; Ng, P. K. W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 5814-5822, 2006.

Ribeiro, M. A.; Sato, I. M.; Duarte, C. L.; Sampa, M. H. O.; Salvador, V. L. R.; Scapin, M. A. Application of the electron-beam treatment for Ca, Si, P, Al, Fe, Cr, Zn, Co, As, Se, Cd and Hg removal in the simulated and actual industrial effluents, *Radiation Physics and Chemistry*, v. 71, p. 425-428, 2004.

Rmaile, H. H.; Schlenoff, J. B. "Internal pKa's" in Polyelectrolyte multilayers: coupling protons and salt, *Langmuir*, v. 18, p. 8263-8265, 2002.

Rokhade, A. P.; Patil, S. A.; Aminabhavi, T. M. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir, *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 605-613, 2007.

Romeiro, R. d. S. Bactérias fitopatogênicas. Universidade Federal de Viçosa, 1995.

Russo, T. A.; Johnson, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC, *J. Infect. Dis.*, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

Sahni, G.; Gopinath, P.; Jeevanandam, P. A novel thermal decomposition approach to synthesize hydroxyapatite-silver nanocomposites and their antibacterial action against GFP-

expressing antibiotic resistant *E. coli*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 103, p. 441-447, 2013.

Sahoo, S. K.; Parveen, S.; Panda, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 3, p. 20-31, 2007.

Salle, A. J. *Fundamental principles of bacteriology*. New York, McGraw-Hill, 1961.

Sanpui, P.; Murugadoss, A.; Prasad, P. V. D.; Ghosh, S. S.; Chattopadhyay, A. The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite, *International Journal of Food Microbiology*, v. 124, p. 142-146, 2008.

Sapkal, R. T.; Shinde, S. S.; Mahadik, M. A.; Mohite, V. S.; Waghmode, T. R.; Govindwar, S. P.; Rajpure, K. Y.; Bhosale, C. H. Photoelectrocatalytic decolorization and degradation of textile effluent using ZnO thin films, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 114, p. 102-107, 2012.

Sheagren, J. N. *Staphylococcus aureus*, *New England Journal of Medicine*, v. 310, p. 1368-1373, 1984.

Shearer, A. E. H.; Paik, J. S.; Hoover, D. G.; Haynie, S. L.; Kelley, M. J. Potential of an antibacterial ultraviolet-irradiated nylon film, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 67, p. 141-146, 2000.

Shen, D. T.; Crawford, T. B.; Gorham, J. R.; McGuire, T. C. Inactivation of equine infectious anemia virus by chemical disinfectants, *American Journal of Veterinary Research*, v. 38, p. 1217-1219, 1977.

Shiratori, S. S.; Rubner, M. F. pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes, *Macromolecules*, v. 33, p. 4213-4219, 2000.

Silva, M. C. d. Propriedades ópticas do poliestireno sulfonado dopado com íons de neodímio, Universidade Federal de Uberlândia, Dissertação de Mestrado, 2006.

Siqueira Jr, J. R. Filmes automontados de quitosa/metalofalocianinas: caracterização em aplicação em sensores, UFSCar, Dissertação de Mestrado, 2006.

Snyder, R. W.; Cheatle, E. L. Alkaline glutaraldehyde - an effective disinfectant, *American Journal of Hospital Pharmacy*, v. 22, p. 321-327, 1965.

Soares, J. L. *Biologia: Volume único*. São Paulo, Scipione, 1997.

Solís-Casados, D.; Escobar-Alarcón, L.; Fernández, M.; Valencia, F. Malachite green degradation in simulated wastewater using Ni_x:TiO₂ thin films, *Fuel*, v. 110, p. 17-22, 2013.

Sówka, E.; Leonowicz, M.; Andrzejewski, B.; Pomogailo, A. D.; Dzhardimalieva, G. I. Processing and properties of composite magnetic powders containing Co nanoparticles in polymeric matrix, *Journal of Alloys and Compounds*, v. 423, p. 123-127, 2006.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater is a joint publication of the American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA), and the Water Environment Federation (WEF). Hardcover, 2012.

Staphylococcus Laboratory, Statens Serum Institut. Annual report on Staphylococcus aureus bacteraemia cases 2001. Staphylococcus Laboratory, National Center for Antimicrobials and Infection Control, Statens Serum Institut. Copenhagen, Denmark, 2003.

Steinberg, J. P.; Clark, C. C.; Hackman, B. O. Nosocomial and Community-Acquired Staphylococcus aureus bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance, *Clinical Infectious Diseases*, v. 23, p. 255-259, 1996.

Stonehill, A.; Krop, S.; Borick, M. Buffered glutaraldehyde, a new chemical sterilizing solution, *American Journal of Hospital Pharmacy*, v. 20, p. 458-465, 1963.

Sui, Z.; Schlenoff, J. B. Phase separations in pH-responsive polyelectrolyte multilayers: charge extrusion versus charge expulsion, *Langmuir*, v. 20, p. 6026-6031, 2004.

Tang, Z.; Wang, Y.; Podsiadlo, P.; Kotov, N. A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering, *Advanced Materials*, v. 18, p. 3203-3224, 2006.

Tsuge, Y.; Inokuchi, K.; Onozuka, K.; Shingo, O.; Sugi, S.; Yoshikawa, M.; Shiratori, S. Fabrication of porous TiO₂ films using a spongy replica prepared by layer-by-layer self-assembly method: Application to dye-sensitized solar cells, *Thin Solid Films*, v. 499, p. 396-401, 2006.

Ülküseven, B.; Tavman, A.; Ötük, G.; Birteksöz, S. Antimicrobial activity of FeIII, CuII, AgI, ZnII and HgII complexes of 2-(2-hydroxy-5-bromo/nitro-phenyl)-1H- and 2-(2-hydroxyphenyl)-5-methyl/chloro/nitro-1H-benzimidazoles, *Folia Microbiologica*, v. 47, p. 481-487, 2002.

Von Eiff, C.; Becker, K.; Machka, K.; Stammer, H.; Peters, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia, *New England Journal of Medicine*, v. 344, p. 11-16, 2001.

Vonklitzing, R.; Moehwald, H. Proton concentration profile in ultrathin polyelectrolyte films, *Langmuir*, v. 11, p. 3554-3559, 1995.

Webster, A.; Halling, M. D.; Grant, D. M. Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative, *Carbohydrate Research*, v. 342, p. 1189-1201, 2007.

Wei, D.; Qian, W.; Shi, Y.; Ding, S.; Xia, Y. Effects of cooling treatment and glutaraldehyde on the morphology of Au nanostructures synthesized from chitosan, *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 512-520, 2008.

WHO. Progress on Drinking Water and Sanitation, 2012.

Wohnrath, K.; Santos, P. M.; Sandrino, B.; Garcia, J. R.; Batista, A. A.; Jr, O. N. O. A novel binuclear ruthenium complex: spectroscopic and electrochemical characterization, and formation of Langmuir and Langmuir-Blodgett films, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, p. 1634-1641, 2006.

Wong, S. Y.; Li, Q.; Veselinovic, J.; Kim, B.-S.; Klibanov, A. M.; Hammond, P. T. Bactericidal and virucidal ultrathin films assembled layer by layer from polycationic N-alkylated polyethylenimines and polyanions, *Biomaterials*, v. 31, p. 4079-4087, 2010.

Xie, A. F.; Granick, S. Local electrostatics within a polyelectrolyte multilayer with embedded weak polyelectrolyte, *Macromolecules*, v. 35, p. 1805-1813, 2002.

Yoo, D.; Shiratori, S. S.; Rubner, M. F. Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes, *Macromolecules*, v. 31, p. 4309-4318, 1998.

Yoon, K. Y.; Byeon, J. H.; Park, C. W.; Hwang, J. Antimicrobial effect of silver particles on bacterial contamination of activated carbon fibers, *Environmental Science & Technology*, v. 42, p. 1251-1255, 2008.

Yu, V. L.; Goetz, A.; Wagener, M.; Smith, P. B.; Rihs, J. D.; Hanchett, J.; Zuravleff, J. J. Staphylococcus aureus nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis, *New England Journal of Medicine*, v. 315, p. 91-96, 1986.

Yu, A.; Lu, G. Q.; Drennan, J.; Gentle, I. R. Tubular titania nanostructures via layer-by-layer self-assembly, *Advanced Functional Materials*, v. 17, p. 2600-2605, 2007.

Zhang, C.; Liu, T.; Lu, X. Facile fabrication of polystyrene/carbon nanotube composite nanospheres with core-shell structure via self-assembly, *Polymer*, v. 51, p. 3715-3721, 2010.

Zhu, Y.; Dan, Y. Photocatalytic activity of poly(3-hexylthiophene)/titanium dioxide composites for degrading methyl orange, *Solar Energy Materials and Solar Cells*, v. 94, p. 1658-1664, 2010.

Zucolotto, V. Compósitos poliméricos nanoestruturados de azocorantes, ftalocianinas e polímeros luminescentes, Universidade Federal de São Carlos, Tese de Doutorado, 2003.