

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

MESTRADO EM FÍSICA

ELOISE CRISTINA DE SOUZA RODRIGUES

**SÍNTESE DE MAGNETITA E AÇÃO ANTIBACTERIANA DO
Ag₂O EM MATRIZ DE ALGINATO MAGNÉTICO**

Mossoró/RN, 2011

ELOISE CRISTINA DE SOUZA RODRIGUES

SÍNTESE DE MAGNETITA E AÇÃO ANTIBACTERIANA DO
 Ag_2O EM MATRIZ DE ALGINATO MAGNÉTICO

Dissertação apresentada ao Mestrado em Física da
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Física

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marco Antonio Morales
Torres

Mossoró/RN, 2011

Catlogação da Publicação na Fonte.

Rodrigues. Eloise Cristina de Souza.

Síntese de magnetita e ação antibacteriana do Ag₂O em matriz de alginato magnético / Eloise Cristina de Souza Rodrigues – **Mossoró, RN, 2011.**

93 f.

Orientador(a): Prof . Dr. Marco Antonio Morales Torres.

Dissertação (Mestre). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.
Programa de Pós-Graduação em Física.

Bibliotecária: Elaine Paiva de Assunção CRB 15 / 492

ELOISE CRISTINA DE SOUZA RODRIGUES

SÍNTESE DE MAGNETITA E AÇÃO ANTIBACTERIANA DO
 Ag_2O EM MATRIZ DE ALGINATO MAGNÉTICO

Dissertação apresentada ao Mestrado em Física da
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Física

Data da Aprovação: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Morales Torres

Orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto Vieira Cordeiro

Examinador Externo

Prof. Dr. João Maria Soares

Examinador Interno

Dedico este trabalho a DEUS, e a meus pais
Erasmu e Conceição.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus maravilhoso e incomparável e que me abençoou com tantas conquistas e me deu o privilégio de poder estudar uma ínfima parte da Sua perfeita Criação.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Morales Torres pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo. Pelas advertências, paciência, conselhos, e pelo estímulo em prosseguir quando começaram a surgir os primeiros obstáculos.

Aos meus pais, Erasmo e Conceição, por todo o investimento que fizeram em mim, pelos conselhos, pelo estímulo, por vibrarem comigo nas minhas vitórias e me ensinarem a aprender com os erros.

Ao meu irmão, Wilker pelos inúmeros momentos de descontração e por sempre torcer por mim quando nas minhas investidas acadêmicas de me aperfeiçoar na minha área.

Ao meu querido Apolo, por todo apoio incondicional, conselhos, paciência, amizade.

As minhas grandes amigas, que posso considerar como irmãs, Ana Lúcia Gurgel e Ana Kátia Gurgel, pela grande disponibilidade em ajudar, não só no âmbito profissional, em muitos outros setores em minha vida, pelo companheirismo e apoio.

As minhas amigas Edna, Glenda, Santuza e Hozana por todos os momentos de descontração, que foram tão importantes para aliviar o estresse desses últimos anos.

Ao Prof. Dr. João Maria Soares por sempre ter disponibilizado o laboratório quando precisei e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Milton Moraes Xavier Junior, pelo conhecimento transmitido.

Ao prof. Dr. Luiz Augusto Vieira Cordeiro, pela colaboração tão significativa nesse trabalho, e pelo grande aprendizado na área de microbiologia.

A todos os professores do mestrado e da graduação que tanto contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Análises Magnéticas e Ópticas, LAMOP: Vladson, Ozivam, Leonardo e Sinval por terem me ajudado despretensiosamente e com muita dedicação, sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva por disponibilizar o Laboratório de Inspeção de Produtos Animais, localizado na UFERSA, para realização dos testes bactericidas. .

Ao Prof. Dr. José Humberto de Araújo, pelas medidas de magnetização feitas no laboratório de magnetismo da UFRN.

Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck, pelas medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão, realizadas no Instituto de Química da Unicamp.

Ao Prof. Dr. C. Leite, pelas medidas de Magnetização no SQUID, realizadas no Instituto de Física da Unicamp.

A todos os meus colegas da turma de 2009 do curso de Mestrado em Física da Matéria Condensada, os de descontração, crescimento e estudo coletivo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós Graduação em Física, pela oportunidade concedida de me aperfeiçoar na minha área.

A Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, UERN.

A Universidade do Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Torre forte é o nome do SENHOR, à qual o
justo se acolhe e está seguro”. Pv 18.10

RESUMO

Este trabalho é subdividido em três partes. Na primeira desenvolvemos um método para preparar nanopartículas de magnetita de diferentes diâmetros nos poros do polímero quitosana. A variação do tamanho das partículas está diretamente relacionado a fatores tais como concentração de glutardialdeído, acréscimo do surfactante Tween 80 e tempo de gelificação. Medidas de DRX indicaram padrões característicos das fases de magnetita e maghemita, com diâmetros variando entre 4 e 13nm. Para caracterização magnética realizamos medidas de Magnometria de Amostra Vibrante à temperatura ambiente, Magnetometria no SQUID a 10K, medidas de FC e ZFC e Espectroscopia Mössbauer. As medidas indicaram fases superparamagnéticas e a transição para o regime bloqueado com o aumento do diâmetro dos partículas.

Na segunda etapa preparamos nanopartículas de prata metálica e óxido de prata e testamos seu potencial bactericida, sendo que apenas o Ag_2O foi eficiente para eliminação dos microrganismos testados. As nanopartículas de óxido de prata foram inseridas em uma matriz magnética de alginato, possibilitando a separação magnética da formulação após a interação com as bactérias. O diâmetro médio das nanopartículas de magnetita, de acordo com as análises de difração de raios-X, estava em torno de 10nm. As medidas de magnetização indicaram que as partículas de magnetita estavam no regime superparamagnético, entretanto as medidas de espectroscopia Mössbauer indicaram que havia uma fração das partículas no regime bloqueado, sendo que essa fração é menor que 50%. Através de análises de UV-VIS das amostras, foi possível comprovar que a formulação contendo as nanopartículas de Ag_2O não liberam partículas para o meio aquoso, a formulação, portanto, se tornam fortes candidatas para desenvolvimento de sistemas de descontaminação. Na terceira etapa revestimos as esferas magnéticas de alginato dopadas com óxido de prata para potencializar seu efeito bactericida.

Palavras Chave: Quitosana Magnética, nanopartículas de Ag_2O , Efeito bactericida.

ABSTRACT

This work is divided into three parts. At first we developed a method for preparing magnetite nanoparticles of different diameters in the pores of the polymer chitosan. The variation of particle size is directly related to factors such as concentration glutardialdeido, addition of surfactant Tween 80 and gelation time. XRD measurements showed characteristic patterns of the phases of magnetite and maghemite, with diameters ranging from 4 to 13nm. For magnetic characterization performed measurements of Magnometria Vibrating Sample at room temperature SQUID Magnetometry in the 10K, FC and ZFC measurements and Mössbauer spectroscopy. The measures indicated stages and transition to the superparamagnetic regime blocked by increasing the diameter of the particles.

In the second step we prepared nanoparticles of metallic silver and silver oxide and their potential bactericidal test, and only the Ag₂O was effective for elimination of the microorganisms. The silver oxide nanoparticles were placed in a magnetic alginate matrix, making possible the magnetic separation of the formulation after the interaction with the bacteria. The average diameter of magnetite nanoparticles, according to the analysis of X-ray diffraction, was about 10nm. The magnetization measurements indicated that the magnetite particles were in the superparamagnetic regime, although the Mössbauer Spectroscopy indicated that had a fraction of the particles in the system blocked, and this fraction is less than 50%. Through analysis of UV-VIS of the samples, it was evident that the formulation containing nanoparticles Ag₂O not release particles into aqueous medium, formulation, therefore becomes a strong candidate for development of decontamination systems. In the third stage clothed magnetic beads of alginate with silver oxide doped to enhance its bactericidal effect.

Keywords: Chitosan Magnetic, Nanoparticles Ag₂O, bactericidal effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Ciclo de histerese magnética	7
Figura 2.2: Ilustração referente a parede de domínio magnético separando dois domínios com magnetização antiparalela.	9
Figura 2.3: Variação da coercividade intrínseca pelo diâmetro das partículas, a direita a magnetização correspondente.....	10
Figura 2.4: Mecanismo de separação magnética.	12
Figura 2.5: Estrutura cristalina da magnetita.....	13
Figura 2.6: Esquema de distribuição dos momentos magnéticos da magnetita.	14
Figura 2.7.: Ação oligodinâmica dos metais, as zonas claras representam o inibição do crescimento bacteriano, o pingente e a moeda de cinco centavos norte-americana, possui componentes de prata e a de um centavo contém cobre [21].....	15
Figura 2.8: Representação da forma tridimensional da molécula de proteína normal à esquerda, e desnaturada à direita.	16
Figura 2.9: Representação da ligação dissulfeto na molécula da proteína, e a quebra dessa ligação pelos íons de prata.....	17
Figura 2.10: Esquema representativo da molécula de DNA e detalhamento das ligações entre as bases purinas e pirimidinas.	18
Figura 2.11: Esquema da técnica de coloração de Gram	19
Figura 2.12: Fórmulas estruturais do N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico (A), e representação da peptideoglicana (B) [21].....	20
Figura 2.13: Representação da parede celular das bactérias gram-positivas [21].	20
Figura 2.14: Representação da parede celular das bactérias gram-negativas [21]	21

Figura 2.15: Estudo da interação dos íons Ag^+ em bactérias Gram positivas e negativas segundo Feng et al [23]. Imagem obtida através de microscopia eletrônica de transmissão, mostra o tratamento com Ag^+ de células de <i>E. Coli</i> (A) e <i>S. Aureus</i> (B). O tratamento resultou em condensação do DNA, danos à parede celular e formação de grânulos [23].	22
Figura 2.16: O tratamento com prata leva à desidratação das células microbianas. A) <i>S. aureus</i> sem tratamento com prata, encontrado em um cateter. B) <i>S. aureus</i> numa superfície contendo microparticulas de prata em toda a sua matriz. Ambas as imagens foram obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura [30]......	23
Figura 2.17: Representação estrutural da quitosana e da quitina [36]	25
Figura 2.18: Esquema de obtenção da quitosana a partir do exoesqueleto dos crustáceos.	25
Figura 3.1: Reticulação da quitosana com o glutaraldeído [52]	29
Figura 3.2: Estrutura molecular do Tween 80	30
Figura 3.3: Estrutura do ácido algínico.	30
Figura 3.4: Esquema representativo da interação dos blocos-G com os íons de cálcio.....	31
Figura 3.5: Esquema de preparação de nanopartículas de prata metálica.	33
Figura 3.6: Esquema da síntese das esferas de alginato dopadas com Ag_2O ou Ag	35
Figura 3.7: Imagem de microscopia eletrônica de <i>E. coli</i> [55]	36
Figura 3.8: Microscopia eletrônica de uma cultura de <i>S. aureus</i>	37
Figura 3.9: Curva de crescimento bacteriano.	37
Figura 3.10: Difractometro de Raios-X	40
Figura 3.11: Imagem mostrando o Refinamento feito no MAUD.....	41
Figura 3.12: Espectrômetro Mössbauer, montado no Laboratório de Análises Magnéticas e Ópticas, na UERN.....	42

Figura 3.13: Linhas espectrais do singleto, dubleto e sexteto, respectivamente.	43
Figura 3.14: Anel supercondutor com duas junções de Josephson.....	44
Figura 3.15: Diagrama do Magnetometro de Amosta vibrante [59].....	45
Figura 3.16: Ilustração do funcionamento de um MET.	47
Figura 4.1: Difração de raios-X das amostras sem acréscimo de Tween 80,variando a concentração de glutardialdeido.	50
Figura 4.2: Difração de raios-X das amostras com Tween 80.	52
Figura 4.3: Gráficos do diâmetro em função da concentração de glutaraldeido das amostras (A) sem o acréscimo de Tween (B) com Tween.	53
Figura 4.4 : Diagrama representativo da formação de micelas para as amostras com Tween 80.	54
Figura 4.5: Variação do parâmetro de rede das amostras.	57
Figura 4.6: Medidas de MET da amostra M4, a escala corresponde a 100nm. As partículas no circulo são formas não esferas semelhantes a agulhas (A), histograma da distribuição de tamanho(B).	58
Figura 4.7: Magnetização das amostras sem acréscimo de Tween 80.....	60
Figura 4.8: Magnetização das amostras com Tween 80	60
Figura 4.9: Magnetização à 10K da amostra Uf13 (A), e da M4 (B).	61
Figura 4.10: Medidas de FC e ZFC da amostra Uf13 (A) e de ZFC da amostra M4 (B).	63
Figura 4.11: Magnetização das amostras M1, M2 e M3 por gramas de magnetita (A). Gráfico da Magnetização por grama totais em função da concentração de glutardialdeido (em vermelho) e da magnetização por grama de magnetita (em azul) (B).	66
Figura 4.12: Espectroscopia Mössbauer das amostras M1 e M4.	67

Figura 4.13: Difração de raio-x das amostras de oxido de prata(A), magnetita(B), prata metálica (C).	68
Figura 4.14: Refinamento da amostra prata (método1)	69
Figura 4.15: Medida de Espectroscopia Mössbauer da magnetita.	70
Figura 4.16: Curvas de Histerese das nanoparticulas de magnetita.....	71
Figura 4.17: Esferas magnéticas de alginato.	72
Figura 4.18: Resultado da interação das nanoparticulas de oxido de prata com as bactérias E. coli durante (a) 0 min, (c) 30 min, e S. aureus durante (b) 0h, (d) 30 min.	74
Figura 4.19: Teste cinético da interação da formulação com a bactéria S. aureus, (a) 0h, (b) 1h, (c) 2hs, (d) 3hs, (e) 4hs, (f) 5hs, (g) 6hs.	74
Figura 2.20: Teste cinético da interação da formulação com as bactérias E. coli, (a) 0h, (b) 1h, (c) 2hs, (d) 3hs, (e) 4hs, (f) 5hs, (g) 6hs.	75
Figura 4.21: Gráfico da média das repetições do teste biocida cinético usando a formulação (EMA+Ag ₂ O) para E. coli (A) e S. aureus (B).	76
Figura 4.22: Medidas de UV-VIS da suspensão contendo a formulação.	77
Figura 4.23: Teste cinético da interação da formação + quitosana com as bactérias E. coli (a) 0h, (b) 1h, (c) 2hs, (d) 3hs, (e) 4hs, (f) 5hs, (g) 6hs.	79
Figura 4.24: Teste cinético da interação da formação + quitosana com as bactérias S. aureus (a) 0h, (b) 1h, (c) 2hs, (d) 3hs, (e) 4hs, (f) 5hs, (g) 6hs.	80
Figura 4.25: Gráfico do número de UFC de E. coli pelo tempo de interação com a formulação	80
Figura 4.26: Gráfico do número de UFC de S. aureus pelo tempo de interação com a formulação.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Reagentes usados nos procedimentos experimentais.....	28
Tabela 3.2-A: Amostras sem o Tween, variando a concentração de glutaraldeído.....	32
Tabela 3.2-B: Amostras com Tween 80, variando a concentração de glutaraldeído.....	32
Tabela 4.1: Resultados obtidos através do refinamento Rietveld para amostras sem Tween (A) e com Tween (B).....	49
Tabela 4.2: Magnetização das amostras sem o Tween 80.....	58
Tabela 4.3: Magnetização das amostras com o Tween 80.	58
Tabela 4.4: Dados obtidos da curva de histerese à 10K, das amostras Uf13 e M4	62
Tabela 4.5: Valores da massa teórica e experimental do Fe para as amostras M1, M2, M3 e M4.	64
Tabela 4.6: Dados da magnetização por gramas totais de amostra e do valor normalizado por gramas de magnetita.....	65
Tabela 4.7: Características estruturais das amostras de magnetita, óxido de prata e da prata.	69
Tabela 4.8: Resultado do teste bactericida (Onde I representa quantidades de UFC incontáveis).....	73

LISTA DE SIGLAS

D_c – Diâmetro Crítico

T_B – Temperatura de Bloqueio

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

μm – Micrometro

ppm – Parte por Milhão

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

T – Tesla

Oe – Oersteds

K – Kelvin

μl – Microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Comportamento Magnético dos Materiais	3
2.1.1 Termos Magnéticos	3
2.1.2 Tipos de Comportamento Magnético	4
2.1.3 Histerese Magnética	7
2.1.4 Anisotropia Magnética	8
2.1.5 Domínios Magnéticos	8
2.1.6 Superparamagnetismo	9
2.1.7 Aplicações das Nanopartículas Magnéticas em Biotecnologia	10
2.2 Magnetita	12
2.2.1 Propriedades Cristalinas e Magnéticas da Magnetita	12
2.2.2 Principais Métodos de Síntese	14
2.3 Ação Antimicrobiana da Prata	14
2.3.1 Introdução	14
2.3.2 Mecanismo de Ação	16
2.3.3 Ação da Prata Contra Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	18
2.3.4 Ação da Prata na sua Forma Nanoestruturada	23
2.3.5 Toxicologia da Prata	24
2.4 Quitosana como Agente Biocida	24
2.4.1 Propriedades Físico-químicas da Quitosana	24
2.4.2 Propriedade Antimicrobiana	26
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
3.1 Materiais	29
3.1.1 Solução de Quitosana	29

3.1.2 TWEEN 80	29
3.1.3 Solução de Alginato	30
3.2 Primeira etapa: Síntese de Quitosana Magnética	31
3.3: <i>Segunda Etapa: Esferas Magnéticas de Alginato Contendo Prata ou Oxido de Prata e seu Efeito Antibacterial</i>	33
3.3.1 Síntese de Nanoparticulas de Prata.	33
3.3.2 Síntese de Nanoparticulas de Óxido de Prata	34
3.3.3 Preparação de Nanoparticulas de Magnetita	34
3.3.4 Síntese das Esferas de Alginato Contendo Magnetita e Prata ou Magnetita e Óxido de Prata	34
3.4 <i>Terceira Etapa: Preparação de Nanocompósitos de Magnetita e Oxido de Prata em Matriz de Alginato Revestida por uma Camada de Quitosana</i>	35
3.5 <i>Teste Bactericida</i>	35
3.6 <i>Métodos de caracterização dos materiais</i>	39
3.6.1 Difração de raios-X	39
3.6.2 Refinamento Rietveld	40
3.6.3 Espectroscopia Mössbauer	41
3.6.4 Medidas de Magnetização	43
3.6.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	46
3.6.6 Absorção atômica	47
3.6.7 Espectrofotometria	47
RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1: <i>Primeira Etapa: Quitosana Magnética</i>	49
4.1.1: <i>Análise Estrutural</i>	49
4.1.2 <i>Medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	57
4.1.3 <i>Medidas de Magnetização</i>	58
4.1.4 <i>Medidas de Absorção Atômica</i>	64
4.1.5 <i>Medidas de Espectroscopia Mössbauer</i>	67
4.2 <i>Segunda Etapa: Ação Antibacteriana de Nanoparticulas de Prata e Oxido de Prata Embebidas em Alginato Magnético</i>	68

4.2.1 Difração de Raios X:	68
4.2.2 Espectroscopia Mössbauer.....	69
4.2.3 Medidas de magnetização	70
4.2.3 Poder bactericida da prata metálica e do oxido de prata	71
4.2.4 Esferas Magnéticas de Alginato.....	72
4.2.5 Teste Biológico com as Esferas Magnéticas de Alginato Contendo Oxido de Prata	72
4.2.6 Teste Bactericida Cinético	73
4.2.7 Medidas de UV-VIS	77
<i>4.3 Terceira Etapa: Revestimento das Esferas de Alginato com uma Camada de Quitosana para Potencializar seu Efeito Biocida.</i>	<i>78</i>
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	83
<i>5.1 Conclusões.....</i>	<i>83</i>
5.1.1 Primeira Etapa: Quitosana Magnética.....	83
5.1.2 Segunda Etapa: Esferas Magnéticas de Alginato Dopadas com Oxido de Prata e sua Ação Bactericida	85
5.1.3 Terceira Etapa: Revestimento das Esferas de Alginato Dopadas com Oxido De Prata com uma Camada de Quitosana.....	86
<i>5.2 Perspectivas</i>	<i>86</i>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

As nanopartículas magnéticas tem aplicação em vários setores tais como biomedicina, bioengenharia, tratamentos por magnetohipertermia, transporte de fármacos, purificação biomolecular, biossensores, melhoria das imagens por ressonância magnética entre outras. Esses materiais possuem propriedades magnéticas incorporadas, sendo que dependendo do diâmetro essas partículas podem exibir comportamento superparamagnético, esse tipo de comportamento é caracterizado por apresentar resposta magnética quando em presença de um campo magnético externo e, ao se retirar a influência desse campo, não apresentam coercividade ou magnetização remanente. Dessa forma é possível remover essas nanopartículas de uma suspensão com auxílio de campo magnético, essa remoção é relativamente rápida e de fácil operação requerendo equipamentos simples. Como a remanência nesse caso é nula, as nanopartículas não são atraídas uma pelas outras, portanto podem ser resuspensas na solução quando retiramos o campo sendo possível reutilizar essas partículas.

A aplicabilidade e comportamento físico e químico das nanopartículas dependem de fatores tais como tamanho, forma e uniformidade, esses fatores são determinados pelo processo de síntese utilizado. Em materiais magnéticos a forma esférica é a mais aplicável (nanopartículas magnéticas esféricas apresentam anisotropia de forma nula), como ferrofluidos, alvos para separação de células ou removedor de poluentes, transportadores de fármaco entre outros.

Para algumas aplicações é importante envolver as nanopartículas com uma camada não magnética, prevenindo dessa forma a agregação e a sedimentação, além de permitir a funcionalização para aplicações específicas e a redução da toxicidade. Materiais poliméricos, como a quitosana, são comumente empregados para envolver as nanopartículas.

A magnetita na sua forma nanoestruturada é muito visada, pois ela é um material biodegradável e biocompatível.

Na área ambiental, a tecnologia que usa nanopartículas magnéticas funcionalizadas vem sendo considerada uma inovação tecnológica com um potencial significativo na

recuperação de metais, na descontaminação de águas residuais, no tratamento de rejeitos entre outros.

Um grande problema ambiental tem sido o tratamento de águas infectadas por microrganismos patogênicos, sendo que muitos desses organismos têm demonstrado resistência às drogas que têm sido desenvolvidas ao longo dos anos, assim se torna necessário a criação de sistemas alternativos para promover a desinfecção.

Neste trabalho, sintetizamos magnetita em matriz de quitosana e estudamos a variação do diâmetro das nanopartículas sob algumas condições no processo de síntese, também desenvolvemos um sistema magnético com óxido de prata e estudamos a sua viabilidade contra algumas cepas de bactérias tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, que são os principais patógenos causadores de uma grande variedade de infecções nos seres humanos. Essas bactérias também podem causar intoxicações alimentares graves. Vale ressaltar que todos os materiais empregados nesse estudo são biodegradáveis, o que torna sua gama de aplicações mais ampla.

CAPITULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Comportamento Magnético dos Materiais

Todas as substâncias apresentam algum tipo de comportamento magnético em determinadas temperaturas. Esse comportamento magnético está relacionado aos movimentos do elétron no interior dos átomos, que são o movimento orbital ao redor do núcleo e do movimento de spin em torno de seu próprio eixo [1].

O magnetismo concernente ao movimento orbital é semelhante com aquele que ocorre em uma bobina de corrente que gera um campo magnético. O movimento de spin gera o magnetismo intrínseco dos materiais, que quando submetidos a um campo magnético externo faz com os spins sofram um torque, tentando alinhar sua direção com a direção do campo aplicado, o momento magnético esta relacionado a esse torque.

2.1.1 Termos Magnéticos

Ao se colocar um material magnético sob a influência de um campo magnético externo H , a sua resposta a esse campo é dada pela indução magnética, B que pode ser expressa pela equação 2.1.

$$B=H+4\pi M \text{ [cgs]} \quad 2.1$$

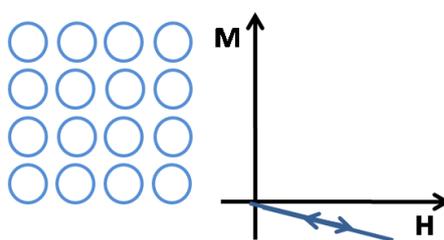
Sendo M a magnetização do material que pode ser definida como a densidade de momento de dipolo magnético, dado por $M = \mu_{\text{total}}/V$.

Outras propriedades que são intrínsecas dos materiais são a permeabilidade e a susceptibilidade magnética, sendo a primeira a razão entre a indução magnética e a intensidade do campo magnético, dada por $\mu=B/H$, e a segunda é definida como a razão entre a magnetização do material e o campo aplicado, sendo expressa por $\chi = M/H$.

2.1.2 Tipos de Comportamento Magnético

Os materiais apresentam diferentes tipos de comportamento magnéticos e são classificados de acordo com a resposta a um campo magnético externo aplicado. O fato de os materiais responderem diferentemente a um campo aplicado esta relacionado a sua distribuição eletrônica nos subníveis, de acordo com a regra de Hund. Os principais tipos de comportamento magnético são o diamagnetismo, o paramagnetismo o ferromagnetismo, o ferrimagnetismo e o antiferromagnetismo [1].

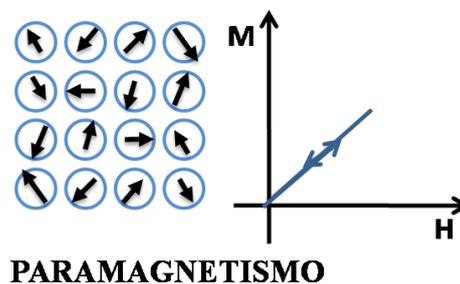
- Diamagnetismo [2] consiste na mais fraca resposta magnética e somente pode ser verificada na presença de um campo magnético externo, sem ele a magnetização é nula, isso se deve ao fato de que nesses materiais os subníveis eletrônicos estão completos fazendo com que os momentos fiquem emparelhados e se cancelem. Esses materiais apresentam valores reduzidos e negativos para a susceptibilidade que esta na ordem de $-10^{-6} \text{ m}^3\text{kg}^{-1} < \chi > -10^{-5} \text{ m}^3\text{kg}^{-1}$, o fato de o valor de χ ser negativo pode explicado pela Lei de Lenz, que diz que um circuito submetido a um campo magnético externo variável, cria um campo contrário oposto a variação do campo externo aplicado. O diamagnetismo esta presente em todos os materiais, mas só pode ser observado quando não existem outros tipos de comportamento magnético superpostos, como por exemplo: materiais orgânicos, a água e alguns metais tais como Ag, Hg, Cu entre outros. Abaixo temos a figura representativa desse tipo de comportamento magnético e o gráfico da magnetização em função do campo externo aplicado.



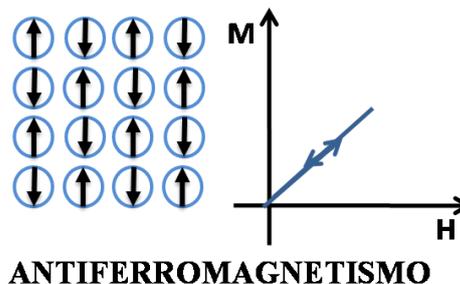
DIAMAGNETISMO

- Paramagnetismo [2] são constituídos de átomos que apresentam momento magnético intrínseco porem que não interagem entre si. Os momentos magnéticos atômicos

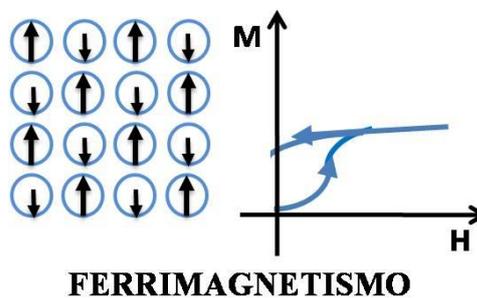
encontram-se orientados aleatoriamente tornando a magnetização microscópica líquida nula, ao se aplicar um campo externo os momentos se orientam na direção e sentido do campo, causando uma susceptibilidade positiva e pequena que esta na ordem de $10^{-5} \text{ m}^3\text{kg}^{-1} < \chi > 10^{-3} \text{ m}^3\text{kg}^{-1}$. Esse comportamento pode ser observado em alguns gases diatômicos tais como O_2 , NO , alguns metais como Mn, Al, Pt, Cr e em óxidos das terra raras. Abaixo temos a figura representativa desse tipo de comportamento magnético e o gráfico da magnetização em função do campo externo aplicado.



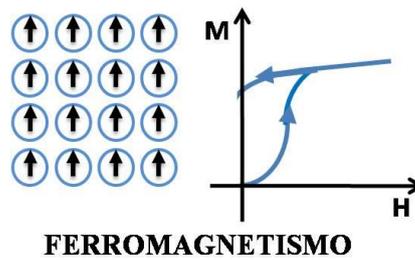
- Antiferromagnetismo [2] ocorre quando materiais têm duas subredes magnéticas com seus momentos magnéticos de igual valor e ordenados em direções antiparalelas, tornando a magnetização nula. Na presença de um campo magnético externo os momentos tendem a se alinhar na direção e sentido do campo o que torna a susceptibilidade positiva e da ordem de $0 \text{ m}^3\text{kg}^{-1} < \chi > 10^{-2} \text{ m}^3\text{kg}^{-1}$. Porém acima de uma determinada temperatura chamada temperatura de Néel o ordenamento antiferromagnético desaparece e da origem ao paramagnetismo. Abaixo temos a figura representativa desse tipo de comportamento magnético e o gráfico da magnetização em função do campo externo aplicado.



- Ferrimagnetismo está presente em materiais que têm duas subredes magnéticas com seus momentos magnéticos ordenados em direções antiparalelas porém com diferentes magnitudes. Ao se aplicar um campo magnético externo os momentos se alinham de acordo com o campo causando uma susceptibilidade alta e positiva da ordem de $10^{-2} \text{ m}^3\text{kg}^{-1} < \chi > -10^{-6} \text{ m}^3\text{kg}^{-1}$. Exemplos de ferrimagnéticos são as ferritas. Abaixo temos a figura representativa desse tipo de comportamento magnético e o gráfico da magnetização em função do campo externo aplicado.



- Ferromagnetismo [2] apresentam momentos atômicos magnéticos alinhados paralelamente, devido à sua energia magnetocristalina, a ordem magnética dos materiais ferromagnéticos desaparecem para temperaturas acima da temperatura de Curie. Em presença de campo magnético os momentos se alinham na direção e sentido do campo tornando a susceptibilidade alta e positiva da ordem de $10^{-2} \text{ m}^3\text{kg}^{-1} < \chi > 10^6 \text{ m}^3\text{kg}^{-1}$. Exemplos de materiais que apresentam esse comportamento magnético são os metais de transição, as terras raras, ligas de elementos ferromagnéticos e algumas ligas de Mn. Os materiais ferromagnéticos tipo “bulk” podem ter seus momentos magnéticos agrupados em domínios magnéticos, os domínios magnéticos são separados por paredes de domínio. Abaixo temos a figura representativa desse tipo de comportamento magnético e o gráfico da magnetização em função do campo externo aplicado.



2.1.3 Histerese Magnética

A figura 2.1 representa uma curva de histerese típica de um material ferromagnético ou ferromagnético. Um material ferromagnético ao ser colocado sob a influência de um campo magnético externo modifica a configuração de seus domínios magnéticos, isto acontece segundo dois mecanismos diferentes: o movimento das paredes dos domínios e a rotação dos momentos magnéticos. O primeiro atua aumentando as regiões com as direções de magnetização alinhadas com o campo, sendo que esse processo é dissipativo resultando na curva de histerese magnética. A energia interna dissipada para realizar o ciclo é dada pela área interna da histerese.

É possível obter alguns parâmetros importantes através da curva de histerese como o campo coercivo (H_c), magnetização de saturação (M_s), magnetização remanente (M_r) e permeabilidade (μ).

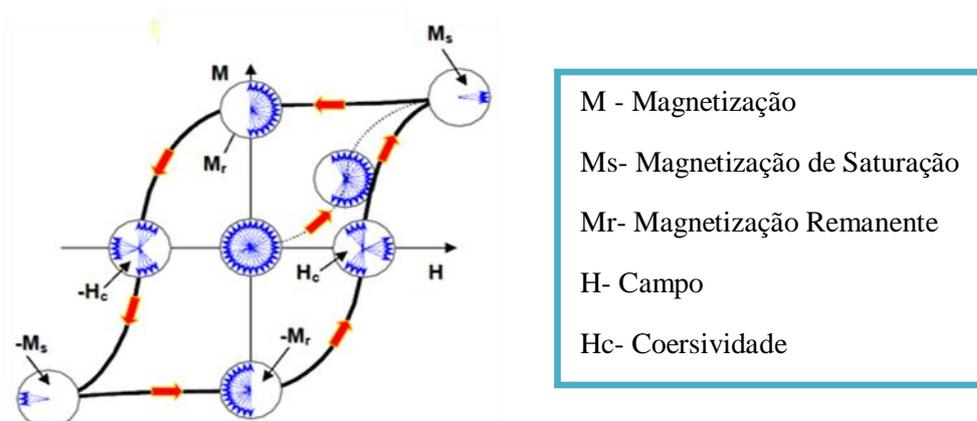


Figura 2.1: Ciclo de histerese magnética [3]

Quando a curva de histerese se apresenta larga (valor elevado de H_c) o material é difícil de magnetizar, ou seja ele é “duro” magneticamente, e com baixa permeabilidade, alta força coercitiva (H_c) e alto magnetismo residual (M_r). Quando a curva se apresentar mais estreita esse material é mais fácil de ser magnetizado, ou magneticamente “mole”, possuindo alta permeabilidade com força coercitiva e magnetização residual baixa.

2.1.4 Anisotropia Magnética

A anisotropia magnética é o fenômeno de orientação preferencial da magnetização espontânea, ao longo de certas direções características de cada material, ou seja, a energia interna varia quando a magnetização aponta em direções diferentes.

Existem muitos tipos de anisotropia magnética, entretanto os três tipos mais importantes de anisotropia para materiais granulares são a magnetocristalina (origina-se do efeito das direções cristalográficas dos materiais sobre a energia de magnetização), a de forma (esta relacionada ao campo desmagnetizante, que tem origem na interação dipolar e depende da forma e dimensão do grão), e a de tensão (é decorrente das deformações na estrutura cristalina provocadas por tensões mecânicas), entre todos os tipos de anisotropia somente a magnetocristalina é intrínseca dos materiais sendo as outras induzidas ou extrínsecas.

Para um sistema uniaxial a energia necessária para promover o alinhamento pode ser definida pela expressão 2.2.

$$E_a = K \sin^2 \theta \quad 2.2$$

Onde E_a é a energia magnetocristalina, K é a constante de anisotropia, e θ é o ângulo entre a magnetização espontânea e o eixo de fácil magnetização.

2.1.5 Domínios Magnéticos

Os domínios magnéticos são regiões microscópicas dos materiais magnéticos e formados por momentos magnético de mesma orientação. Cada domínio possui um ordenamento específico, o que faz com que a magnetização macroscópica resultante seja nula, esses domínios são separados por paredes que existem para minimizar a energia do sistema (energia magnetostática), como podemos perceber através da Figura 2.2.



Figura 2.2: Ilustração referente a parede de domínio magnético separando dois domínios com magnetização antiparalela.

Todos os sistemas obedecem ao princípio físico de mínima energia [1], portanto os momentos atômicos tendem a ordenar-se de tal forma a minimizar a energia total do sistema. As energias que estão envolvidas no ordenamento magnético [1] são a energia das paredes de domínio (energia de troca), a energia magnetocristalina (energia de anisotropia) e a energia magnetostática. O mínimo de energia é possibilitado com o surgimento das regiões de domínios magnéticos (multidomínios).

Os grãos podem ser monodomínio (possuindo apenas um domínio magnético) ou multidomínio (possuindo uma determinada quantidade de domínios magnéticos), isso está relacionado ao seu tamanho, quando as dimensões do material magnético diminuem a um valor próximo do diâmetro crítico, D_c , o material deixa de ser multidomínio a passa a ser monodomínio, nesse caso podemos observar a magnetização espontânea, isso porque no interior dessas partículas o material permanece espontaneamente magnetizado em uma determinada direção, levando a formação de um momento magnético gigante. Nesses sistemas a reversão magnética se dá através da rotação coerente dos spins, resultando em coercividade e anisotropia altas.

2.1.6 Superparamagnetismo

O superparamagnetismo é uma propriedade exclusiva das nanopartículas magnéticas. Esse estado está relacionado às flutuações sofridas pelo momento magnético quando as nanopartículas têm um diâmetro inferior ao diâmetro crítico D_c , o que faz com que haja variações em sua coercividade, como podemos perceber na Figura 2.3. Nessa faixa de

diâmetro as nanopartículas tem sua energia anisotrópica diminuída, até que a energia térmica é suficiente para superar a direção preferencial do momento da partícula.

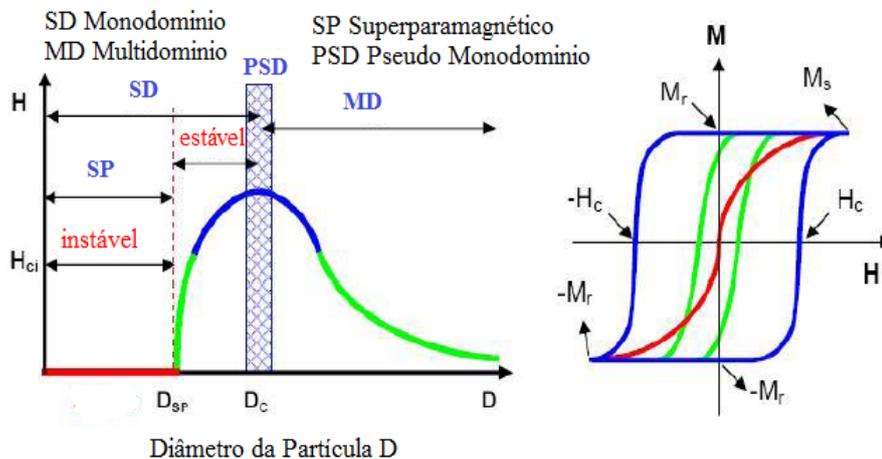


Figura 2.3: Variação da coercividade intrínseca pelo diâmetro das partículas, a direita a magnetização correspondente [3].

A competição entre as energias térmica e magnética determina o estado do material que pode estar no regime bloqueado ou superparamagnético. Abaixo de uma determinada temperatura chamada de temperatura de bloqueio T_B , os momentos se encontram bloqueados magneticamente, acima dessa temperatura o material entra no regime superparamagnético.

No regime superparamagnético os momentos magnéticos atômicos estão alinhados paralelamente, dessa forma a magnetização remanente e a coercividade são nulas. Nesses materiais a susceptibilidade magnética tem valores entre a dos ferromagnéticos e paramagnéticos e pode ser afetada por fatores anisotrópicos [1].

2.1.7 Aplicações das Nanopartículas Magnéticas em Biotecnologia

Quando consideramos materiais nanométricos podemos observar que esses se comportam de modo diferente aos materiais macroscópicos, uma das causas dessa diferença está relacionada aos efeitos de superfície se tornarem mais predominantes pelo aumento do número de átomos superficiais em comparação aos do núcleo (configuração caroço-camada), outra razão seria que os efeitos quânticos se tornariam mais evidentes nessa escala. As novas características observadas nos nanomateriais são peculiares tornando-os atrativos para

nanotecnologia em seus diversos ramos tais como medicina [4, 5, 6, 7, 8], biologia molecular [9, 10], eletrônica, meio ambiente [11, 12, 13] entre outras.

Um ramo que tem se expandindo muito ao longo dos anos tem sido a preparação de sistemas funcionais a partir de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com compostos orgânicos. As nanopartículas magnéticas podem exibir comportamento superparamagnético, característica pertencente apenas a materiais nessa escala. Esse comportamento faz com que só haja resposta magnética na presença de um campo magnético externo após a retirada do campo não se observa mais comportamento magnético nesses materiais. Alguns exemplos de aplicações de sistemas magnéticos nanoparticulados podem ser vistos mais adiante.

Transportes de Fármacos

A utilização de sistemas nanoparticulados como vetores para transporte de fármacos tem se tornado uma técnica promissora para administração dos mesmos [14]. Essa técnica possibilita a liberação da dosagem correta e direta no tecido ou célula alvo, o que melhora a atividade do fármaco e diminui seus efeitos colaterais, dessa forma é possível obter o efeito esperado do medicamento sem sobrecarregar o organismo do paciente com doses elevadas, essa técnica é muito indicada para medicamentos com efeitos colaterais severos como os quimioterápicos para o câncer.

O material magnético, devido as suas propriedades, é conduzido e retido na região específica do corpo com o auxílio de um campo magnético externo [15, 16, 17]. Já houve testes clínicos fazendo uso dessa técnica alternativa de administração de medicamentos no combate ao câncer em pacientes terminais obtendo êxito em 50% dos casos [17].

Hipertermia Magnética

A hipertermia consiste em uma técnica onde se aumenta a temperatura de uma determinada região que esta sendo afetada por uma neoplasia, com o objetivo de causar a lise das células cancerígenas. Esse procedimento se baseia na premissa de que células tumorais podem ser destruídas em temperaturas de 41°-42°C, isso porque estas são menos resistentes a aumentos bruscos de temperatura se comparadas a células normais.

Essa temperatura pode ser alcançada com uso de nanopartículas magnéticas, pois estas quando submetidas ação de um campo magnético alternado do tipo AC podem ser aquecidas

[18]. As partículas no regime de monodomínio são preferíveis, pois respondem mais eficientemente a campos externos do tipo AC, e absorvem destes, mais energia [8].

Separação Magnética

O processo de separar e selecionar matérias que estejam contidos em grandes volumes são um grande problema tecnológico, portanto a utilização de componentes magnéticos associados ao material que se deseja separar tem ganhado cada vez mais importância, pois uma vez ligado ao material magnético é possível separá-lo com o uso de um ímã, como podemos verificar na figura 2.4. O campo de aplicações dessa técnica é bastante amplo [19]: anticorpos monoclonais, diversas enzimas, organelas subcelulares, células específicas entre outras.

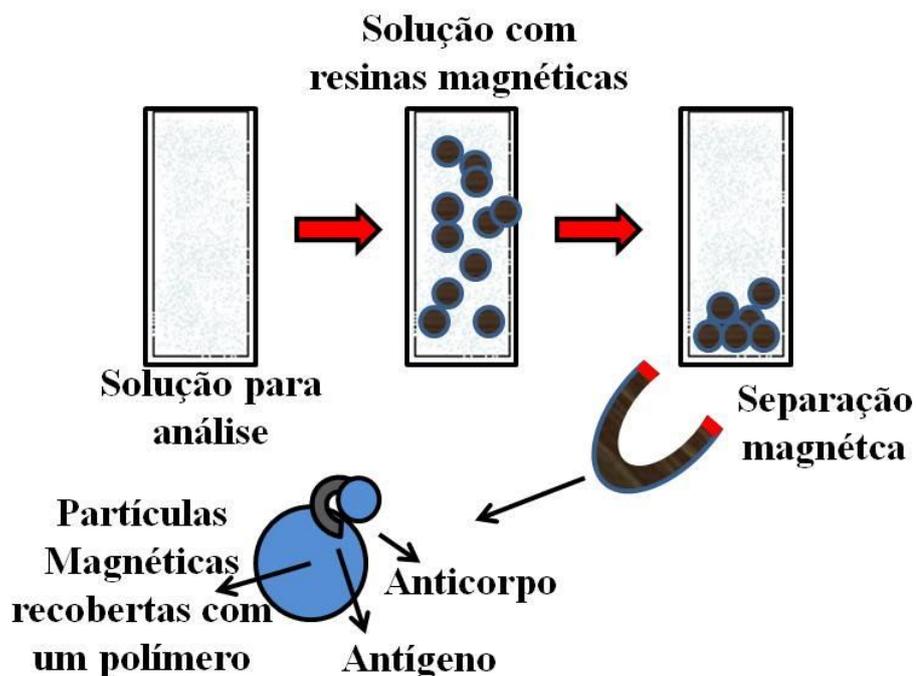


Figura 2.4: Mecanismo de separação magnética.

2.2 Magnetita

2.2.1 Propriedades Cristalinas e Magnéticas da Magnetita

A magnetita, Fe_3O_4 , é um mineral magnético, composto pelos óxidos de Fe^{+2} e Fe^{+3} (FeO e Fe_2O_3), sendo que 72,4% corresponde ao ferro e 26,6 ao oxigênio [19].

Possui estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio inverso, Figura 2.5. Nesse tipo de estrutura cada célula unitária tem fórmula geral dada por $\text{A}_8\text{B}_{12}\text{O}_{32}$ onde os átomos de oxigênio estão regularmente distribuídos em posições cúbicas ao longo do eixo (1,1,1), os cátions de Fe^{+2} e Fe^{+3} ocupam os espaços entre os íons de oxigênio, sendo esses espaços de dois tipos, os sítios tetraédricos, onde o cátion ocupa o centro do tetraedro e tem por vértices os átomos de oxigênio (sítio A), e os octaédricos tendo átomos de oxigênio ocupando os vértices de um octaedro e o cátion ocupando o seu centro (sítio B).

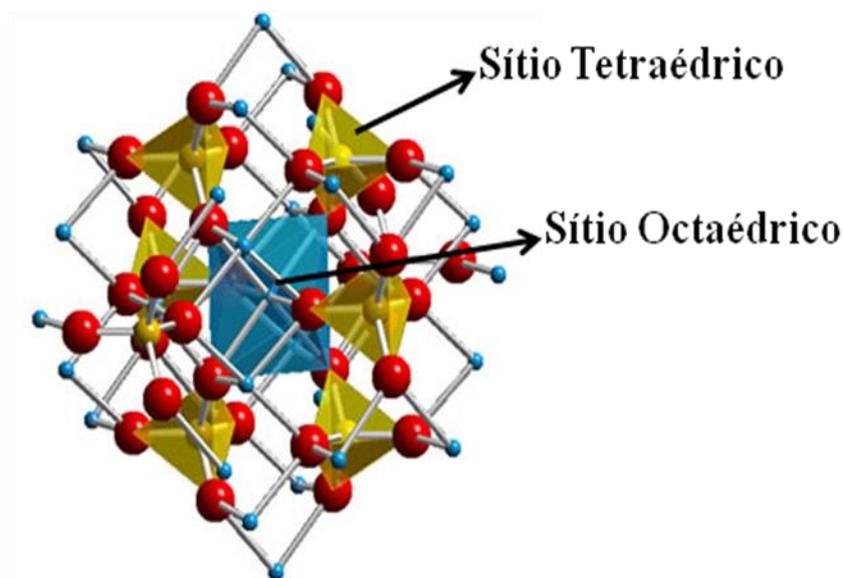


Figura 2.5: Estrutura cristalina da magnetita.

A magnetita possui magnetização espontânea devido a sua estrutura de espinélio inverso, existem interações de supertroca entre os cátions tetraédricos e octaédricos, do tipo A-O-B ou B-O-B, as interações do tipo A-O-B com ângulos próximos a 180° são predominantes na estrutura de espinélio inverso, sendo apenas os íons de Fe^{+2} responsáveis por essa magnetização, já que os spins de Fe^{+3} do sítio A se cancelam com os spins do Fe^{+3} no sítio B, por serem antiparalelos.

Cada elétron de spin desemparelhado dos cátions de Fe^{+2} produz um momento magnético de $1\mu_B$.

O diâmetro crítico abaixo do qual a magnetita apresenta-se no regime superparamagnético é de 25 nm [20].

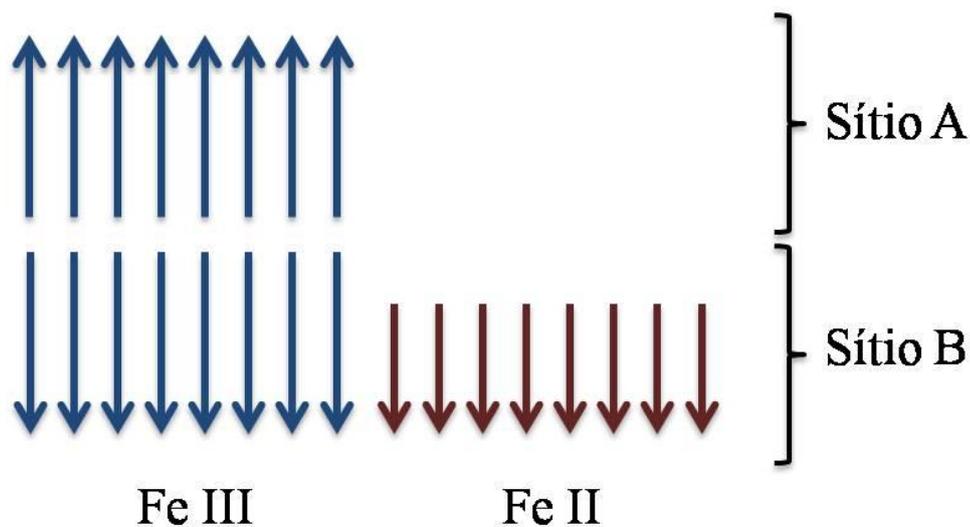


Figura 2.6: Esquema de distribuição dos momentos magnéticos da magnetita.

2.2.2 Principais Métodos de Síntese

Na natureza a magnetita é naturalmente encontrada em rochas e solos, também pode se encontrada em bactérias (*magnetospirillum*, *magnetotacticum*) e em cérebros de abelhas, de alguns pássaros e até mesmo em cérebros humanos. Esse mineral também pode ser obtido em laboratório através de diversos processos de síntese [21], entretanto o grande desafio é produzir partículas controlando o tamanho, forma e uniformidade do grão, pois esses parâmetros vão afetar a suas propriedades magnéticas e conseqüentemente sua aplicabilidade.

As principais técnicas para síntese de magnetita são por microemulsão, pelo método sol-gel, reações hidrotérmicas e coprecipitação [21]. O método de síntese mais utilizado é a coprecipitação dos sais trivalentes e divalentes do Fe em meio alcalino forte.

2.3 Ação Antimicrobiana da Prata

2.3.1 Introdução

As propriedades antimicrobianas da prata são conhecidas desde a antiguidade, onde a água e outros líquidos eram armazenados em recipientes revestidos de prata, isso tornava a água potável por um maior período de tempo. Na Primeira Guerra Mundial componentes de prata eram utilizados para evitar infecções entre os feridos. Em 1884, tornou-se uma prática comum, introduzida inicialmente pelo obstetra alemão F. Crede, administrar gotas de nitrato

de prata aquoso nos olhos dos recém-nascidos para evitar a transmissão de oftalmia gonorréica neonatal das mães infectadas para seus filhos durante o parto [22].

Centenas de milhões de pessoas já foram expostas a tratamentos clínicos contendo prata, e até mesmo na utilização de água saneada com esse metal, sem relatos de reações tóxicas. Portanto a história epidemiológica da prata mostra que sua toxicidade para mamíferos não é comum, além de não existir evidências de que esse metal apresente atividade cancerígena.

Vários metais pesados podem ser biocidas ou antissépticos, inclusive a prata, a capacidade de quantidades muito pequenas de esses metais pesados exercerem atividade antimicrobiana é referido como ação oligodinâmica, essa ação pode ser observada ao introduzir uma moeda de prata ou cobre em uma placa de Petri inoculada, Figura 2.7, mesmo quantidades extremamente pequenas dos metais de prata e cobre foram capazes de inibir o crescimento bacteriano até uma certa distância ao redor da moeda [23]. Entre os metais, a prata tem sido o que melhor apresenta propriedades antimicrobianas e menor toxicidade para os mamíferos.



Figura 2.7.: Ação oligodinâmica dos metais, as zonas claras representam o inibição do crescimento bacteriano, o pingente e a moeda de cinco centavos norte-americanos, possui componentes de prata e a de um centavo contém cobre [23].

Entretanto com a descoberta dos antibióticos, o uso da prata como agente biocida diminuiu. Porém com o surgimento cada vez maior de cepas de microrganismos resistentes

aos antibióticos, o interesse no emprego da prata como agente antibacteriano tem sido renovado.

Recentemente bandagens contendo prata que liberam lentamente os íons Ag^{+1} , tem demonstrado serem úteis contra microrganismos resistentes aos antibióticos, uma combinação comum é a sulfadiazina de prata, que esta disponível como creme tópico para ser usado em queimaduras, além da utilização da prata em cateteres, que são alvos de infecções hospitalares.

2.3.2 Mecanismo de Ação

Embora as propriedades antimicrobianas de prata sejam conhecidas há séculos, só recentemente começamos a compreender os mecanismos pelos quais a prata inibe o crescimento bacteriano. Entre eles podemos destacar: a oxidação catalítica de radicais na superfície celular inibindo a transferência de oxigênio, a reação com radicais presentes na superfície das bactérias interferindo no transporte eletrônico e a associação com o DNA.

As bactérias possuem uma enorme quantidade de enzimas [23], que são principalmente proteínas vitais para as atividades celulares, isso está relacionado a sua forma tridimensional, que é mantida por ligações químicas que unem as porções adjacentes da cadeia dos aminoácidos onde ela se dobra sobre si mesma, Figura 2.8, algumas dessas ligações são pontes de hidrogênio susceptíveis ao rompimento, há também ligações covalentes, que embora sejam mais fortes podem também serem rompidas, causando a desnaturação da proteína.

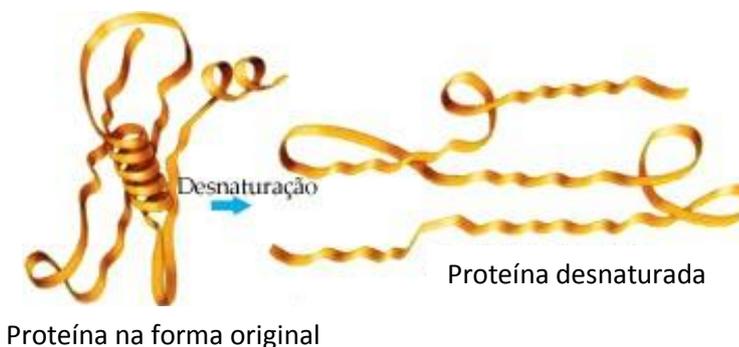


Figura 2.8: Representação da forma tridimensional da molécula de proteína normal à esquerda, e desnaturada à direita.

As pontes dissulfeto, que desempenham um papel importante na estrutura das proteínas ao unir os aminoácidos com os grupos tíóis expostos, podem ser afetadas pelos íons de prata que reagem com esses grupos presentes nas proteínas da superfície da parede celular das bactérias, que são responsáveis pelo transporte de nutrientes. Esses grupos tíóis são compostos orgânicos que contêm o grupo $-SH$ (designado por grupo tiol, grupo mercaptano ou grupo sulfidríla). Os íons monovalentes de Ag^+ substituem o cátion H^+ e formam grupos $-S-Ag$, Figura 2.9, inativando a proteína e, assim, diminuindo a permeabilidade da membrana, que pode causar eventualmente a morte celular [24, 25].

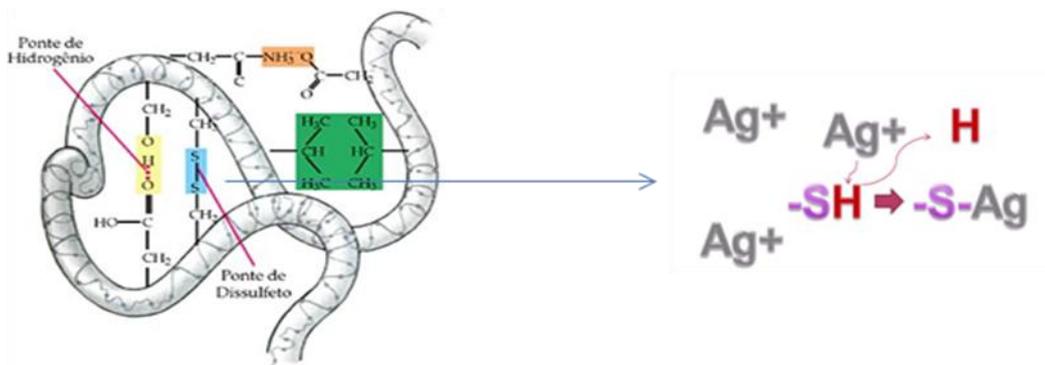


Figura 2.9: Representação da ligação dissulfeto na molécula da proteína, e a quebra dessa ligação pelos íons de prata

Albert T. McManus, MD, diretor de Microbiologia do Institute of Surgical Research, Fort Sam Houston Army Burn Center, Houston, Texas [26], acredita que a prata é capaz de eliminar os microrganismos através de simples reações de redução/oxidação catalítica reagindo com qualquer carga negativa disponível, sendo que na parede celular há uma série de proteínas com carga negativa, essas reações resultam na formação das pontes de dissulfeto. A formação de pontes dissulfeto poderia mudar a forma das enzimas celulares e posteriormente afetar a sua função.

Outro possível mecanismo que explica a ação bactericida da prata foi proposto por Klueh et al e Fox e Modak. [27, 28], onde os íons de prata interagem com os ácidos nucleicos, preferencialmente com as bases nucleotídicas, penetrando nas células e interrompendo as

ligações de hidrogênio entre essas bases do DNA adjacentes purinas(adenina e guanina) e as pirimidinas(timina e citosina), que podem ser visualizadas na Figura 2.10, causando a desnaturação da molécula, embora isso não tenha sido provado,

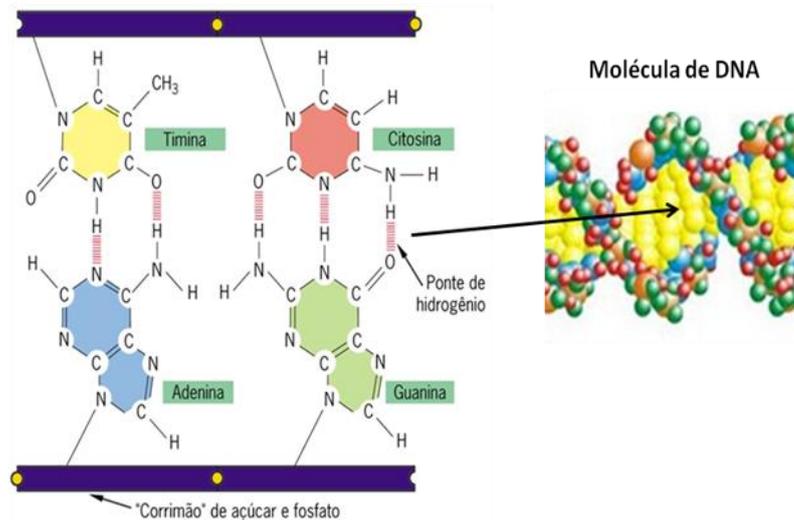


Figura 2.10: Esquema representativo da molécula de DNA e detalhamento das ligações entre as bases purinas e pirimidinas.

A maioria desses mecanismos de ação biocida está relacionado com fato de que a prata penetra na célula atravessando sua membrana hidrofóbica e acessando ao citoplasma, isto é através de proteínas transmembrana que são responsáveis por transportar íons para o interior de célula. Foi mostrado que proteínas transmembrana como o CopB-ATPase da bactéria *Enterococcus Hirae* teve a capacidade de transportar íons de prata, embora a proteína seja um transportador de íons cobre [29], isso prova que embora não exista mecanismos transportadores específicos para a prata, esta tem como penetrar na parede celular.

As propriedades antibacterianas da prata só estão presentes em sua forma ionizada [30, 31], em sua forma não ionizada ela é inerte [32], entretanto o contato com a umidade leva a liberação de íons [33], portanto todas as formas de prata ou compostos contendo prata, como o óxido de prata [34], que sejam fonte de Ag^+ , apresentam propriedades antibacterianas. Esses íons podem ser incorporados a substâncias de forma que sejam liberados lentamente com o tempo, como acontece com a sulfadiazina de prata, ou até mesmo de uma porção sólida ou em forma de nanopartículas.

2.3.3 Ação da Prata Contra Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

As bactérias são microrganismos procarióticos e estão na faixa dos micrômetros (μm) [23]. Elas podem ser divididas em dois grandes grupos, gram-positivas e gram-negativas, através da técnica de coloração de Gram, desenvolvida pelo médico dinamarquês Hans Christian Gram em 1884 [23], um esquema do procedimento é demonstrado através da Figura 2.11 abaixo:

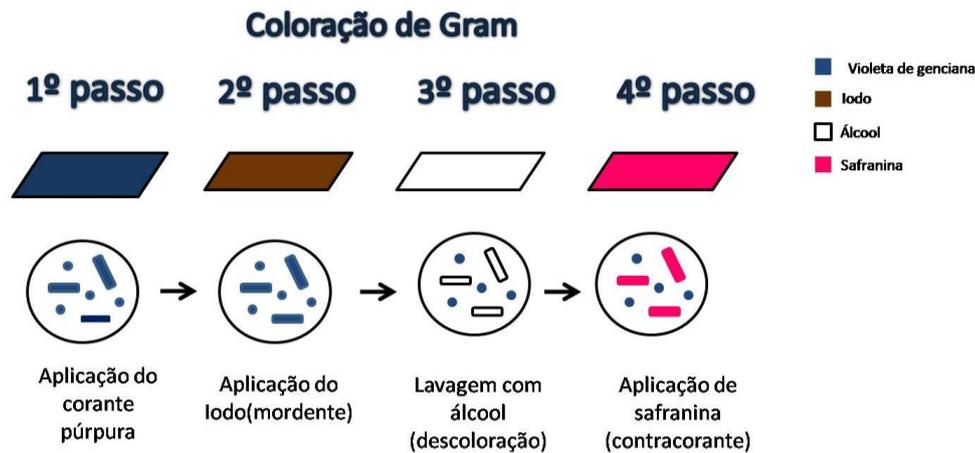


Figura 2.11: Esquema da técnica de coloração de Gram

O corante púrpura e o iodo se combinam na parede celular de cada bactéria e a coram de violeta escuro ou púrpura, as bactérias que retêm essa cor após lavagem com álcool são classificadas como gram-positivas e as que perdem a cor violeta escuro ou púrpura após a descoloração são classificadas como gram-negativas, como essa classe de bactérias perde a cor após a lavagem com álcool deixam de ser visíveis, daí a necessidade de aplicar o corante básico safranina, que as cora de rosa.

Essa reação diferente a coloração Gram está relacionada a diferenças estruturais presentes nas paredes celulares desses dois grupos de bactérias [23]. A parede celular das bactérias é extremamente complexa, essa estrutura reveste a membrana plasmática protegendo o interior da célula, e é composta de uma rede macromolecular denominada peptidoglicana, que consiste em um dissacarídeo repetitivo unido por polipeptídeos consistindo uma rede que circunda e protege toda a célula. A porção dissacarídica é composta por monossacarídeos denominados N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, as estruturas podem ser observadas através da Figura 2.12.

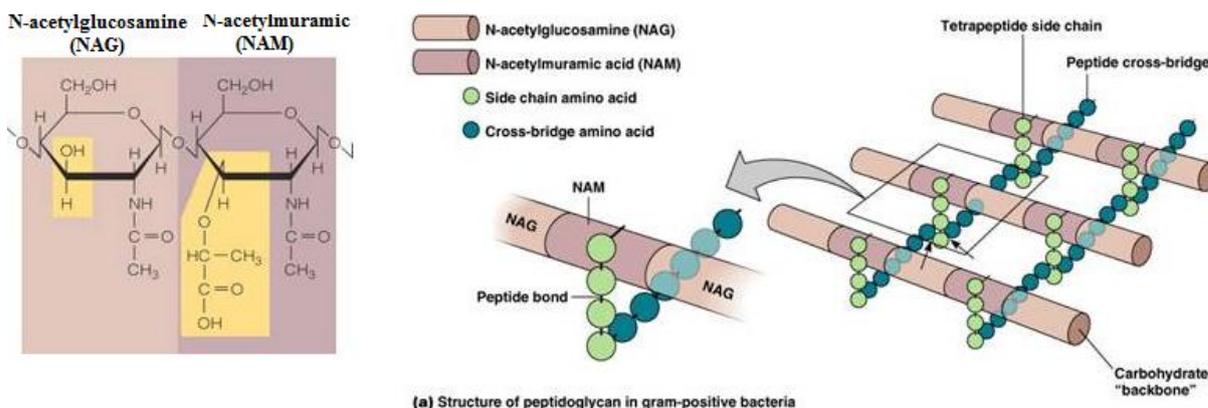


Figura 2.12: Fórmulas estruturais do N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico (A), e representação da peptideoglicana (B) [23].

Nas bactérias gram-positivas a parede celular consiste de muitas camadas de peptideoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida, entre 20 à 80nm [23], diferente das gram-negativas que possuem apenas uma camada de peptideoglicana, além disso as bactérias gram positivas contém ácidos teicóicos que consiste principalmente em um álcool e fosfato, esses ácidos possuem carga negativa relacionada aos grupos fosfato, e eles podem regularizar o movimento dos cátions para dentro e fora da célula. Podemos ver uma ilustração da parede celular das bactérias gram-positivas na Figura 2.13 e das gram-negativas na Figura 2.14.

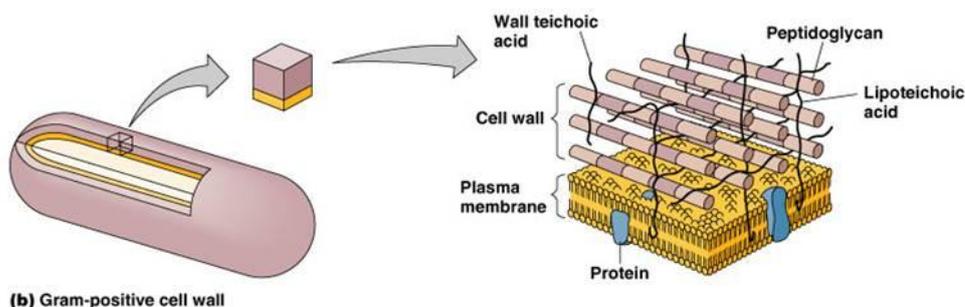


Figura 2.13: Representação da parede celular das bactérias gram-positivas [23].

A parede celular das bactérias gram-negativas consiste de uma ou poucas camadas de peptideoglicana e uma membrana externa [23], a peptideoglicana esta ligada a lipoproteínas na membrana externa e esta no periplasma, que contém uma alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte, essa parede celular não contém ácido teicóico.

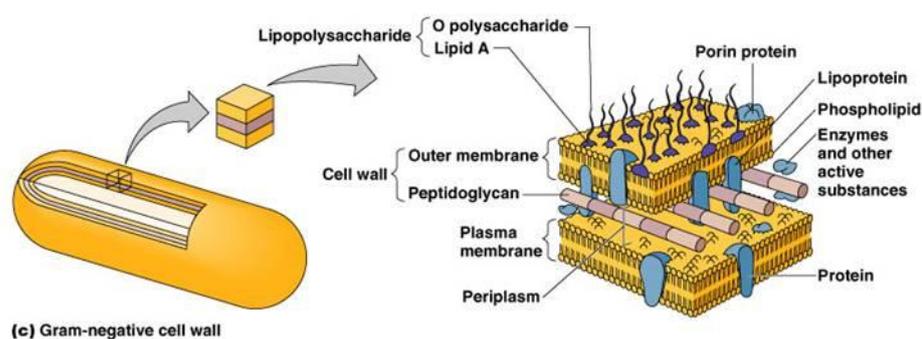


Figura 2.14: Representação da parede celular das bactérias gram-negativas [23]

Feng et al [25], conduziu um estudo para observar os efeitos dos íons de prata sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas, o autor utilizou AgNO_3 em solução aquosa com as bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* (bactéria positiva) e *Escherichia coli* (bactéria negativa) num período que variou entre 4- 12 horas antes de realizar microscopia eletrônica de transmissão. Eles observaram que as células que foram expostas aos íons apresentaram uma condensação do DNA, de acordo com a Figura 2.15, o autor propôs que essa condensação esta relacionada com uma medida de proteção das informações genéticas da célula, porém, esse efeito pode impedir a replicação das células, evitando a transcrição com o DNA polimerase. O descolamento da membrana celular da parede celular também foi evidenciado assim como o surgimento de grânulos densos, Figura 2.15, dentro e fora da célula, esses grânulos foram extraídos e submetidos a microanálise de raio-X para determinar sua composição, e descobriu-se que os mesmos eram compostos de prata e enxofre, esse fato reforça a ideia de que a prata inativa proteínas ligando-se a compostos contendo enxofre.

As bactérias *E. coli*, gram-negativas, apresentaram maior dano estrutural do que *S. aureus*. O fato das bactérias positivas serem menos susceptíveis a prata do que as bactérias negativas esta relacionado ao fato de que essas bactérias tem um maior número de peptidociclicos, já que sua parede celular é mais espessa, os peptidociclicos são carregados negativamente e os íons de prata positivamente, portanto esses íons podem ficar presos a essas proteínas, em maior número nas bactérias positivas do que nas negativas, essa resistência também pode ser explicada pelo simples fato de que sua parede celular é mais espessa.

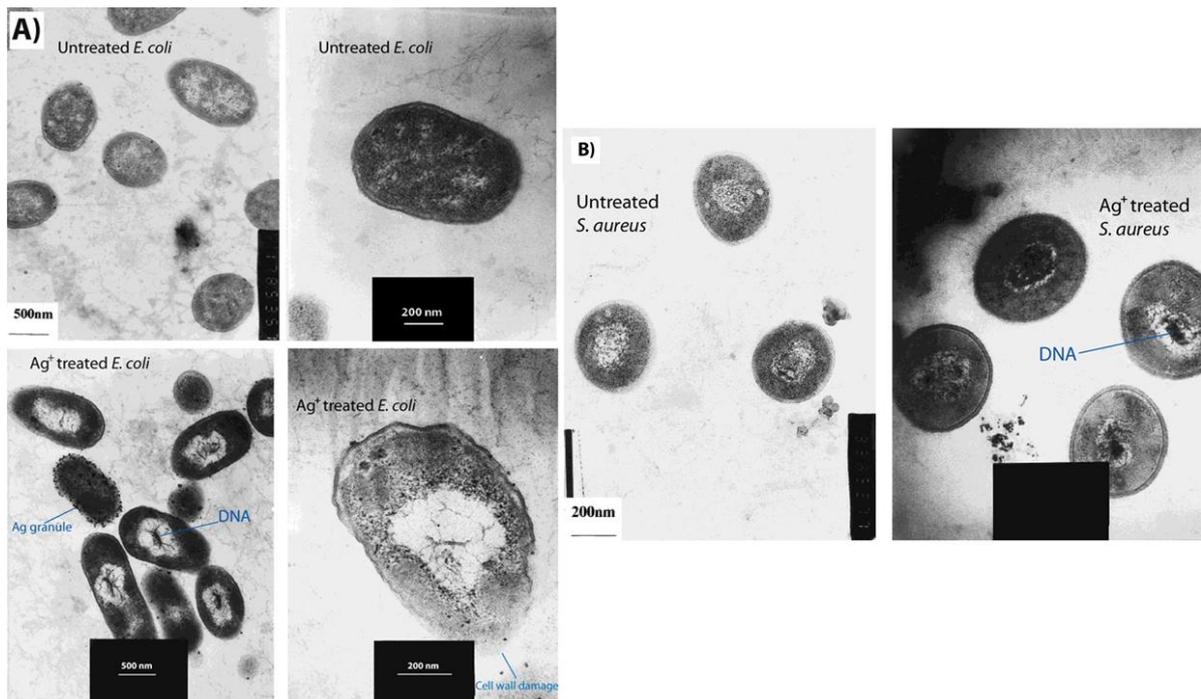


Figura 2.15: Estudo da interação dos íons Ag^+ em bactérias Gram positivas e negativas segundo Feng et al [23]. Imagem obtida através de microscopia eletrônica de transmissão, mostra o tratamento com Ag^+ de células de *E. Coli* (A) e *S. Aureus*(B). O tratamento resultou em condensação do DNA, danos à parede celular e formação de grânulos [25].

Guggenbichler et al [32], demonstrou que o tratamento com prata leva a lise de membrana da célula, de acordo com a Figura 2.16 , como já havia sido evidenciado por Feng et al [27], após a interação com a prata a parede celular sofre danos que chegam até a membrana celular, esses danos podem levar a fuga do citoplasma da célula o que resultaria em desidratação e encolhimento da célula.

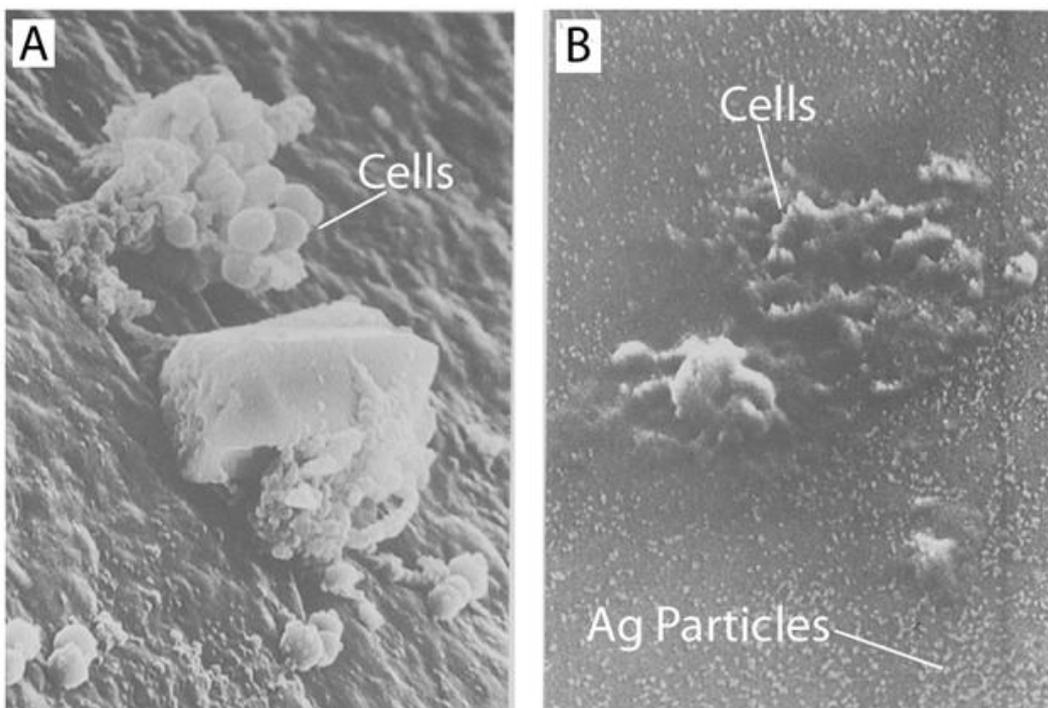


Figura 2.16: O tratamento com prata leva à desidratação das células microbianas. A) *S. aureus* sem tratamento com prata, encontrado em um cateter. B) *S. aureus* numa superfície contendo micropartículas de prata em toda a sua matriz. Ambas as imagens foram obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura [32].

2.3.4 Ação da Prata na sua Forma Nanoestruturada

A prata na sua forma nanoestruturada tem se mostrado altamente eficaz na sua ação antibacteriana. Castanon Martinez et al. [35], em seu trabalho estuda o efeito do tamanho das nanopartículas sob sua ação antibacteriana, o autor sintetizou partículas de prata de diferentes diâmetros e utilizou microscopia eletrônica de transmissão para definir o tamanho médio de suas estruturas. Foram realizados testes bactericidas com *E. coli* e *S. aureus*, os resultados mostraram que as nanopartículas menores tem maior efeito biocida, esse fato pode estar relacionado a ideia de que partículas menores tem maior área superficial por grama de material e maior facilidade de atravessar a membrana celular e área superficial maior, portanto as partículas menores tem maior quantidade de átomos em contato com a solução, produzindo mais íons de prata que são os responsáveis pela ação antibacteriana.

2.3.5 Toxicologia da Prata

Não se sabe muito respeito dos efeitos da prata no organismo dos seres humanos e no meio ambiente. Como as células animais não possuem grupos tíois exteriores, a maioria dos pesquisadores acredita que esses íons sejam inertes nos animais não causando nenhuma toxicidade para suas células. Braydich-Stolle et al. [36] elaborou um estudo da prata em gametócitos, e concluiu que as células adultas *C18-4 germline* se mostraram bastante sensíveis as nanopartículas de prata em relação a outras linhas celulares geralmente utilizadas em estudos de toxicidade. Prata nanoestruturada de determinados diâmetros, tem a capacidade de afetar a função das mitocôndrias, interferindo na síntese de ATP (nucleotídeo responsável pelo armazenamento de energia em suas ligações químicas). O estudo sugeriu que essas partículas poderiam ser tóxicas para os ossos e outros tecidos que poderiam estar em contato direto com o metal, nesse estudo a citotoxicidade da prata nas células germinativas adultas foi comparada com a causada com outros metais nanoparticulados, tais como o cádmio, o alumínio, e o molibdênio, concluindo que a prata era a mais tóxica aos gametócitos do que os outros metais avaliados.

A exposição a níveis elevados de prata por longos períodos de tempo leva a uma condição conhecida como Argiria [37], uma coloração azul-acinzentada da pele e outros tecidos corporais.

2.4 Quitosana como Agente Biocida

2.4.1 Propriedades Físico-químicas da Quitosana

A quitina, componente estrutural dos exoesqueletos dos crustáceos, insetos e alguns fungos, é um homopolissacarídeo linear composto por unidades 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glucose (95%) e 2-amino-2-deoxi- β -D-glucose (5%) ligados através de ligações $\beta(1\rightarrow4)$, esse polímero possui diversas semelhanças com a celulose, a diferença está na substituição dos grupos hidroxilas na celulose pelos grupos amino acetilados na quitina. Depois da celulosa a quitina é considerada o polímero mais abundante da natureza com milhões de toneladas produzidas anualmente. A fórmula estrutural da quitina e quitosana poder ser vistas na Figura 2.17.

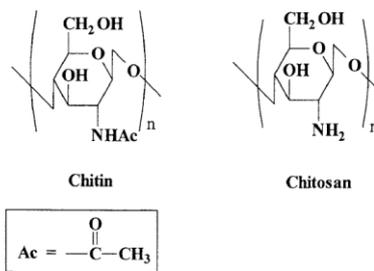


Figura 2.17: Representação estrutural da quitosana e da quitina [38]

A quitosana é um polímero linear composto de unidades 2-amino-2-deoxi-β-D-glucose (60~100%) e 2-acetamino-2-deoxi-β-D-glucose (0-50%). O processo que dá origem a quitosana pode ser de natureza química ou biológica, porém o método mais empregado é a desacetilação da quitina com NaOH, um esquema desse método pode ser visto na Figura 2.18. Como podemos perceber antes da etapa de desacetilação propriamente dita, a quitina passa por outros processos tais como desproteíntização, descalcificação e descoloração [37].

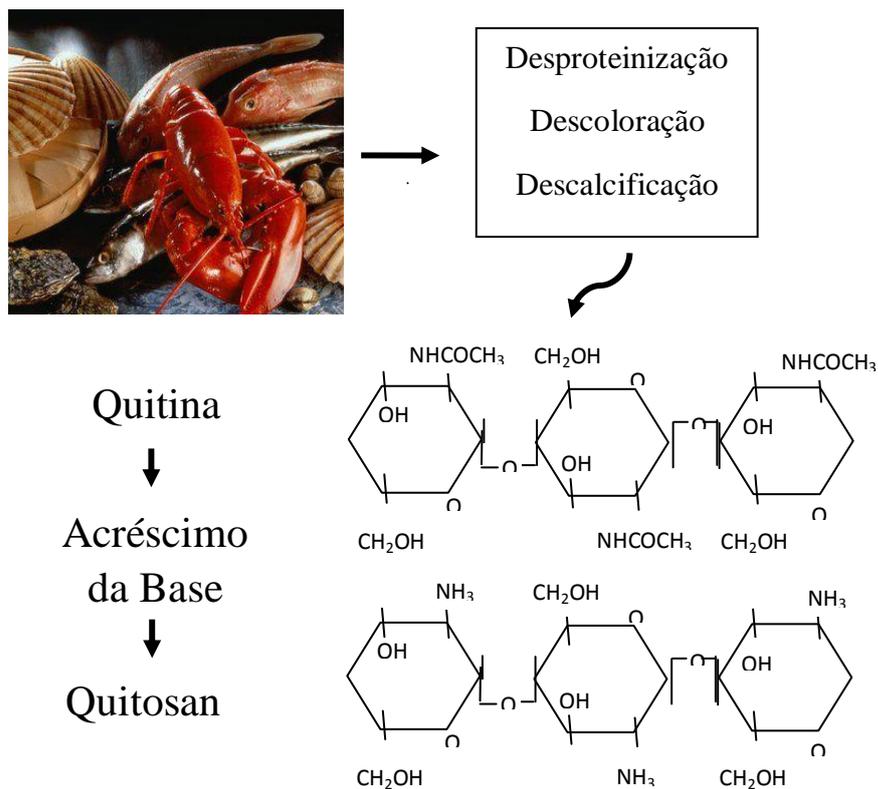


Figura 2.18: Esquema de obtenção da quitosana a partir do exoesqueleto dos crustáceos.

A desacetilação da quitina é a etapa de maior importância na obtenção da quitosana, pois é ela que irá determinar a quantidade de grupos amínicos livres, os quais serão responsáveis por definir não somente a identidade química da quitosana mas também sua aplicação [40, 41].

A massa molar da quitina natural está em torno de 1×10^6 Da, ($1\text{Da} = 1 \text{ g/mol} = 1,66 \times 10^{-27} \text{ kg}$) enquanto que a da quitosana comercial é em média 1×10^5 Da e depende diretamente das condições de produção do polímero [42].

A quitosana é facilmente solúvel em soluções ácidas diluídas (ácido acético, cítrico, fórmico, láctico) com pH entre 2,0 e 6,0 [43, 44]. A solubilidade desse polímero está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) em sua cadeia, quando maior a quantidade desses grupos, maior será a repulsão eletrostática entre as cadeias e conseqüentemente maior a dissolução em água [45].

A quitosana é biodegradável, biocompatível e possui a capacidade de formar complexos com os íons metálicos, devido a existência dos grupos amins em sua estrutura, como vimos na Figura 2.17.

2.4.2 Propriedade Antimicrobiana

Várias pesquisas tem demonstrado o potencial biocida da quitosana ao longo dos anos, tendo eficiência contra microrganismos tais como *Streptococcus faecalis* [46], *Salmonella entérica*, *S. paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* [47], *Listeria monocytogenes* [48], *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* [49], *Sacharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Zygosaccharomyces baillii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.* [50, 51].

Essa capacidade é afetada diretamente por uma série de fatores tais como: grau de desacetilação, massa molecular, pH e temperatura [52], essas variáveis atuam modificando a estrutura do polímero e portanto seu potencial biocida.

Não se sabe bem ao certo os mecanismos pelos quais a quitosana apresenta ação antibacteriana. Dentre os mecanismos propostos o mais aceito consiste na interação eletrostática existente entre as cargas positivas dos grupos amínia do polímero com as moléculas aniônicas presentes na membrana celular, o que provoca alterações na permeabilidade da membrana resultando em perda de componentes intracelulares

comprometendo dessa forma o metabolismo microbiano, podendo levar a morte celular [52, 53].

Pesquisas mostram que a ação da quitosana em bactérias gram-positivas e gram-negativas é distinta, na primeira classe de bactérias o biopolímero é mais eficiente quando apresenta maior massa molecular, e o polímero de menor massa molecular é o que tem apresentado maior inibição das bactérias gram-negativas. Supõe-se que nas positivas o polímero de alta massa molecular atua como um filme ao redor da célula inibindo a absorção de nutrientes, nas negativas a quitosana de menor massa molecular penetra mais facilmente através da membrana celular e se liga ao DNA impedindo sua transcrição e tradução, o que provoca distúrbios no metabolismo celular [54, 55].

CAPITULO 3:

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental foi realizado em três etapas, a primeira etapa consiste na produção de quitosana magnética utilizando magnetita com um tamanho controlado, a segunda etapa consistiu na produção de esferas magnéticas de alginato dopadas com Ag ou Ag₂O para realização de testes bactericidas, a terceira e última etapa do trabalho foi revestir as esferas com uma camada de quitosana, para potencializar sua atividade biocida.

Para caracterização estrutural e magnética desses materiais foram realizadas medidas de Difração de raios-X, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Absorção Atômica, Magnetometria, Espectroscopia Mössbauer, Espectrofotometria e também foram realizados testes bactericidas.

Os reagentes utilizados tinham grau analítico (P.A.) estão listados na Tabela 3.1, assim como sua fórmula química, peso molecular e procedência.

Tabela 3.1: Reagentes usados nos procedimentos experimentais

Reagente	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)	Fabricante	Observações
Hidróxido de sódio	NaOH	40,00	VETEC	
Nitrato de prata	AgNO ₃	169,97	VETEC	
Nitrato de zinco	Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	269,48	VETEC	
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	278,01	Synth	
Nitrato férrico	Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	404,00	VETEC	
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	210,14	ECIBRA	
Glutardialdeído	C ₅ H ₈ O ₂	100,12	VETEC	25% em água
Ácido clorídrico	HCl	36,46	Synth	37% em água
Quitosana			Polymar	Grau dessacetilação: 85%
Ácido algínico de sódio			Sigma	Viscosidade média
Cloreto de cálcio	ClCa		Sigma	
Tween 80			Sigma	

3.1 Materiais

3.1.1 Solução de Quitosana

A quitosana utilizada nesse trabalho possui as seguintes características: grau de desacetilação de 85%, peso molecular de 0,31g/mol e pH 8,5, lembrando que a quitosana foi mantida a temperatura ambiente em recipiente fechado e protegido da luz.

A solução de quitosana foi preparada à temperatura ambiente dissolvendo-se 2% de quitosana em solução aquosa de ácido cítrico à 5%, que permaneceu 24hs em agitação, após esse período a solução foi filtrada para retirada de resíduos indesejados. O pH final da solução ficou em torno de 2.

Para reticulação do polímero usamos o glutaraldeído, nesse processo os grupos aminas livres são ligados ao grupamento aldeído do reticulante, fazendo com que o polímero assumira a forma de gel, uma ilustração desse processo pode ser vista na Figura 3.1.

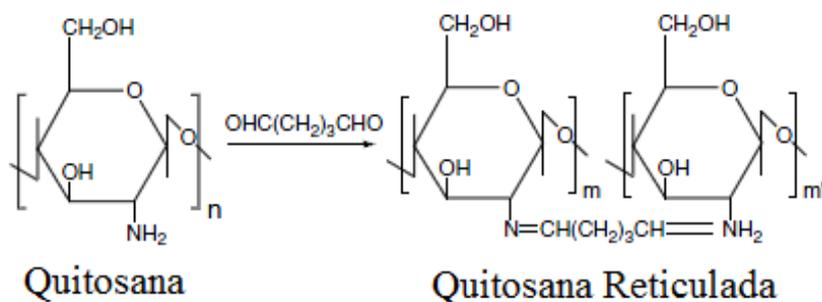


Figura 3.1: Reticulação da quitosana com o glutaraldeído [52]

3.1.2 TWEEN 80

O Tween 80 é um surfactante não iônico e emulsivo, proveniente do sorbitano polietoxilado e ácido oléico, sua estrutura molecular pode ser observada na Figura 3.2 [53]. Esse surfactante é um tensoativo hidrofílico, solúvel em água e é geralmente empregado para obter emulsões do tipo óleo em água.

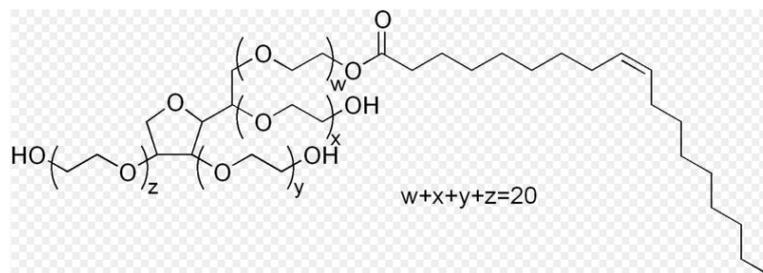


Figura 3.2: Estrutura molecular do Tween 80

O Tween 80 possui em sua estrutura molecular uma parte hidrofílica (cabeça) e uma parte hidrofóbica (cauda). Com a adição desse surfactante, de acordo com uma concentração específica, as moléculas passam a se agregar em forma de micelas, as regiões hidrofóbicas do surfactante formam núcleos apolares mantendo afastada as moléculas de água, e a região hidrofílica forma núcleos polares, mantendo as moléculas de óleo afastadas.

3.1.3 Solução de Alginato

O ácido algínico é um biopolímero linear que está presente na parede celular das algas marinhas castanhas pertencentes à classe *Phaeophyceae*, o ácido algínico pode representar cerca de 40% de sua massa seca.

O ácido algínico é composto por dois ácidos urônicos β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-galurônico (G) unidos por ligações glicosídicas, que devido a orientação dessas ligações as regiões nas que predominam os blocos –M adquirem forma linear, enquanto as regiões de blocos-G adquirem forma ondulada, essa estrutura pode se observada na Figura 3.3.

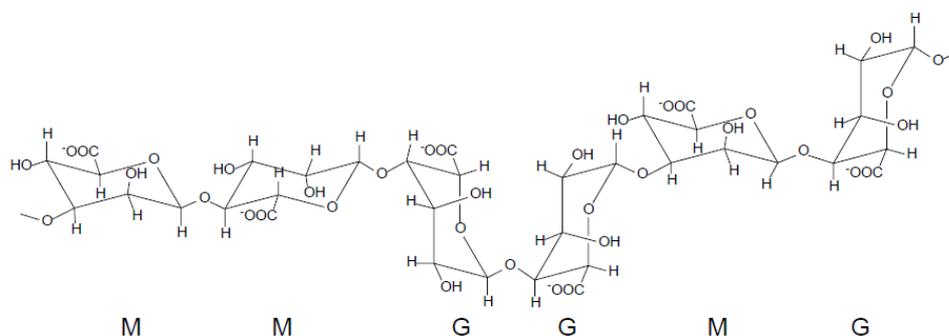


Figura 3.3: Estrutura do ácido algínico.

Os alginatos são sais do ácido algínico, polissacarídeos frequentemente usados em vários setores industriais, esses sais podem obtidos quando íons H^+ do ácido algínico são substituídos por cátions mono ou divalentes.

Em presença de íons divalentes, como os de Ca^{+2} , as regiões de blocos-G da cadeia polimérica se aproximam e formam estruturas dimérica, os íons divalentes interagem com o anion carboxilato e com os grupos hidroxila, essa propriedade é a responsável pela capacidade dos alginatos formarem géis, Figura 3.4.

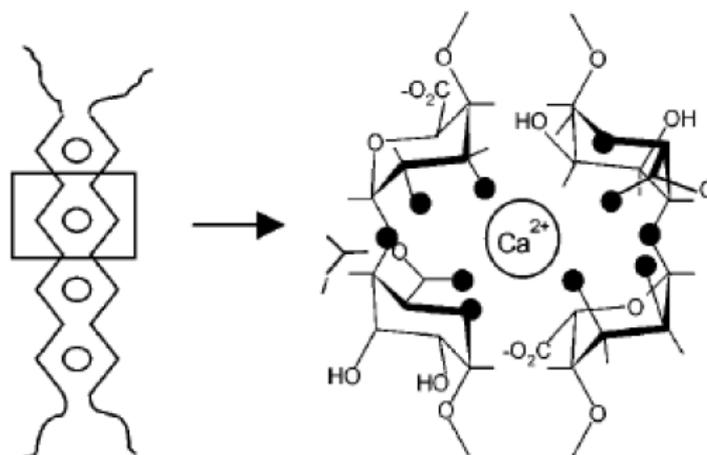


Figura 3.4: Esquema representativo da interação dos blocos-G com os íons de cálcio.

3.2 Primeira etapa: Síntese de Quitosana Magnética

Na síntese de quitosana magnética preparamos duas series de amostras, uma com acréscimo do Tween 80 e a outra sem o surfactante. A concentração de glutardialdeído e o tempo de gelificação foram variáveis nesse processo. Nas Tabelas 3.2-A e B podemos observar essa variação, salientando que as concentrações de glutardialdeído são obtidas com relação ao volume da solução de quitosana e a massa de Fe corresponde à massa total de Fe^{2+} e Fe^{3+} , onde o números de moles desses íons estão de acordo com a composição estequiométrica para a formação de magnetita, $M(Fe^{3+})/M(Fe^{2+})=2$.

Tabela 3.2-A: Amostras sem o Tween, variando a concentração de glutaraldeído.

Amostra	Massa do Fe(g)	Concentração glutaraldeído % v.	Tempo de gelificação (hs)
UF6	0,4	0	-
M1	0,4	1	24
M2	0,4	3	24
M3	0,4	4	24
M4	0,4	5	24
UF12	0,4	10	4
UF13	0,4	20	3,5

Tabela 3.2-B: Amostras com Tween 80, variando a concentração de glutaraldeído

Amostra	Massa do Fe(g)	Concentração glutaraldeído %v.	Tempo de gelificação (hs)
UF11	0,4	20	1
UF16	0,4	10	3,5
UF17	0,4	5	7

O método para preparação consiste na dissolução de sais de nitrato férrico (Fe^{+3}) e sulfato ferroso (Fe^{+2}) na seguinte relação molar $\text{Fe}^{+3}:\text{Fe}^{+2}=2:1$ em solução de quitosana, que após ser homogeneizada, acrescenta-se ou não, sendo esse fator uma das variáveis na síntese dessas amostras, 0,148g de Tween 80 (essa massa corresponde à concentração micelar crítica do surfactante disperso em água [54]), e agita-se por mais 30min, em seguida adicionamos diferentes concentrações de glutaraldeído para reticulação da quitosana, a amostra foi deixada em repouso até ficar completamente gelificada. Após a gelificação as amostras foram esmagadas com auxílio de uma espátula, posteriormente acrescentamos 50 ml de solução de NaOH à 20% à temperatura ambiente em cada amostra e esperamos em média 1h para iniciarmos a lavagem para remoção da solução de NaOH, as amostras foram secas na estufa à uma temperatura de aproximadamente 80°C.

3.3: Segunda Etapa: Esferas Magnéticas de Alginato Contendo Prata ou Oxido de Prata e seu Efeito Antibacterial.

O alginato foi utilizado para encapsular as nanopartículas de oxido de prata e magnetita. Tanto a prata metálica como oxido de prata e a magnetita foram preparadas separadamente, e depois mistura na solução de alginato, então a dispersão foi gotejada numa solução contendo ClCa para a gelificação do polímero.

3.3.1 Síntese de Nanopartículas de Prata.

Para sintetizar as nanopartículas de prata metálica, 0,3g de nitrato de prata foram diluídos em 10ml de solução de quitosana com o auxílio de um agitador magnético por 15min, após esse período a solução foi gotejada em uma solução de NaOH à 20% em banho Maria à uma temperatura de aproximadamente 80°C, surgindo precipitados negros, após 15min a dispersão foi retirada do banho Maria e permaneceu em repouso por 3hs, posteriormente os precipitados foram lavados acrescentado água destilada e centrifugados para remoção do sobrenadante, essa etapa foi repetida 10 vezes até que a amostra apresentasse pH próximo de neutro. Na última etapa os precipitados foram colocados num forno à uma temperatura de 400°C por 2hs para calcinar a quitosana. Na Figura 3.3 temos um esquema desse processo de síntese.

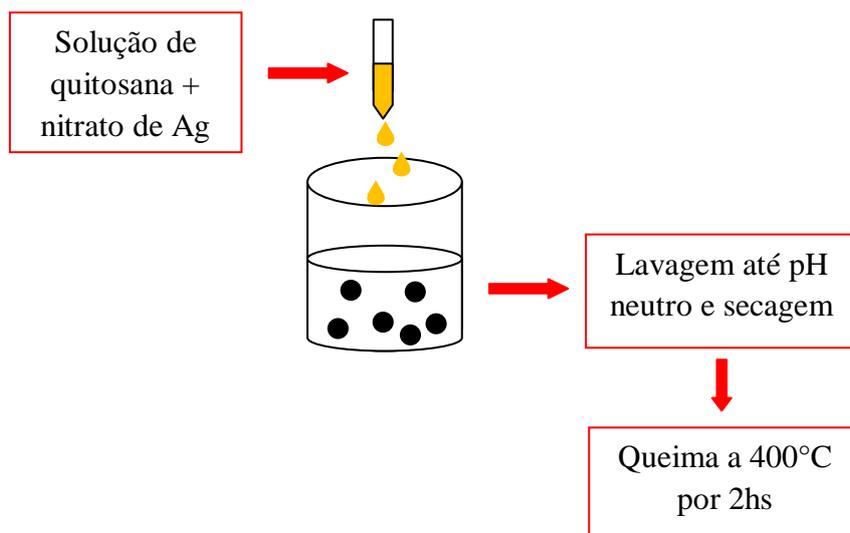


Figura 3.5: Esquema de preparação de nanopartículas de prata metálica.

3.3.2 Síntese de Nanopartículas de Óxido de Prata

Nanopartículas de óxido de prata foram sintetizadas a partir da técnica de coprecipitação em meio alcalino. Inicialmente 150ml de solução à 5% de NaOH apresentando um pH de 14, foi colocada em banho Maria com glicerina, até atingir uma temperatura de 80°C, sequencialmente foi adicionada uma solução de nitrato de prata (0,54g de nitrato de prata em 30ml de H₂O destilada) e esperou-se 15min para retirar a amostra do banho Maria, surgindo precipitados inicialmente esverdeados, a cor das partículas mudou para preto depois de 15min adicionais, as partículas foram lavadas com água destilada, com o auxílio de uma centrifuga para retirada da solução de NaOH, posteriormente a amostra foi seca na estufa à 80°C.

3.3.3 Preparação de Nanopartículas de Magnetita

A síntese da magnetita nanoestruturada foi realizada a partir do método de coprecipitação em meio alcalino. Inicialmente acrescentamos sais de nitrato férrico e sulfato ferroso em uma solução diluída de HCl, na proporção molecular de Fe³:Fe²=2:1. Posteriormente despejamos a solução em outra solução de NaOH, sob agitação mecânica por 15min. A lavagem foi realizada com água destilada através do mesmo processo descrito acima para a lavagem do óxido de prata. A amostra foi seca na estufa à uma temperatura de 100°C.

3.3.4 Síntese das Esferas de Alginato Contendo Magnetita e Prata ou Magnetita e Óxido de Prata

Para sintetizar as esferas de alginato dopadas com magnetita e prata inicialmente preparamos 10ml de solução aquosa de alginato à 1% e acrescentamos 0,08g de nanopartículas de magnetita e 0,05g de nanopartículas de prata, agitamos com auxílio de um vortexer por 5min, a solução foi então gotejada em uma solução de cloreto de cálcio à temperatura ambiente para reticulação, as esferas ficaram sólidas após um período de 4hs,

posteriormente foram lavada acrescentando-se 200ml de água destilada e descartando o sobrenadante com auxílio de um imã, esse processo foi repetido 5 vezes.

Para produção das esferas com oxido de prata no lugar da prata metálica repetimos o mesmo processo substituindo as 0,05g de Ag por 0,1g de nanopartículas de Ag_2O , como ilustrado através da figura 2.7 abaixo.

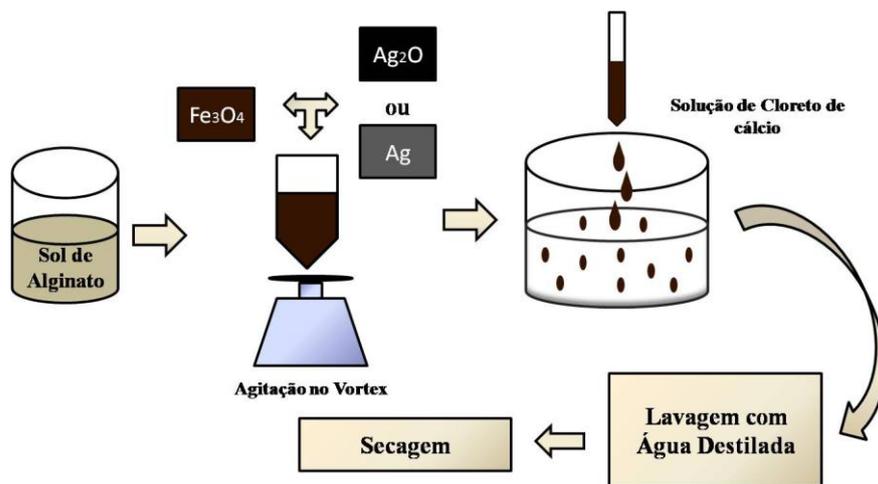


Figura 3.6: Esquema da síntese das esferas de alginato dopadas com Ag_2O ou Ag .

3.4 Terceira Etapa: Preparação de Nanocompósitos de Magnetita e Oxido de Prata em Matriz de Alginato Revestida por uma Camada de Quitosana

Os nancompósitos foram preparados como indicado no item 3.3.4. a seguir as partículas foram revestidas com quitosana, o nanocompósito foi adicionado a uma solução de 20ml de quitosana diluída em 40 ml de solução de ácido cítrico a 2% e esperamos um intervalo de tempo de 12hs, após esse tempo as esferas foram retiradas da solução e utilizadas nos testes bactericidas. A camada de quitosana formou-se devido à interação eletrostática dos grupos amina e carboxílicos contidos na quitosana e no alginato, respectivamente.

3.5 Teste Bactericida

Os testes bactericidas foram realizados no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pertencente ao departamento de Ciências Animais da Universidade Federal

Rural do Semiárido, UFERSA. Foram utilizadas duas cepas bacterianas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* para realização dos testes.

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, bacilar. Essa bactéria pertence a família das Enterobacterias, são aeróbicas e anaeróbicas facultativas, seu habitat natural é o trato intestinal dos animais, incluindo o homem. O tipo de *E. coli*, presente no intestino do indivíduos é bem conhecida e controlada pelo sistema imunológico, geralmente essas bactérias são evacuadas do organismo através das fezes, portanto a existência de *E. coli* na água ou em alimentos é indicativa de contaminação por fezes. Uma imagem de microscopia eletrônica de *E. coli* pode ser observada na Figura 3.8.

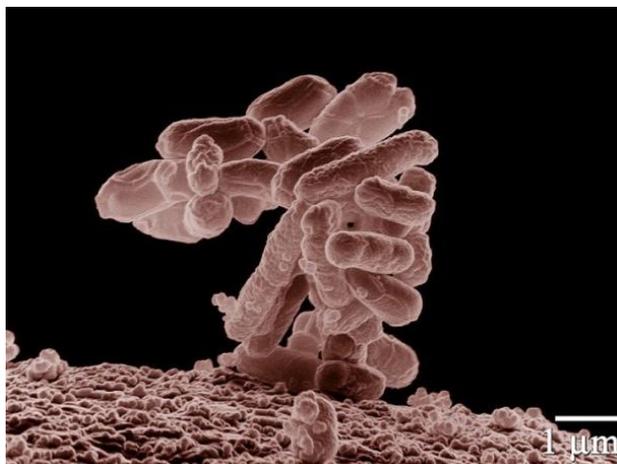


Figura 3.7: Imagem de microscopia eletrônica de *E. coli* [57]

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva e está entre as espécies patogênicas mais comuns e virulentas, juntamente com *E. coli*. Essa bactéria possui forma esférica (cocos), que ocorrem em grupos com aspecto de cachos de uvas com uma cor amarelada, cresce bem em ambientes salinos. *S. aureus* produz uma série de toxinas que contribuem para sua patogenicidade, essa bactéria possui habilidade de desenvolver resistência aos antibióticos rapidamente, portanto é muito perigosa em ambientes hospitalares, além de produzir uma enterotoxina que é uma das causas mais comuns de intoxicação alimentar.

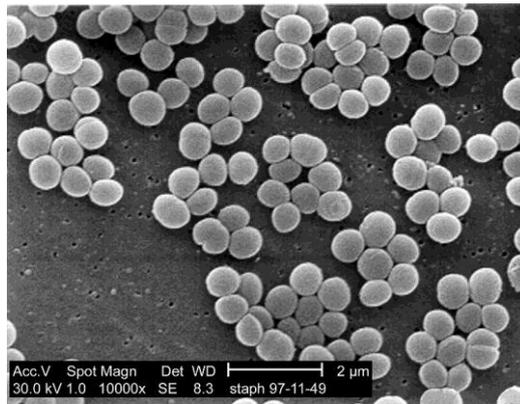


Figura 3.8: Microscopia eletrônica de uma cultura de *S. aureus*

As bactérias foram cultivadas no laboratório, o meio de cultura consiste em um material nutritivo que promove o crescimento dos microrganismos. Elas podem ser cultivadas em meio líquido ou sólido, para solidificação do meio é necessário o acréscimo de um agente solidificante como Agar, que é um polissacarídeo obtido a partir de algas marinhas. O crescimento bacteriano tem comportamento variado como pode ser observado na Figura 3.9 possuindo basicamente quatro fases: a fase lag, que consiste num período em que ocorre pouca ou nenhuma divisão celular, a fase log, período de crescimento exponencial, onde a reprodução celular é extremamente intensa essa é a fase preferencial para realização de testes com as bactérias, fase estacionária, nessa fase a velocidade de crescimento diminui e o número de morte celular é equivalente ao de células vivas, a população bacteriana torna-se estável, e a fase de morte celular, onde ocorre o declínio da população bacteriana até que essa se torne uma pequena fração.

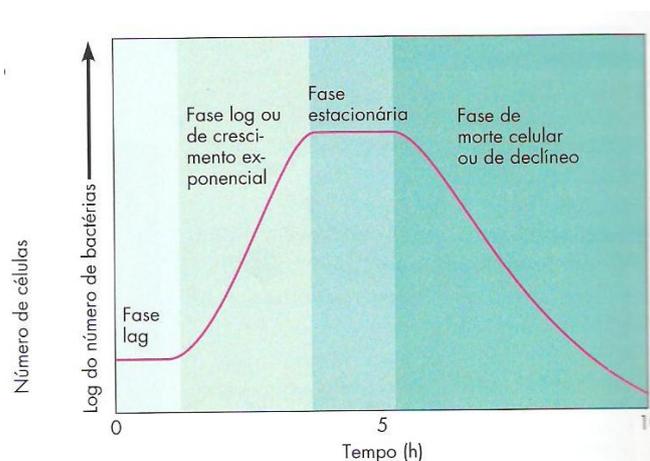


Figura 3.9: Curva de crescimento bacteriano.

Existe uma série de métodos para se quantificar uma população bacteriana, entre as mais comuns está o método de contagem em placas, neste método as amostras a serem analisadas são diluídas de forma apropriada, e semeadas em placas de Petri, contendo o nutriente Agar, após o período de incubação é feita a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), sendo que uma colônia é originada do crescimento e da multiplicação de um grupo de bactérias ou até mesmo de uma única bactéria [23]. Esse método de contagem se baseia na premissa de que cada célula presente em uma amostra irá formar uma colônia separada e visível, quando fixada com meio que lhe permita crescer [58].

Para a cultura líquida utilizamos o meio BHI (Brain and Heart Infusion, HIMEDIA), para preparar esse meio acrescentamos 1.1g BHI em 30ml de água e deixamos em agitação até homogeneizar, colocamos 5ml dessa solução em tubos de ensaio, a seguir os tubos foram autoclavados para esterilização do meio à 121°C por 15min.

Para produzir a cultura sólida preparamos uma solução aquosa de PCA (Plante Count Agar) à 2,35% e autoclavamos a uma temperatura de 121°C por 15mn, a seguir, despejamos 15ml do meio em placas de petri, esperamos 5min até que o meio fique sólido.

As bactérias *E. coli* e *S. aureus*, foram cultivadas em meio líquido a 38°C em uma rotação de 250rpm no shaker até atingir 0,5 correspondente a turbidez de cultivo observada através de espectrofotometria de UV-VIS em 250 nm, cinco tubos foram preparados. Ao atingir essa turbidez, as partículas foram adicionadas nos tubos contendo a suspensão das bactérias e foram então cultivados nos intervalos de tempo determinados, alíquotas foram retiradas dos tubos e semeadas em placas de Petri contendo o meio nutriente Agar, essas placas foram cultivadas numa estufa por 18hs, após esse tempo foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias em cada placas.

Realizamos cinco testes para estudar o potencial bactericida das amostras. No primeiro teste, estudamos a eficiência do óxido de prata e da prata metálica, esses testes foram realizados da seguinte maneira: 0,050g de partículas de prata e óxido de prata foram adicionadas aos tubos contendo as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, quando estas estavam na fase log de crescimento, os tubos foram cultivados no shaker durante 24hs, após esse período alíquotas de 100µl de cada amostra foi retirada dos tubos e semeadas em placas contendo

Agar, sob fluxo laminar. Após o período de incubação em meio sólido foi feita a contagem das UFC. Para obter o resultado em UFC/ml, multiplicamos por 10.

No segundo teste, estudamos a ação biocida das esferas magnéticas de alginato contendo oxido de prata, para certificar que a atividade biocida das esferas era proveniente da liberação de íons de Ag⁺, testamos também as esferas magnéticas de alginato sem o acréscimo do Ag₂O, e fizemos um controle semeando apenas o meio sem a adição de nenhuma das amostras citadas acima. As esferas magnéticas de alginato recobertas com quitosana e contendo oxido de prata, também foram testadas.

Também realizamos estudos da cinetica de eliminação dos microrganismos. Para esse estudo alíquotas de 10µl do sobrenadante (líquido) das culturas contendo as partículas ou esferas foram retiradas dos tubos nos intervalos de tempo de 0, 60, 120, 180, 240, 300 e 360min, semeadas nas placas e encubadas na estufa por 18hs, ao termino desse período foi feita a contagem das UFC e o resultado foi multiplicado por 100 para obtermos valores em termos de UFC/ml. Esse teste foi repetido três vezes para fazermos uma estatística da atividade bactericida das amostras.

3.6 Métodos de caracterização dos materiais

3.6.1 Difração de raios-X

Para análise estrutural das amostras utilizamos a difração de raios-X, essa técnica se baseia na premissa de que quando um feixe de raio-X atinge uma material cristalino, os raios são difratados pelos planos cristalinos. Esse fenômeno é regido pela lei de Bragg, dado pela expressão 3.1 [59].

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad 3.1$$

Onde λ é o comprimento de onda da radiação incidente, n é um número inteiro (ordem de difração), d é a distancia interplanar para o conjunto de planos hkl (índices de Miller) na estrutura cristalina e θ é o ângulo medido entre radiação incidente e os planos cristalinos.

O difratômetro usado para análise estrutural foi da marca Rigaku Miniflex II, com fonte de radiação de $CuK\alpha$ que tem comprimento de onda de 1,5418Å. Uma imagem do difratometro é apresentada na Figura 3.10.

As medidas foram realizadas entre os ângulos 15° e 85° , com passo $0,02^\circ$. Essas medidas foram realizadas no Laboratório de Análises Magnéticas e Ópticas (LAMOp) na UERN.

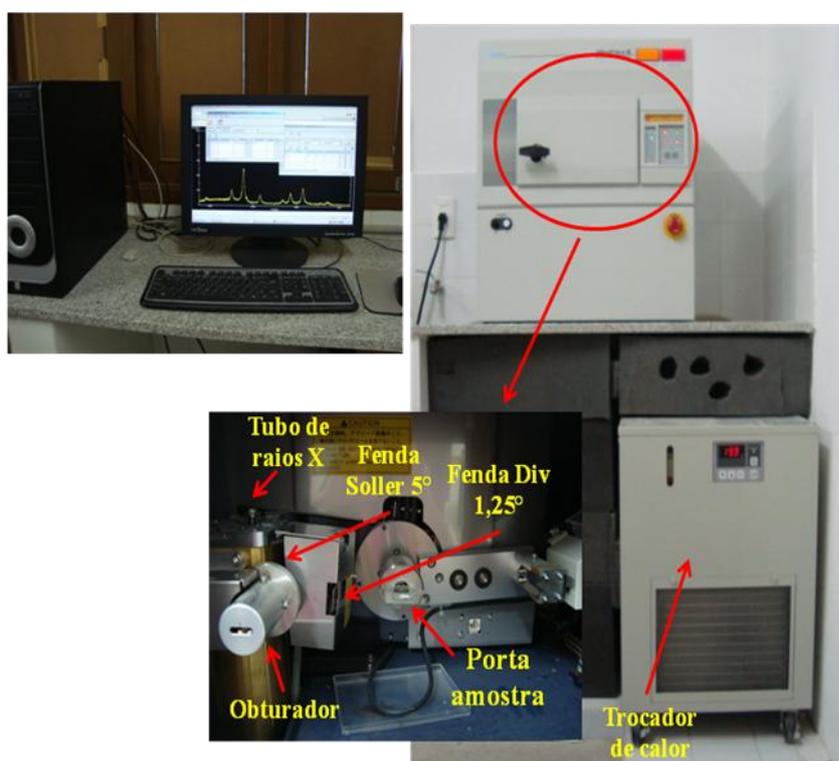


Figura 3.10: Difratometro de Raios-X

3.6.2 Refinamento Rietveld

O refinamento Rietveld tem como característica principal ajustar um difratograma para assim extrair informações da estrutura cristalina como parâmetro de rede, composição massica, stress, composição estequiométrica, tamanho médio dos cristalitos, etc.

O refinamento foi feito através do software MAUD (Material Analysis Using Diffraction) de distribuição gratuita, criado por Luca Lutterotti, nesse programa acrescentamos os arquivos experimentais a serem ajustados como também a carta cristalográfica apropriada, na Figura 3.11 podemos ver uma imagem da janela do software.

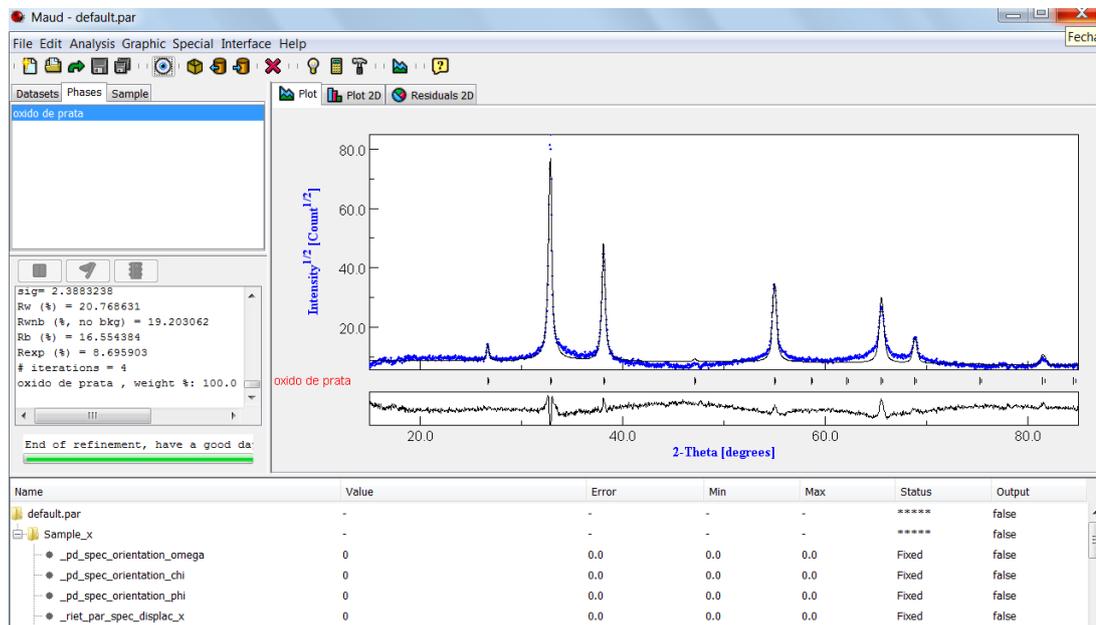


Figura 3.11: Imagem mostrando o Refinamento feito no MAUD.

3.6.3 Espectroscopia Mössbauer

A espectroscopia Mössbauer do Fe^{57} é uma técnica nuclear, elemento específico, que utiliza radiação γ de 14.4 keV para estudar os materiais. A técnica envolve a absorção ressonante e a emissão de radiação gama pelos núcleos de Fe^{57} presente na amostra, esta técnica de caracterização é uma poderosa ferramenta para estudar de maneira local características estruturais, químicas e magnéticas dos materiais.

O processo ressonante consiste na emissão de radiação γ por um núcleo excitado (na fonte radioativa) e na absorção dessa radiação por outro núcleo idêntico (na mostra), sem perda de energia pelo recuo dos núcleos. Ambos os núcleos estão incorporados em uma matriz sólida. A fonte radioativa (o emissor) é colocada em movimento harmônico longitudinal para que a radiação gama emitida tenha intervalo de energia capaz de interagir com estados nucleares apresentando interações elétricas e/ou magnéticas na amostra. A modulação da energia é possível através do efeito Doppler relativístico [58].

Num arranjo experimental Mössbauer a fonte radioativa, amostra e detector estão alinhados nessa ordem. Quando esse fóton atinge a amostra, pode ser absorvido e reemitido não necessariamente na direção do detector, quando não é absorvido o fóton atravessa a mostra e atinge o detector. Assim quando há absorção ressonante, para uma determinada velocidade da fonte, a taxa de contagem dos fótons lida pelo detector é sensivelmente menor que a do observado quando a amostra não absorve os fótons. Assim um espectro Mössbauer consiste em uma coleção de dados de contagem versus velocidade. Uma fotografia do espectrômetro pode ser visualizado na Figura 3.12.

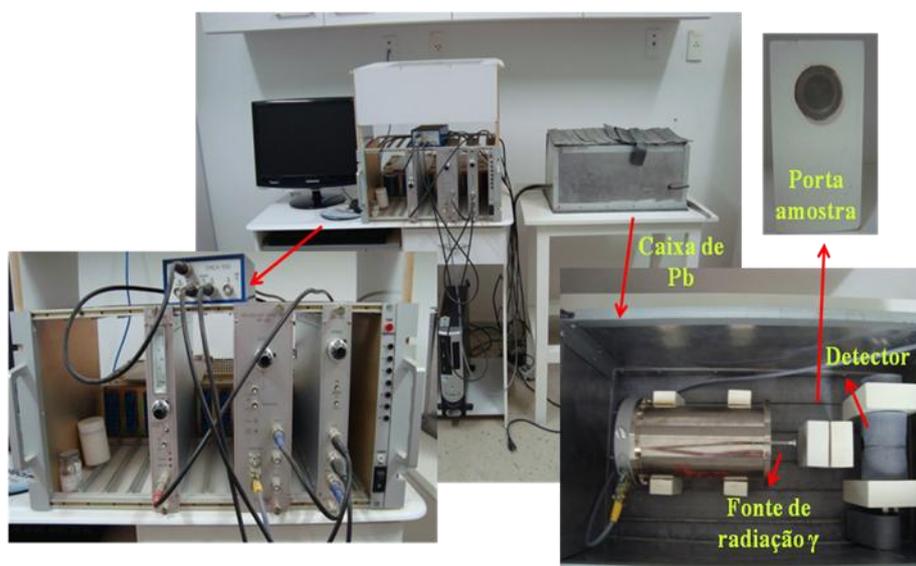


Figura 3.12: Espectrômetro Mössbauer, montado no Laboratório de Análises Magnéticas e Ópticas, na UERN.

Três parâmetros podem extraídos dessa técnica: deslocamento isomérico, desdobramento quadrupolar e campo magnético hiperfino. O primeiro origina-se da interação eletrostática entre a carga distribuída no núcleo com os elétrons do subnível s , cuja a probabilidade é finita na região nuclear, a magnitude desse deslocamento depende da densidade total de elétrons s no núcleo absorvedor [60]. O segundo é uma medida do desvio da simetria cúbica, das cargas elétricas externas ao núcleo (íons da rede cristalina e elétrons) e resulta da interação do momento quadrupolar nuclear com o gradiente do campo elétrico na região do núcleo. O terceiro está relacionado com a interação entre o momento magnético nuclear e o campo magnético hiperfino e campo magnético aplicado, conhecido como interação Zeeman nuclear.

A espectroscopia Mössbauer mais comum está relacionada ao isótopo ^{57}Fe , Tendo como fonte radiativa o isótopo de ^{57}Co . O espectro de uma amostra contendo ^{57}Fe pode apresentar uma única linha de ressonância (singleto), duas linhas (dubleto) e seis linhas (sexteto). Espectros tipo singleto ocorre em materiais não magnéticos ou paramagnéticos que possuem campo hiperfino e gradiente de campo elétrico nulos, não há quebra de degenerescência dos níveis nucleares mas somente um deslocamento devido aos efeitos do deslocamento isomérico e Doppler de segunda ordem. Para o dubleto o campo magnético hiperfino é nulo e o gradiente de campo elétrico é diferente zero. No espectro tipo sexteto, o gradiente de campo elétrico e o campo hiperfino diferente de zero. As linhas espectrais correspondentes aos três estados apresentados acima podem ser visualizados na Figura 3.13.

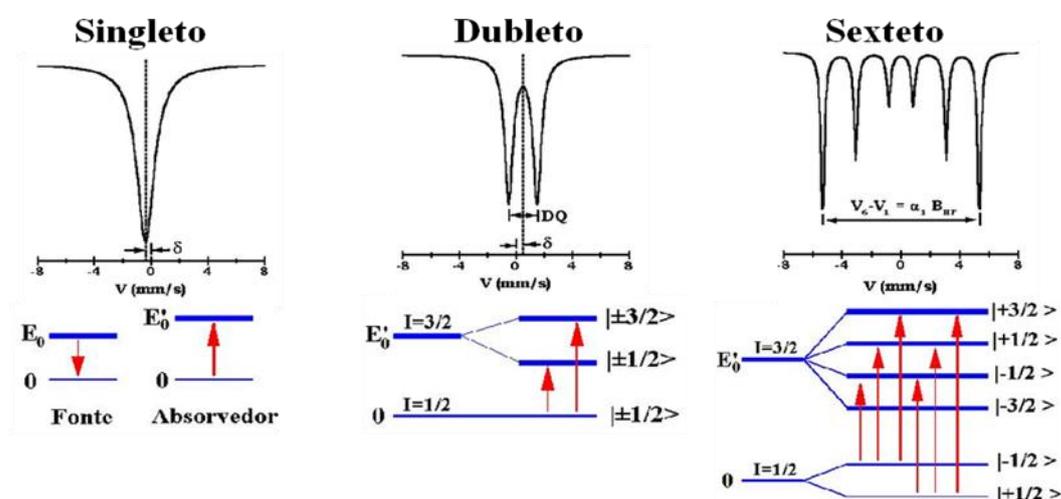


Figura 3.13: Linhas espectrais do singleto, dubleto e sexteto, respectivamente.

3.6.4 Medidas de Magnetização

As medidas de magnetização foram feitas utilizando as técnicas de VSM (Vibrating Sample Magnetometer) nos Laboratórios de Magnetismo do Departamento de Física da UFRN e no Instituto de Física da Unicamp, adicionalmente foram feitas medidas de magnetização à baixa temperatura no magnetometro SQUID.

Magnetometria no SQUID (Superconducting Quantum Interference Device)

Esse tipo de magnetometro que usa o SQUID como elemento detector, podem fazer medidas com alta precisão, sendo capaz de detectar pequenas variações do fluxo magnético da ordem da 10^{-9} emu [12].

Os SQUIDs tem seu princípio de funcionamento baseado no efeito Josephson e na quantização do fluxo magnético em um circuito supercondutor fechado [61]. O efeito Josephson é o que se manifesta pela aparição de uma corrente elétrica crítica I_c , que flui através de dois supercondutores fracamente interligados separados por uma barreira isolante muito fina, que tem por nome Junção de Josephson.

No estado supercondutor a resistência do circuito é nula, dessa forma mesmo após a polarização através de uma corrente elétrica, a tensão nos terminais é nula. Para um valor de corrente maior que I_c , a junção passa para um estado normal e um nível de tensão não nulo passa a ser detectado. Num SQUID a corrente crítica I_c é função do fluxo magnético aplicado, apresentando periodicidade equivalente ao quantum de fluxo $h/2e$, sendo h a constante de Planck e e a carga do elétron. A medida de I_c permite determinar a variação do fluxo que atravessa o dispositivo com alta precisão. Portanto devido a tais efeitos o SQUID pode ser conhecido como transdutor magnético realizando a transformação do campo magnético (medido) em tensão.

Os SQUIDs podem ser dois tipos, RC (um anel supercondutor interrompido por uma Junção de Josephson) e DC (anel supercondutor interrompido por duas Junções de Josephson), e estes se diferenciam no modo de detecção. O primeiro tipo usa correntes do tipo CA com radio frequências, o segundo utiliza apenas correntes CC [59]. Na Figura 3.14 podemos ver uma ilustração de um anel supercondutor com duas junções de Josephson.

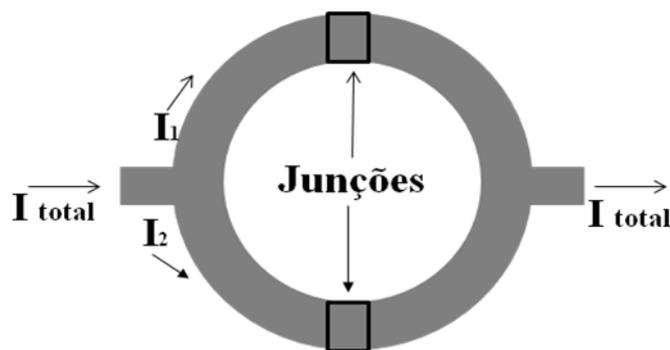


Figura 3.14: Anel supercondutor com duas junções de Josephson.

As medidas de magnetização no SQUID foram realizadas no Instituto de Física da Unicamp coordenado pelo Prof. Dr. C. Leite.

Magnetometria de Amostra Vibrante

O Magnetômetro de Amostra Vibrante (MAV) é um dos magnetômetros mais usados nos laboratórios de pesquisa, por apresentar bom desempenho, ser de baixo custo e ter funcionamento relativamente simples, sua sensibilidade de detecção é de 10^{-5} emu.

Podemos ver o diagrama na Figura 3.15 do MAV. Quando a amostra vibra a uma frequência f , uma voltagem alternada, dada pela expressão 3.2 [61], é induzida nas bobinas de detecção, onde σ, G, A são o momento magnético da amostra, a função das geometrias das bobinas de detecção e a amplitude de vibração, respectivamente.

$$E = \sigma GA 2\pi f \cos(2\pi ft) \quad 3.2$$

A amostra é fixada na extremidade de uma haste rígida e o campo pode ser aplicado transversal ou longitudinalmente à direção de vibração, a outra extremidade da haste é fixada a algum dispositivo que possa ocasionar vibração, como um alto falante por exemplo.

Existem muitos arranjos diferentes para as bobinas de detecção, esse arranjo deve ser tal que maximize o sinal induzido e que seja pouco sensível a posição da amostra, essas bobinas também podem ser resfriadas melhorando a relação sinal/ruído.

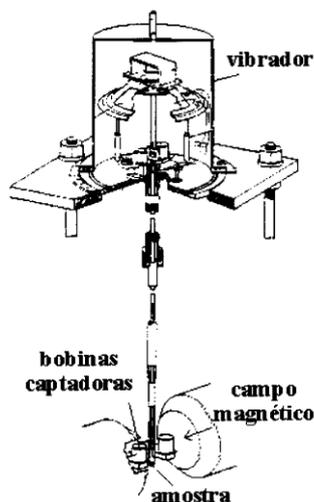


Figura 3.15: Diagrama do Magnetômetro de Amostra vibrante [61]

As medidas de magnetização no MAV foram realizadas no Laboratório de Magnetismo do Departamento de Física Teórica e Experimental da UFRN.

3.6.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A MET é uma poderosa técnica para obtenção de imagens a níveis atômicos, podendo proporcionar uma observação direta das estruturas. Ela também gera padrões de difração que contém informações da estrutura cristalina, como a repetibilidade das distâncias na rede e sua forma [62].

Esse tipo de microscopia embora seja uma técnica poderosa apresenta algumas limitações tais como: alto custo por uma imagem de alta resolução e é possível ver apenas uma parte muito pequena da amostra, as imagens são em duas dimensões o que pode gerar erros de interpretação dos dados, danos a amostra causada pelo feixe de elétrons e dificuldades no preparo da amostra a ser analisada [62].

Para obter as imagens um feixe de elétrons é produzido e acelerado no canhão eletrônico, em seguida o feixe passa por duas lentes magnéticas, ajustadas para iluminar a amostra com um feixe de elétrons, nesse trecho existe uma abertura que controla a coerência, intensidade e paralelismo do feixe. Esse conjunto é o sistema de iluminação.

Após passar pelo sistema de iluminação, um conjunto de lentes magnéticas capturam o feixe espalhado que atravessou a amostra de tecido ultrafina (na espessura de nanômetros), e trabalha-o para produzir uma imagem nítida e ampliada sob uma tela fosforescente. As imagens produzidas tem aumento útil de até um milhão de vezes. A Figura 3.16 mostra um esquema que representa o funcionamento de um MET.

As medidas de MET foram realizadas no Instituto de Química da Unicamp, coordenado pelo Pr. Dr. Fernando Galembeck com um microscópio Carl Zeiss CEM-902.

A amostra examinada foi calcinada na temperatura de 300°C por um intervalo de tempo de 2 horas e em presença de ar.

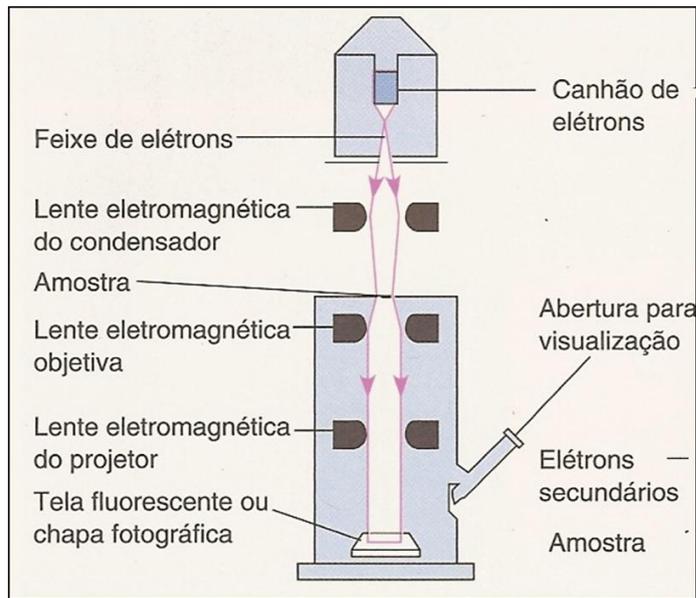


Figura 3.16: Ilustração do funcionamento de um MET.

3.6.6 Absorção atômica

A espectroscopia de absorção atômica é uma técnica usada para determinar a concentração de um determinado metal em uma solução qualquer, usando como princípio a absorção da radiação por parte dos elétrons [61]. Nesse processo os átomos que estão no estado fundamental são capazes de absorver energia luminosa de um comprimento de onda específico, alcançando um estado excitado, logo após a energia é devolvida para o meio e o elemento volta ao seu estado fundamental. Ao se aumentar o número de átomos presentes no caminho ótico é possível aumentar a quantidade de radiação absorvida. Medindo-se a variação da quantidade de luz transmitida é possível fazer a determinação quantitativa do analito presente.

Como os átomos absorvem luz de comprimento de onda muito específico, para esse tipo de análise é necessário a utilização de fontes que produzam um espectro de emissão composto por linhas estreitas, dessa forma a absorção atômica se torna muito específica e praticamente livre de interferências. A técnica tem sensibilidade para detectar concentrações da ordem de $1:10^6$ (ppm).

3.6.7 Espectrofotometria

Espectrofotometria na região do ultravioleta visível (UV-VIS) é uma técnicas mais usadas para determinação analítica em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos [62].

O método empregado para determinar de modo quantitativo a concentração de substâncias que absorvem radiação é usando a Lei de Berr-Lambert [62], dada pela expressão 3.3, onde A é a absorbância média, I_0 é a intensidade da luz incidente a uma dado comprimento de onda, I é a intensidade transmitida pela amostra, L é o caminho óptico pela amostra (distância que a luz percorre por ela), ϵ é a uma constante conhecida como absortividade molar (a qual varia de substância para substância) e c é a concentração da substância em g/mol.

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot L \quad 3.3$$

Espectrofotômetros são instrumentos utilizados nessas técnicas, são capazes de registrar dados de absorbância ou transmitância em função do comprimento de onda. Este registro é chamado de espectro de absorção ou de espectro de transmissão, segundo o dado registrado for de absorbância ou transmitância, respectivamente. O espectro de absorção é característico para cada espécie química, sendo possível a identificação de uma espécie química por seu “espectro de absorção”.

As análises de UV-VIS foram realizadas com espectrofotômetro PowerWave XS2 da Biotek.

CAPITULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1:Primeira Etapa: Quitosana Magnética

4.1.1: Analise Estrutural

Preparamos quitosana magnética através do método descrito no capítulo anterior. Obtivemos quitosana com nanopartículas de magnetita incorporada em sua estrutura, tornando-a magnética, formamos a magnetita sem a calcinação da quitosana e de diferentes tamanhos variando a concentração de glutardialdeído, tempo de gelificação e o acréscimo do surfactante. Podemos ver na Figura 4.1-A e B os difratogramas de raios-X das amostras, e na Tabela 4.1-A e B temos os dados que foram obtidos através do refinamento Rietveld.

Tabela 4.1: Resultados obtidos através do refinamento Rietveld para amostras sem Tween (A) e com Tween (B)

Amostra	Conc. Glutardialdeído	Tamanho (nm)	Parâmetro de Rede (Å)	Sig
UF6	0%	3,8	8,34	0,88
M1	1%	6,6	8,34	1,15
M2	3%	9,1	8,36	0,92
M3	4%	10,3	8,37	1,07
M4	5%	10,7	8,37	0,99
UF12	10%	6,0	8,36	0,87
UF13	20%	5,7	8,36	0,88

A

Amostra	Conc. Glutardialdeído	Tamanho (nm)	Parâmetro de Rede (Å)	Sig
UF11	20%	13,1	8,39	0,92
UF16	10%	9,47	8,37	0,86
UF17	5%	8,35	8,35	0,96

B

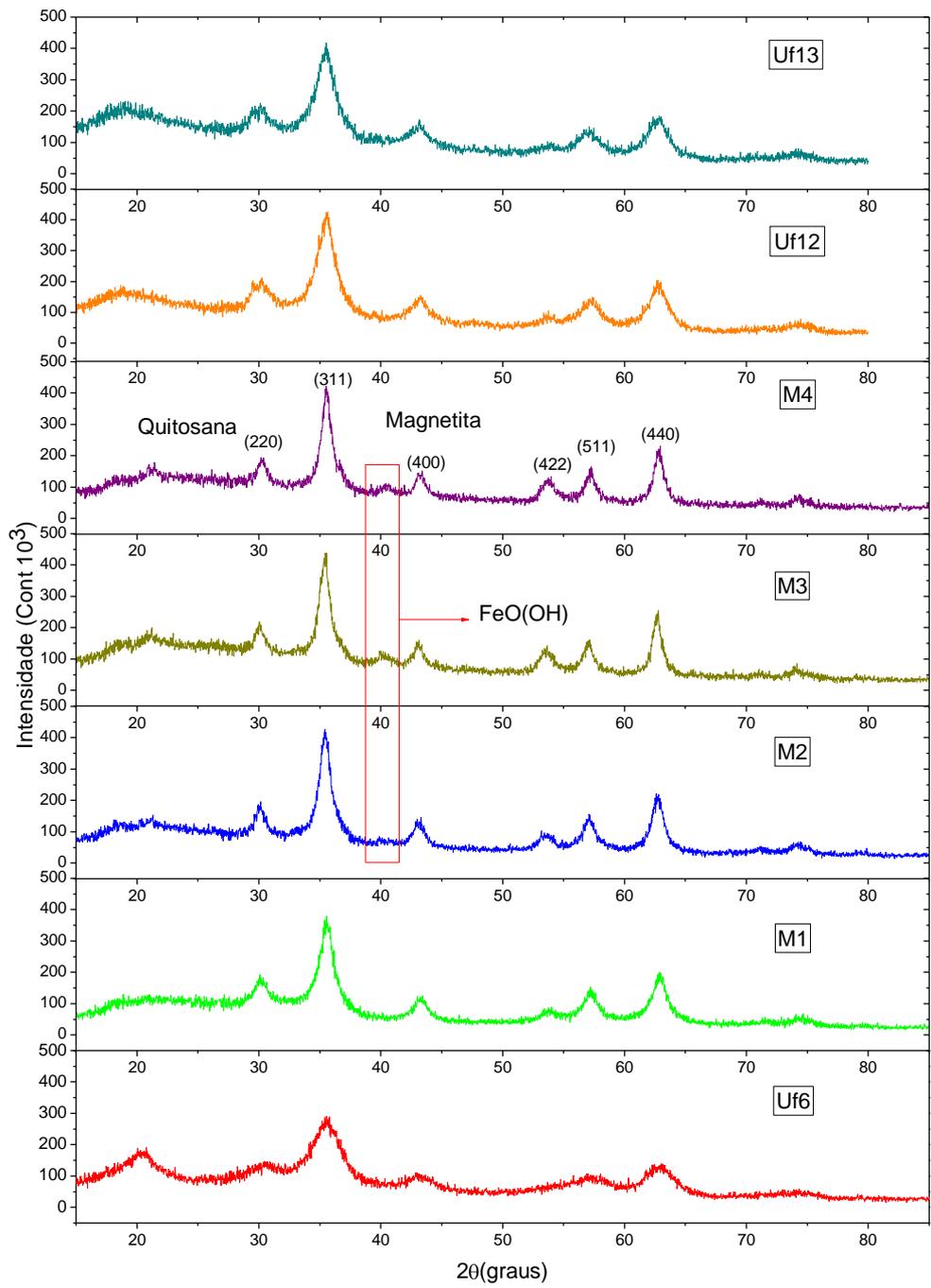


Figura 4.1: Difração de raios-X das amostras sem acréscimo de Tween 80, variando a concentração de glutardialdeído.

Como podemos perceber nas amostras sem o surfactante, Figura 4.1, à medida que a concentração de glutardialdeído aumenta os picos relacionados a magnetita se tornam mais intensos e mais estreitos mostrando partículas com maior tamanho e cristalinidade. De acordo com a Tabela 4.1-A e a Figura 4.3-A o tamanho médio das partículas aumenta, sendo que a amostra M4 que possui apenas 5% de glutardialdeído é a que apresenta picos mais intensos para a magnetita e maior tamanho médio de 10,7nm. A quitosana possui a capacidade de capturar moléculas devido aos grupos amina, grupos de carga positivas, esses grupos ligam as moléculas à cadeia polimérica da quitosana fazendo com que a mesma se torne um molde organizador. A quitosana contendo as sais de ferro é gelificada com o glutardialdeído, a seguir acrescentamos a solução alcalina para precipitar as nanopartículas de magnetita. Podemos perceber na Figura 4.3-A a tendência na diminuição do diâmetro da partícula quando a concentração glutardialdeído é inferior a 5%, e a amostra Uf6, que não possui o agente reticulante, é a que apresenta o menor tamanho médio de 3,86 nm, isso ocorre porque em concentrações tão baixas de glutardialdeído a quitosana não é completamente reticulada, desta maneira os íons metálicos ficam dispersos na estrutura polimérica, formando assim partículas menores, o que indica a necessidade do agente reticulante, de preferência em pequena concentração, para formar partículas com diâmetro maior. Vale resaltar que um pouco acima de 40° observamos um pico que não pertence a estrutura cristalina da magnetita, de acordo com o refinamento Rietveld esse pico pertence ao FeO(OH), entretanto a intensidade desse pico é muito pequena o que indica tanto a que a porcentagem dessas partículas é muito pequena na amostra e também seu diâmetro reduzido esses dois fatores tornam a contribuição do FeO(OH) praticamente nula nas características estruturais e magnéticas.

Já para as amostras onde acrescentamos o surfactante percebemos um comportamento contrario ao descrito no parágrafo anterior, como podemos ver na figura 4.2 e 4.3-B, os picos mais intensos no difratograma da magnetita e o maior diâmetro médio correspondem às amostras que têm maior concentração do reticulante, sendo que na UF11, com 20% de glutardialdeído e 0,148 g de Tween 80, obtivemos partículas com tamanho médio de 13,1 nm.

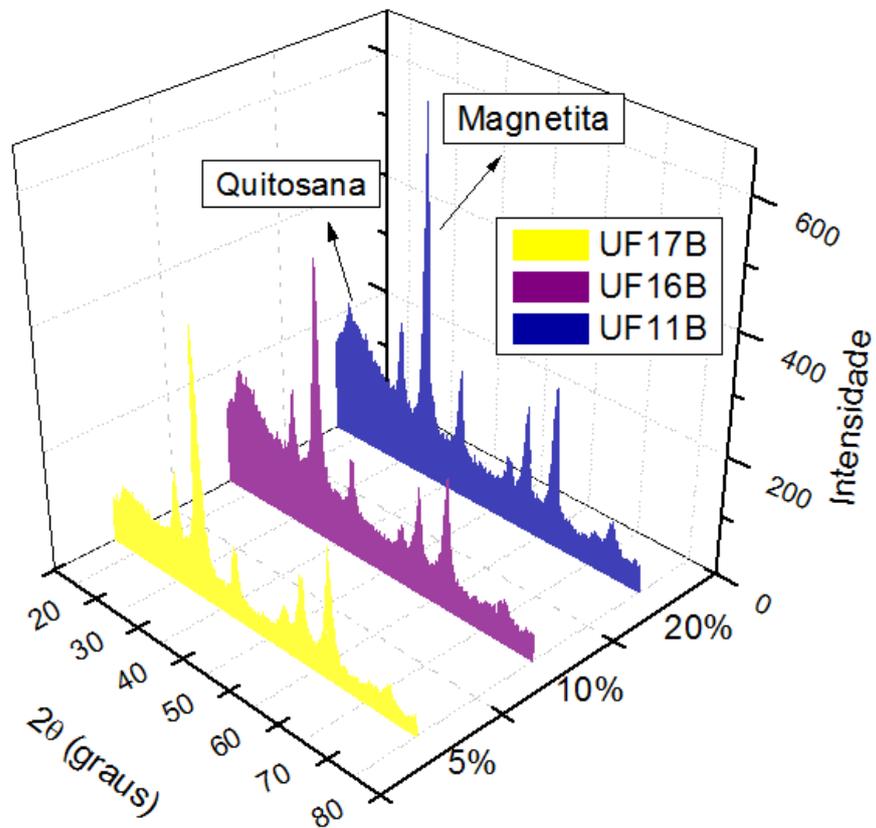
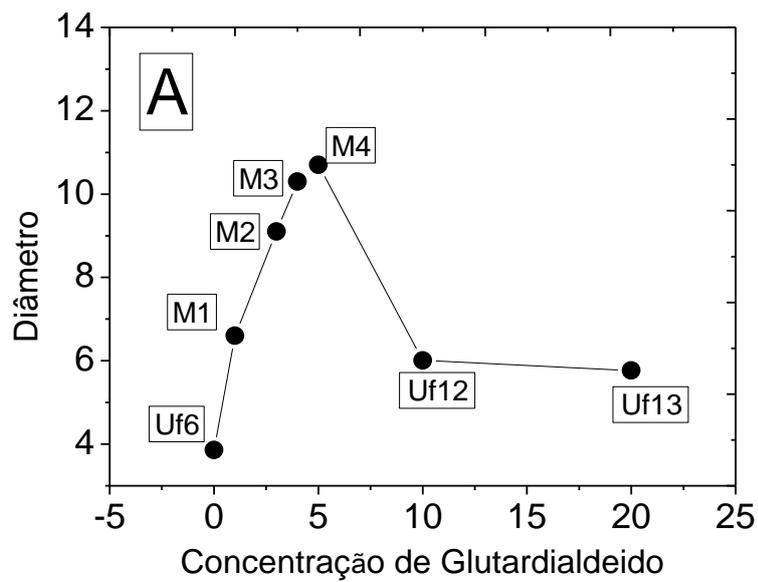


Figura 4.2: Difração de raios-X das amostras com Tween 80.



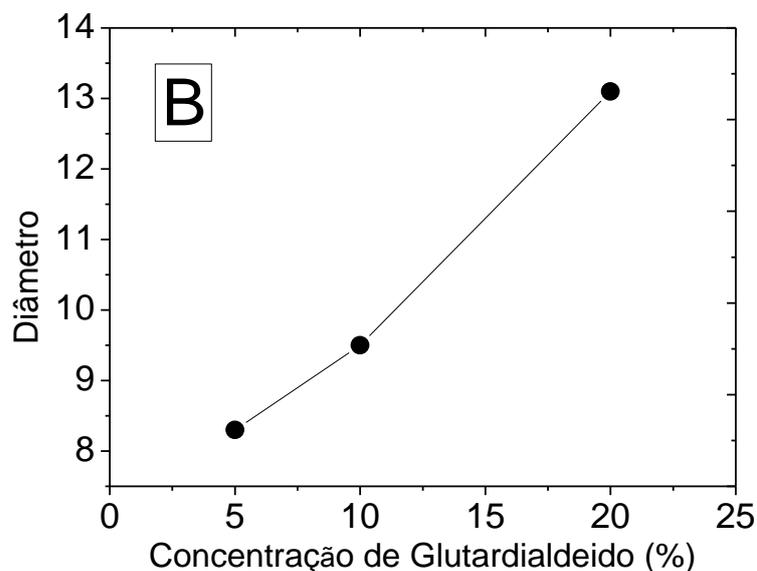


Figura 4.3: Gráficos do diâmetro em função da concentração de glutardialdeído das amostras (A) sem o acréscimo de Tween (B) com acréscimo de Tween.

Kerwin, B [65], em seu estudo mostrou que o Tween 80 sob algumas condições, entre elas em meio ácido ou básico e em presença de metais transição como o Fe, passa por um processo de hidrólise, que resulta em moléculas de ácido oléico livres, essas moléculas são aniônicas e podem se ligar facilmente aos grupos amina da cadeia polimérica da quitosana. Vale resaltar que o HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) é um parâmetro usado na ciência de polímeros e surfactantes e fornece informação do grau de hidrofiliicidade e hidrofobicidade de um material, seus valores variam de 1 a 40, quanto mais próximo o HLB estiver do 1 o material será mais hidrofóbico, os valores de HLB para o ácido oléico e o Tween 80 são de 1 e 15 respectivamente, portanto o ácido oléico é altamente hidrofóbico. As três amostras estudadas foram sintetizadas em períodos de tempo de gelificação diferentes, esse período estava diretamente relacionada a concentração de glutardialdeído. Na Figura 4.3, observamos que o diâmetro das partículas aumenta com aumento da concentração de glutardialdeído e com a diminuição do tempo necessário para gelificação. O fato de diâmetro das partículas aumentar com o acréscimo do Tween80 pode estar relacionado com o processo de hidrólise do Tween, esse processo não é instantâneo [65], portanto, nem todas as moléculas do Tween poderiam estar dissociadas nos períodos de tempo considerados nesse trabalho, como é o caso da amostra Uf11 que levou apenas 1h para gelificar. Dessa forma haveria moléculas de ácido oleico ligados a cadeia do polímero, e também as moléculas de Tween remanescentes, que

possivelmente formariam micelas reversas, pois as caldas hidrofóbicas do Tween ficariam interagindo com a parte hidrofóbica da solução, ou seja as moléculas de quitosana e ácido oléico, e os sais metálicos em solução estariam no interior dessas micelas, como podemos entender melhor se observarmos o diagrama da Figura 4.4. O diâmetro das micelas diminuiria com o aumento do tempo necessário para gelificação, pois a hidrolise teria mais tempo para acontecer e haveria um maior número de moléculas de ácido oléico e uma quantidade menor de Tween para formarem as micelas, portanto estas seriam menores, e após a adição da solução alcalina formaríamos grãos com diâmetro menor, o que esta de acordo com os resultados que obtivemos.

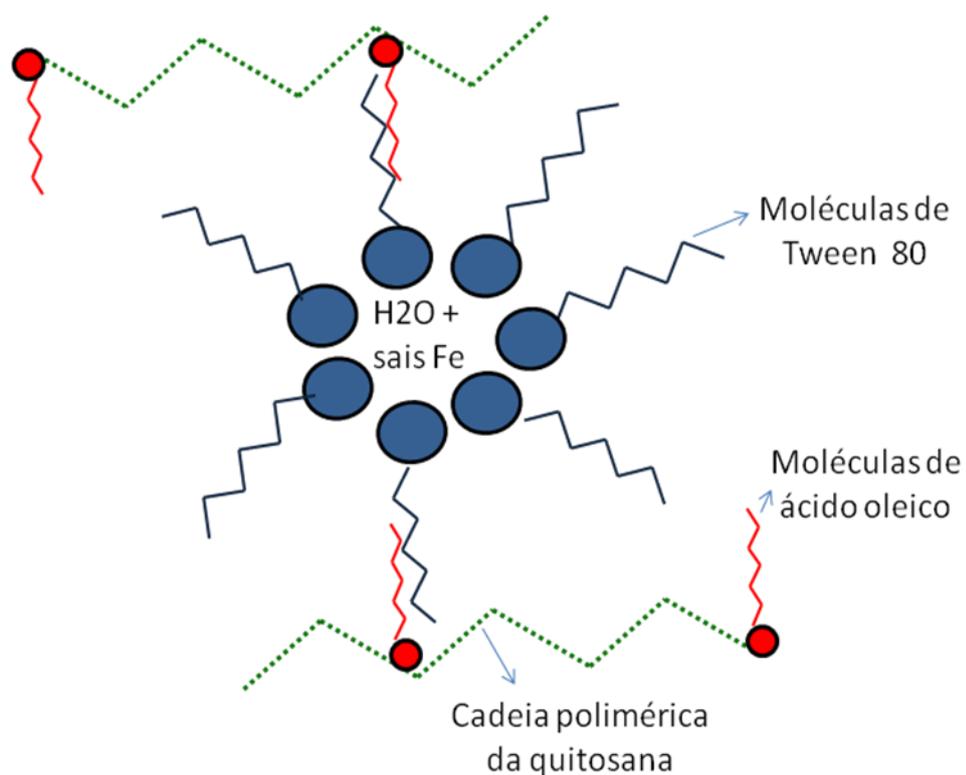


Figura 4.4 : Diagrama representativo da formação de micelas para as amostras com Tween 80.

É possível fazer um cálculo aproximado do número de grupos amina, existentes na cadeia polimérica da quitosana. Supondo que o grau de desacetilação da quitosana é de 100%, a fórmula estrutural da quitosana é $(C_6O_4H_{11}N)_n$ onde n é o número de unidades que se repetem ao longo da cadeia polimérica, temos que massa molar é de aproximadamente 161g/mol, portanto é possível saber o número de moléculas existente numa massa x de

quitosana através de uma regra de três simples, temos que o número de moléculas, N_m , pode ser dado pela expressão 4.1.

$$N_m = \frac{x \cdot N_a}{161} \quad 4.1$$

Onde x é massa da quitosana e N_a é o número de Avogrado. Temos que para 0,2g de quitosana (massa usada para produção das amostras nesse estudo) o valor de $N_m = 7,4 \times 10^{20}$. Para determinar a quantidade de grupos amina presente na estrutura do polímero basta fazer o produto de N_m pelo grau de desacetilação, que em nosso caso era de 85%, assim concluímos que em 0,2g de quitosana haverá $6,29 \times 10^{20}$ de grupos amina.

Thongngam, M. et al [66], em seu trabalho experimental caracterizou as interações entre a quitosana e o surfactante dodecil sulfato sódico (SDS), $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ com massa molar de 288,38g/mol, de acordo com seus resultados a concentração de SDS suficiente para promover a saturação de uma solução de quitosana à 0,1% (1g/Kg) foi de 4mM (0,004mol/litro). Com essa informação podemos verificar o valor obtido usando a equação 4.1. Assim temos que para 1g de quitosana é necessário em média $0,004\text{mol} \times 6,02 \times 10^{23} \text{moléculas}/1\text{mol} = 24 \times 10^{20}$ moléculas de SDS para promover o preenchimento total dos grupos amins, de acordo com autor, portanto para 0,2g são necessárias $4,8 \times 10^{20}$ moléculas do surfactante. Como cada molécula do surfactante se liga a um grupo amina, então haverá $4,8 \times 10^{20}$ grupos amina, essa quantidade é da mesma ordem de grandeza do valor obtido através da formula 4.1.

Para sabermos a concentração de glutardialdeido necessária para preencher todos os grupos amina, devemos considerar que cada molécula deve ligar-se a dois desses grupos para promover a reticulação, temos que a saturação da quitosana é promovida pela metade de N_m , ou seja, $3,14 \times 10^{20}$ moléculas de glutardialdeido, se multiplicamos esse número pela massa molar do glutardialdeido que é 100,12g/mol e dividirmos pelo número de Avogrado encontraremos a massa em gramas que corresponde a essa quantidade de moléculas, que foi de 0,05g, ou 0,21ml de glutardialdeido diluído à 25% em água.

Portanto, em um sistema idealizado onde todos os grupos polares negativos do glutardialdeido se ligariam as cargas positivas dos grupos amina da quitosana seria necessário

adicionar 2,1% de glutardialdeído a solução de quitosana para promover a reticulação completa do polímero. Entretanto, em um sistema real, é possível que nem todos os grupos polares do glutardialdeído se ligariam a cadeias diferentes, poderiam estar ligados à mesma cadeia, poderiam estar ligados à cadeia e a um íon de ferro ou molécula contendo ferro, portanto alguma variação poderia ser observada.

O que podemos concluir com essas análises, é que de acordo com o gráfico da Figura 4.3, o pico da curva corresponde às partículas preparadas com concentrações de glutardialdeído de 4 e 5%, que poderia ser a concentração ideal para promover a total reticulação do polímero. O que explicaria o declínio do diâmetro das amostras com concentrações superiores a 5% uma vez que o glutardialdeído em excesso possivelmente ocuparia os poros da quitosana reticulada juntamente com os sais, diminuindo a quantidade de sais por poro, ou dividindo o volume dos poros em domínios menores. No caso das amostras contendo o Tween 80, o agente reticulante em excesso poderia funcionar como um co-surfactante aumentando o tamanho das micelas e consequentemente o diâmetro das partículas que se formam em seu interior, maiores estudos são necessários para comprovar essas hipóteses.

O parâmetro de rede da magnetita “bulk” está em torno de 8,39 Å [67], entretanto como podemos perceber na Figura 4.5 para a maioria das amostras esse parâmetro está abaixo desse valor, a razão para isso pode estar relacionada a uma série de fatores, que facilitam a oxidação do Fe^2 transformando-o em Fe^3 , dessa forma ao adicionarmos a solução alcalina formamos magnetita não estequiométrica e/ou formamos uma mistura de magnetita e maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Os fatores que ocasionam esse efeito não estão muito bem definidos, mas podemos sugerir que o meio ácido da solução, a quitosana e o tempo necessário para gelificação após o acréscimo do glutardialdeído, esteja entre esses agentes oxidantes. O que podemos destacar é que a amostra Uf11, com menor tempo de repouso, apenas uma hora, é que melhor se aproxima da magnetita “bulk”.

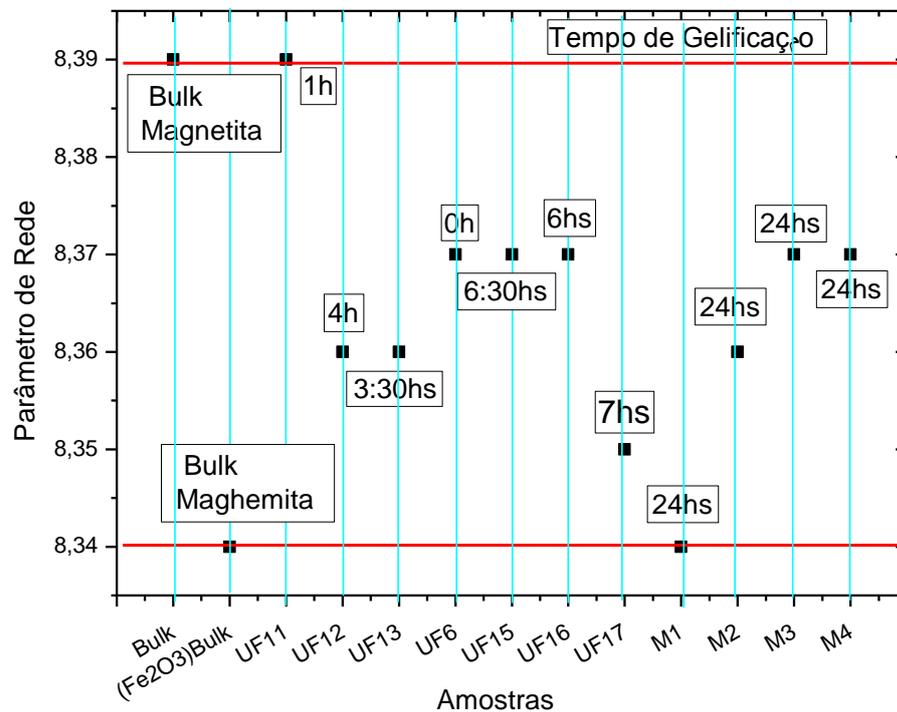


Figura 4.5: Variação do parâmetro de rede das amostras.

4.1.2 Medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram realizadas medidas de MET na amostra M4, as imagens mostram que as partículas formadas tem um forma aproximadamente esférica e de acordo com a distribuição de tamanho representada no histograma da Figura 4.6B o número maior de partículas está em torno de 11nm, o que está de acordo com as análises da difração de raio X, que forneceu um diâmetro médio de 10,7 nm. De acordo com o histograma um número muito reduzido de partículas apresenta um diâmetro superior a 15nm, o que indica que o método empregado para síntese é eficaz para produzir partículas com uma distribuição de tamanho estreita. O círculo, em vermelho, resalta algumas partículas com forma não esférica, assemelhando-se a agulhas.

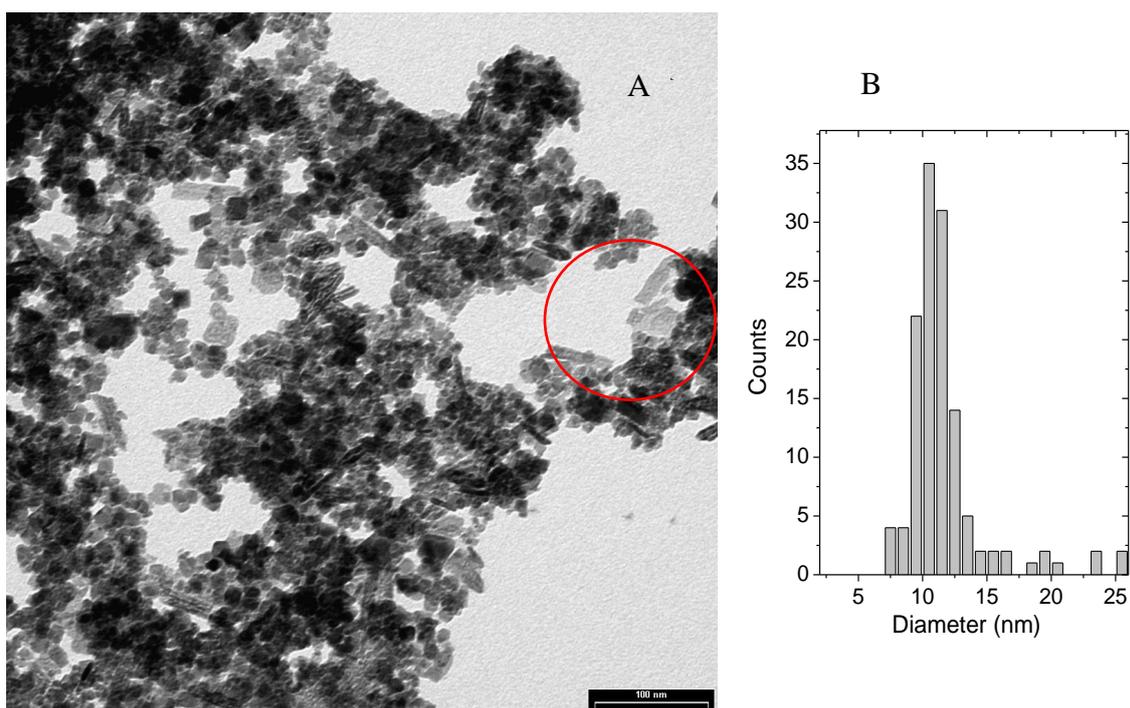


Figura 4.6: Medidas de MET da amostra M4, a escala corresponde a 100nm. As partículas no círculo são formas não esferas semelhantes a agulhas (A), histograma da distribuição de tamanho(B).

4.1.3 Medidas de Magnetização

As medidas de magnetização à temperatura ambiente, feitas no VSM, podem ser vistas na Figura 4.7 para as amostras sem o Tween e na Figura 4.8 para as amostras com o Tween. Na tabela 4.2 e 4.3 encontramos os valores da magnetização, M , obtida para um campo de 2T e a razão E_a/E_T (Energia de anisotropia/Energia térmica) de cada material.

Tabela 4.2: Magnetização das amostras sem o Tween 80.

Amostra	Uf6	M1	M2	M4	Uf13
M (emu/g)	11,95	30,50	17,25	12,54	8,46
E_a/E_T	0,088	0,46	1,23	1,99	0,29

Tabela 4.3: Magnetização das amostras com o Tween 80.

Amostra	Uf17	Uf16	Uf11
M (emu/g)	38,01	16,34	19,28
E_a/E_T	3,62	1,33	0,92

Como podemos observar de acordo com as Figuras 4.7 e a Tabela 4.2, o aumento da magnetização medida para um campo magnético de 2T (20000 Oe) das amostras sem o Tween está diretamente relacionado a diminuição da concentração de glutaraldeído, sendo que para M1, o valor de M é 30,5 emu/g. Isso será explicado mais adiante com as medidas de absorção atômica do Fe. As amostras com Tween obedecem a mesma tendência de acordo com Figura 4.8.

Para uma melhor compreensão das propriedades magnéticas dessas materiais que foram analisados podemos comparar a razão entre as energias de anisotropia ($E_a=K_aV$) e térmica ($E_T=K_B T$), na Tabela 4.2. Essa razão é dada pela expressão 4.2[66]

$$\frac{E_a}{E_T} = \frac{K_a V}{K_B T} \quad 4.2$$

Onde $K_a= 1,3 \times 10^5 \text{ J/m}^3$ [69] é a constante de anisotropia magnética da magnetita, V é o volume da partícula dado por $V = \pi D^3/6$, $K_B=1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

Sabendo que a para as medidas de magnetometria, com um intervalo de tempo característico da medida de 100s, $K_a V = 25 K_B T$, temos que a razão expressa em 4.2, teria que ser maior ou igual a 25 para que as partículas estejam no regime bloqueado, entretanto como vimos essa razão é menor que 25 para todas as amostras o que indica que estas estão no regime superparamagnético, o que esta de acordo com os resultados obtidos da difração de raios-X, pois todas as amostras tem nanopartículas com diâmetro inferior a 25nm, que é o diâmetro critico para o comportamento superparamagnético à temperatura ambiente da magnetita [70].

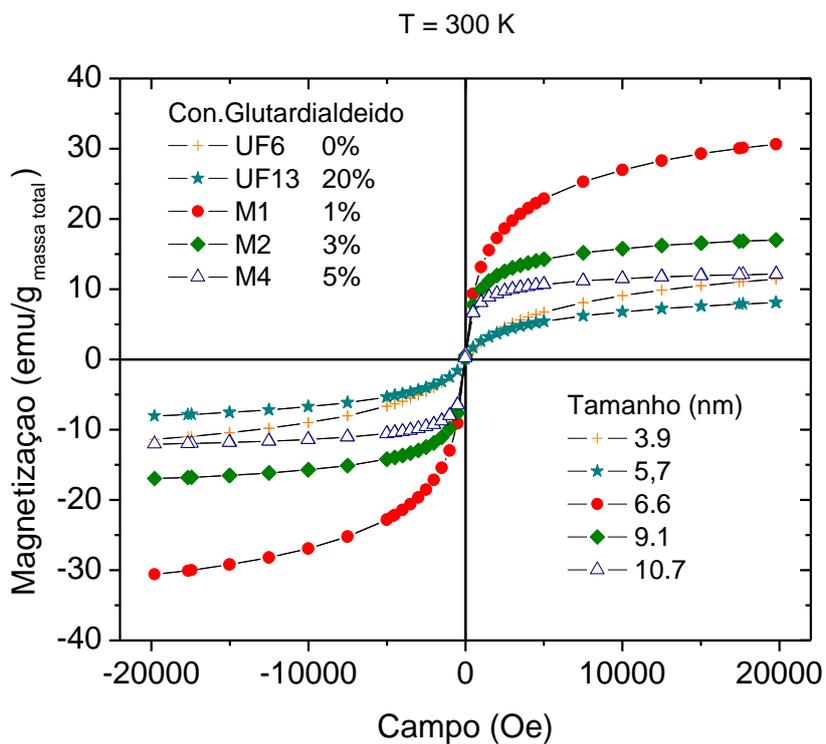


Figura 4.7: Magnetização das amostras sem acréscimo de Tween 80

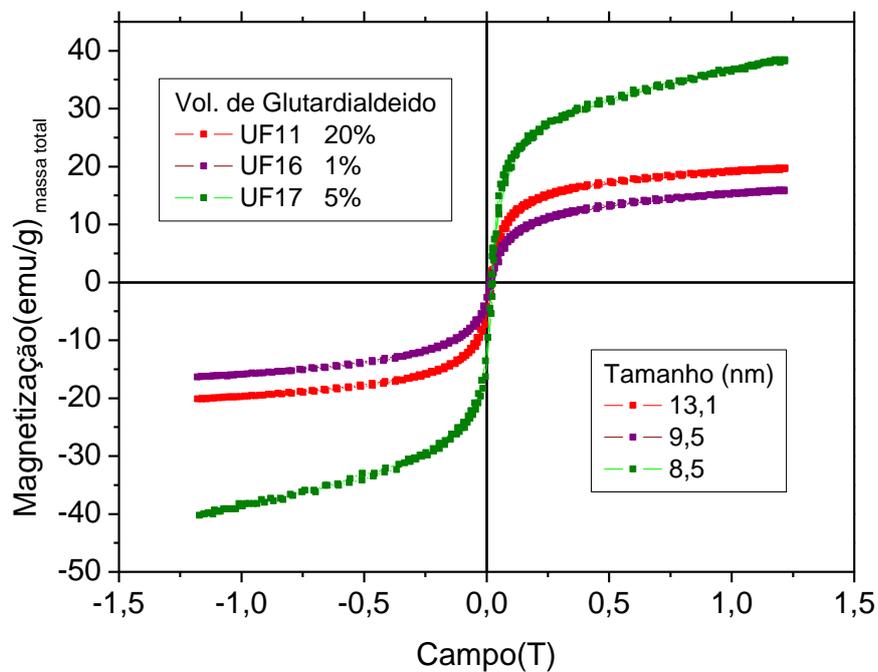


Figura 4.8: Magnetização das amostras com Tween 80

Na Figura 4.9-A e B podemos ver as curvas de magnetização versus campo das amostras Uf13 e M4, que possuem concentração de 20 e 5% de glutardialdeído, no SQUID, feita a uma temperatura de 10K, os dados obtidos a partir dessas histereses para magnetização em 5T, campo coercitivo e a magnetização remanente podem ser visualizadas na Tabela 4.4.

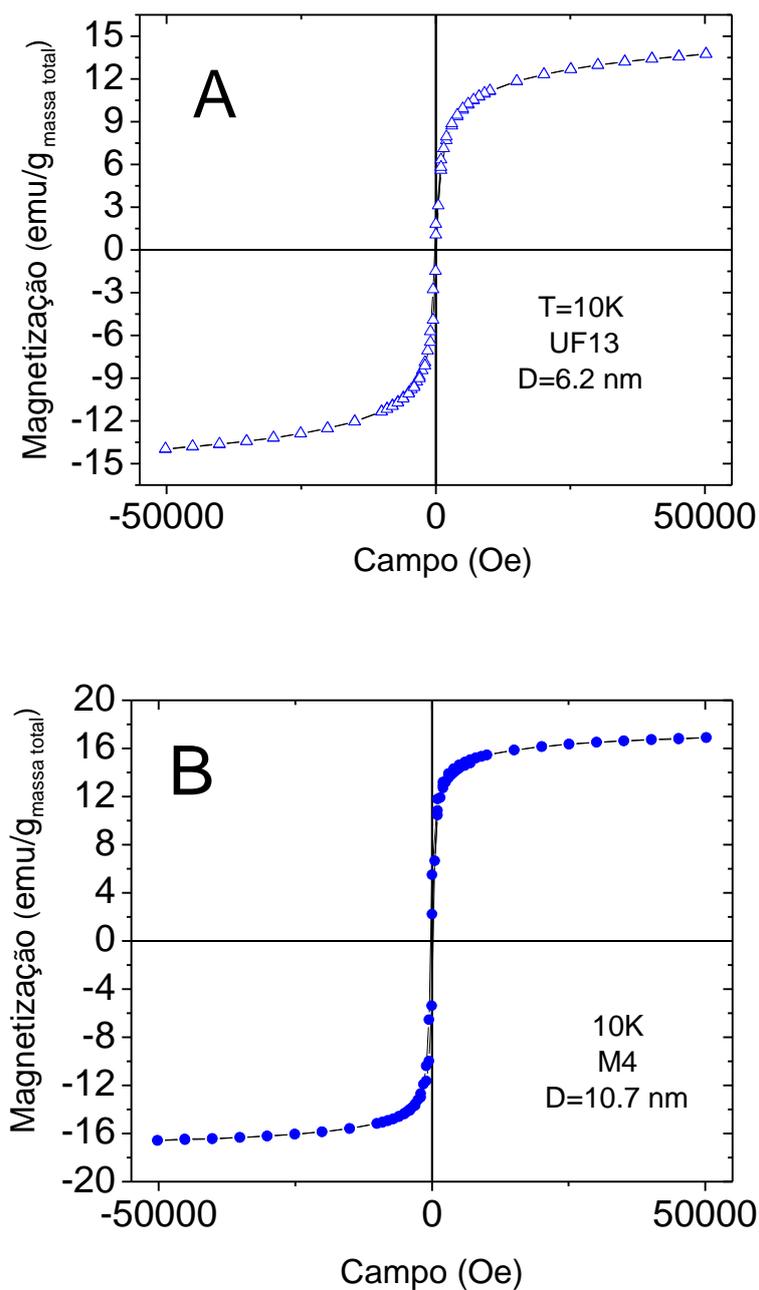


Figura 4.9: Magnetização à 10K da amostra Uf13 (A), e da M4 (B).

Tabela 4.4: Dados obtidos da curva de histerese à 10K, das amostras Uf13 e M4

Amostra	Coercividade (Oe)	Magnetização em 5T (emu/g _{massa total})	Magnetização Remanente (emu/g _{massa total})
Uf 13	180	13,7	1,64
M4	231	16,7	5,5

Como podemos perceber a magnetização por gramas totais de amostra à 5T para a amostra M4, com 5% de glutardialdeído, foi superior a da Uf13, que possui 20%, fato que pode ser justificado pelo aumento da proporção do agente reticulante na amostra Uf13 e também devido aos efeitos de superfície mais intensos em amostras com partículas de diâmetro menor.

A partir das medidas de FC e ZFC da amostra Uf13 e ZFC da amostra M4, Figura 4.10, Obtivemos a temperatura de bloqueio para a ambas, que estava em torno de 50K para Uf13 e 139K para M4, nesse tipo de medida a amostra foi resfriada à campo zero até uma temperatura de 10K depois foi aquecida sob a influencia de um campo magnético externo de pequena intensidade, de 50Oe, até a temperatura ambiente, para medirmos a curva de FC a amostra Uf13 foi resfriada sob a influência do campo até a temperatura 10K e a medida foi realizada durante esse resfriamento. Podemos calcular o valor teórico da temperatura de bloqueio para as duas amostras através da expressão 4.3.

$$T_{mb} = \frac{K_a V}{K_B \ln \frac{\tau}{\tau_0}} \quad 4.3$$

Onde K_a é constante de anisotropia dada por $K_a = 1,3 \times 10^5 \text{ J/m}^3$ [69], V é o volume da partícula dado por $V = 4\pi d^3/6$, sendo d o diâmetro, K_B é a constante de Boltzmann, τ_0 é constante e dado por 10^{-9} s, e τ é o tempo de medida da técnica utilizada. Sendo o tempo de medida da magnetometria da ordem de 100s, e sabendo o diâmetro da amostras Uf13 e M4 de 5,7nm e 11nm, respectivamente, temos que os valores teóricos para as temperaturas de bloqueio da amostra Uf13 e M4 são de 26,8 K e 101 K, respectivamente.

O fato de o valor experimental de T_{mb} ser um pouco maior do que o valor teórico indica que as partículas podem estar interagindo magneticamente. Pelo fato de as nanopartículas estarem embebidas em uma matriz polimérica, um meio não magnético, as partículas devem estar sofrendo interações magnético dipolares.

Podemos perceber que as curvas de ZFC e FC da amostra Uf13 começam a se separar na temperatura de aproximadamente 120K, próxima a temperatura de bloqueio, o que indica que a distribuição de tamanho das partículas é relativamente pequena e que as partículas estão interagindo magneticamente entre elas. Isso pode ser evidenciado na largura do pico da curva de ZFC. Na amostra M4, a largura do pico é maior devido à interação magnética entre as partículas, esse efeito é mais intenso em virtude do momento magnético por partícula ser maior.

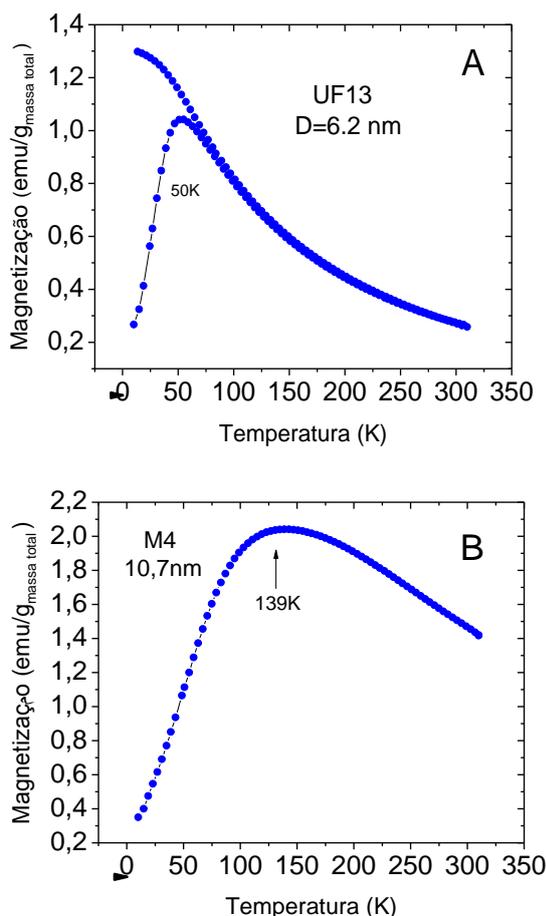


Figura 4.10: Medidas de FC e ZFC da amostra Uf13 (A) e de ZFC da amostra M4 (B).

4.1.4 Medidas de Absorção Atômica

Medidas de absorção atômica do Fe foram realizadas para as amostras M1, M2 e M3, dessa maneira podemos realizar um estudo quantitativo da proporção de magnetita em cada amostra, e assim estudarmos a influência da variação na concentração de glutardialdeído sob a magnetização das amostras.

È possível fazermos uma estimativa da quantidade de magnetita em cada amostra a partir dos dados experimentais, de acordo com o cálculo estequiométrico temos que a massa da magnetita, utilizando 0,4g de sais de Fe, é em torno de 0,084g,

Sabendo que a quantidade de quitosana empregada para a produção das partículas é de aproximadamente 0,2g e tendo a concentração de glutardialdeído com a variável, podemos obter o valor da massa da magnetita esperada, que chamaremos de M_{me} , com a expressão 4.4.

$$M_{me} = \frac{M_a \cdot M_{mt}}{M_t} \quad 4.4$$

Onde M_a é a massa total de amostra usada na absorção atômica, que foi de $0,2 \times 10^{-4}$ g, fator constante para todas as amostra, M_{mt} é a massa da magnetita obtida pelo calculo estequiométrico dada por 0,084g, e M_t é massa total da amostra, sendo que M_t é variável e depende da massa do glutardialdeído em cada amostra, podemos ver seus valores na tabela 4.5 como também os valores de M_{me} , para cada amostra. Na tabela 4.4 também temos os valores reais da quantidade de magnetita fornecidos pela técnica de absorção atômica, para cada amostra, que chamaremos de M_e .

Tabela 4.5: Valores da massa teórica e experimental do Fe para as amostras M1, M2, M3 e M4.

Amostra	Massa de Glutardialdeído (g)	Valores de M_t (g)	Valores de M_{me} (g)	Valores de M_e (g)
M1	0,025	0,309	$0,054 \times 10^{-4}$	$0,15 \times 10^{-4}$
M2	0,075	0,359	$0,046 \times 10^{-4}$	$0,074 \times 10^{-4}$

M3	0.1	0,384	$0,043 \times 10^{-4}$	$0,055 \times 10^{-4}$
M4	0,125	0,409	$0,041 \times 10^{-4}$	$0,060 \times 10^{-4}$

È possível fazer uma comparação entre os valores nominais da massa da magnetita, M_{me} , e os obtidos pela absorção atômica M_e , a diferença observada pode ser explicada pela imprecisão da balança que foi empregada para medir quantidades de massas tão pequenas, mas como podemos perceber a maioria dos valores experimentais são da mesma ordem de grandeza dos valores teóricos.

A partir dos resultados obtidos da absorção atômica é possível determinar a concentração de magnetita detectada por grama de amostra, e fazemos uma normalização das medidas de magnetização com relação a massa total de magnetita, os resultados podem ser vistos na Tabela 4.6. os valores de magnetização reportados na Tabela 4.3 corresponde a magnetização de saturação para um campo de 2T.

Tabela 4.6: Dados da magnetização por gramas totais de amostra e do valor normalizado por gramas de magnetita.

Amostra	Magnetização emu/g _{massa total}	Fe ₃ O ₄ / g de amostra (g)	Magnetização emu/g _{Fe₃O₄}
M1	30,40	0,78	38,9
M2	17,01	0,37	47,2
M4	12,15	0,30	40,5

Na Figura 4.11-A temos as curvas de histerese já normalizadas pela massas total de magnetita. Na Figura 4.11-B em vermelho temos o gráfico da magnetização pela massa total da amostra em função da concentração de glutardialdeido, e em azul a magnetização por grama de magnetita em função da concentração de glutardialdeido. De acordo com dados a magnetização por massa total cai à medida que a concentração de glutardialdeido aumenta,

isso ocorre porque a proporção de magnetita é menor para as amostras com maior teor do agente reticulante.

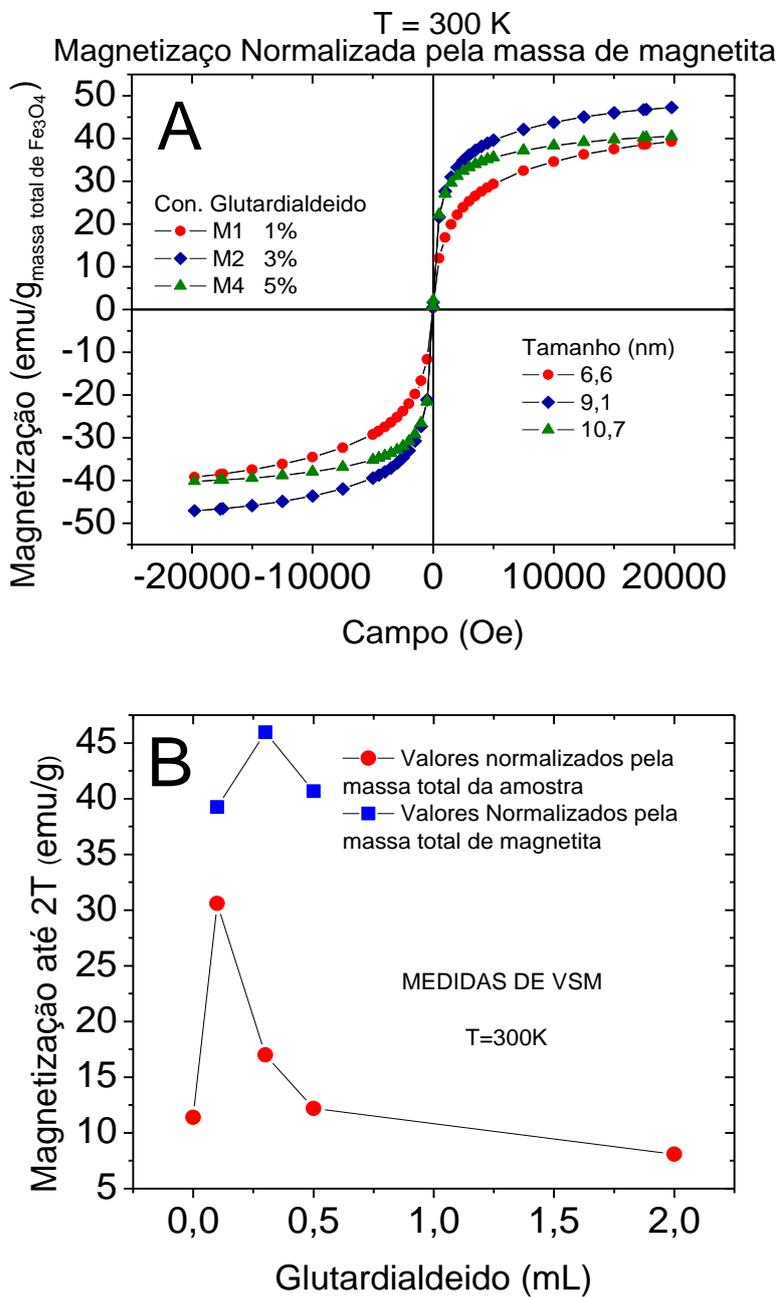


Figura 4.11: Magnetização das amostras M1, M2 e M3 por gramas de magnetita (A). Gráfico da Magnetização por grama totais em função da concentração de glutardialdeido (em vermelho) e da magnetização por grama de magnetita (em azul) (B).

4.1.5 Medidas de Espectroscopia Mössbauer

As medidas de espectroscopia Mössbauer à temperatura ambiente foram realizadas para as amostras M1 e M4, de acordo com o espectro obtido para amostra M1 que possui diâmetro de 6,3 nm, as partículas estão no regime superparamagnético, isso fica claro porque o espectro apresenta apenas uma componente paramagnética, do tipo dubleto, esse dubleto é resultado da interação entre o gradiente de campo elétrico gerado pelos elétrons do próprio átomo e as cargas dos íons da rede cristalina, e o momento quadrupolar nuclear. As componentes magnéticas estão ausentes devido às partículas serem muito pequenas, com tempo de relaxação de seus momentos magnéticos muito pequeno, chegando a ser menor que o tempo de medida da técnica Mössbauer, assim nesse intervalo de tempo o campo magnético resultante no núcleo é aproximadamente nulo. Os pontos na base do espectro (linha de base) têm comportamento linear, para amostra M1, isso é mais uma evidência de que as partículas estão no regime superparamagnético, pois indica que não há outras componentes além do dubleto, já para amostra M4, temos a linha de base não linear, devido ao surgimento de um sexteto, indicando que existem partículas no regime bloqueado, ou seja, a interação magnética Zeeman é diferente de zero para uma fração do número total de partículas. É importante salientar que se a medida fosse realizada em baixa temperatura, o tempo de relaxação dos momentos seria melhor, dessa forma o comportamento magnético seria melhor evidenciado pela técnica.

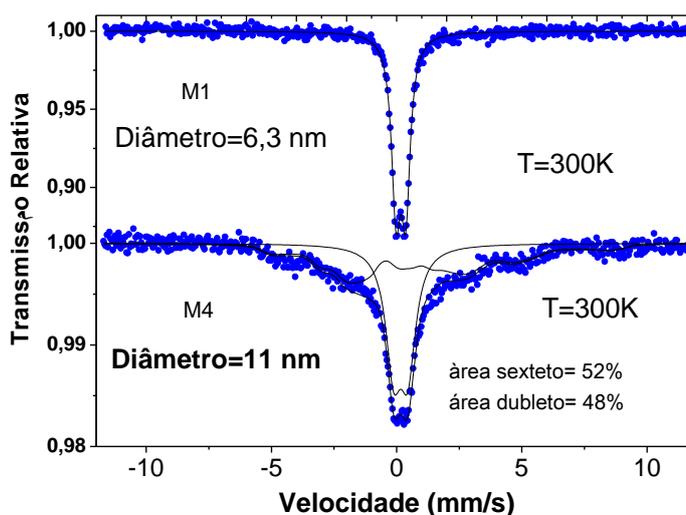


Figura 4.12: Espectroscopia Mössbauer das amostras M1 e M4.

4.2 Segunda Etapa: Ação Antibacteriana de Nanopartículas de Prata e Oxido de Prata Embebidas em Alginato Magnético

4.2.1 Difração de Raios X:

Nanopartículas de oxido e prata, prata metálica e magnetita foram preparadas e caracterizadas com difração de raios X, apresentando nos difratogramas fases únicas e sem impurezas, Figura 4.13.

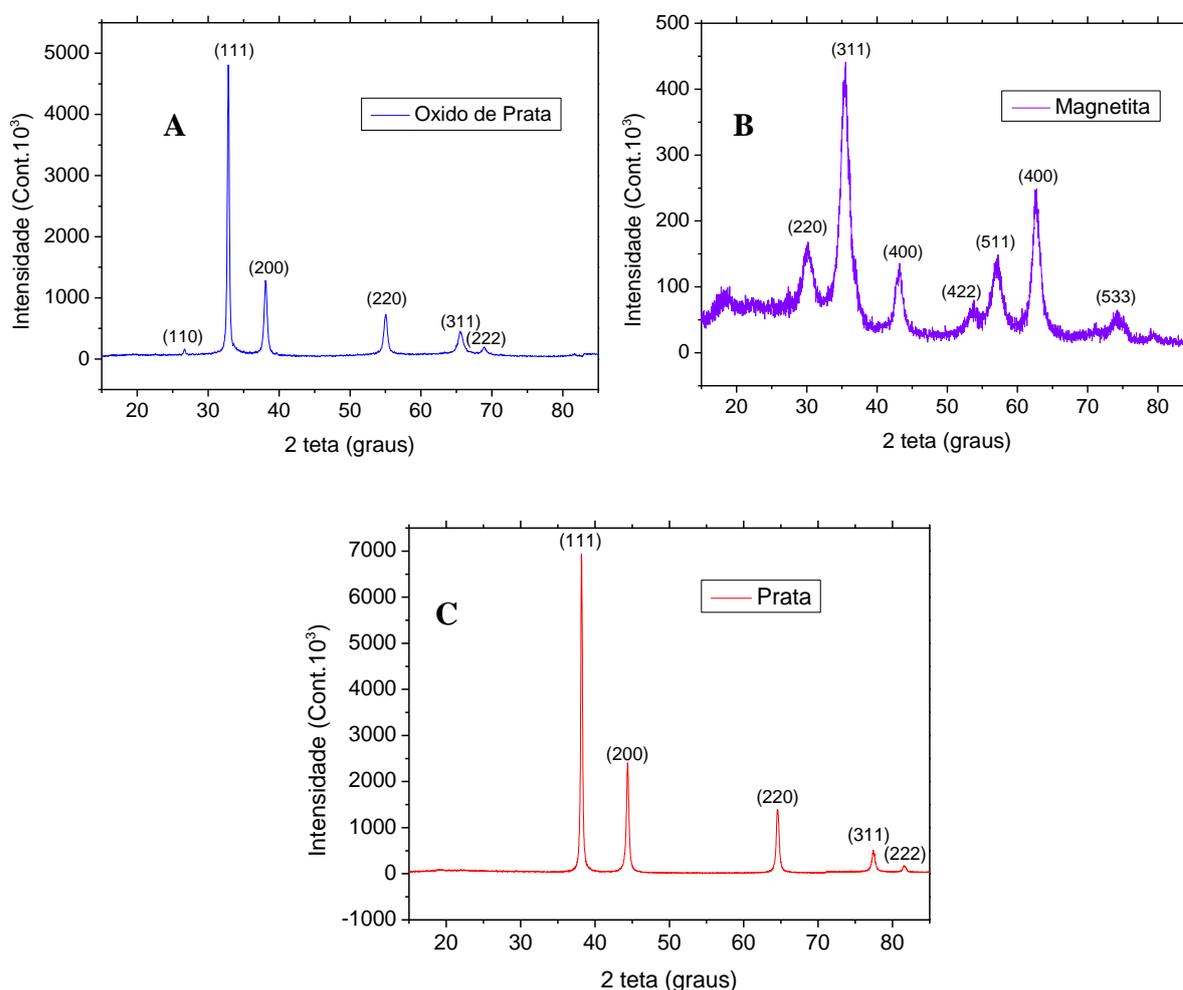


Figura 4.13: Difração de raio-x das amostras de oxido de prata(A), magnetita(B), prata metálica (C).

A partir dos difratogramas fizemos o refinamento Rietveld, com auxílio do programa MAUD (Material Analysis Using Diffraction), os padrões das fases foram anexados a partir das cartas cristalográficas obtidas do ICD (International Crystallographic Data Center).

Podemos ver um exemplo do refinamento no programa MAUD na Figura 4.14 Os índices de Miller referente as famílias dos planos cristalográficos para a magnetita o oxido de prata e a prata metálica podem ser observados através da Figura 4.13.

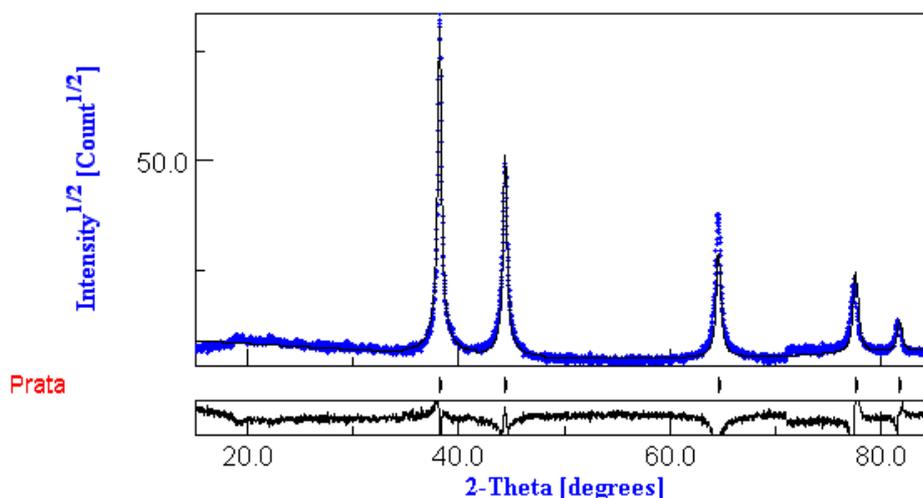


Figura 4.14: Refinamento da amostra prata (método1)

A Tabela 4.7 mostra as características estruturais que foram obtidas a partir dos ajustes dos DRX para as quatro amostras.

Tabela 4.7: Características estruturais das amostras de magnetita, oxido de prata e da prata.

Amostras	Diâmetro	Simetria	Parâmetro de rede	Grupo espacial
Magnetita	10nm	Cúbica	8,36	Fd-3m:1
Óxido de prata	65nm	Cúbica	4,71	Pn-3m:1
Prata	55nm	Cúbica	4,07	Fm-3m

4.2.2 Espectroscopia Mössbauer

Temos que o espectro Mössbauer para a magnetita, Figura 4.15, o refinamento do espectro indicou que a área referente ao sexteto é maior do que a área do dubleto o que nos leva a conclusão de que a maior parte das partículas estão bloqueadas a temperatura ambiente,

a outra parcela encontra-se no regime superparamagnético. A técnica Mössbauer possui um tempo de medição muito curto, da ordem de 10^{-7} s, dessa forma é possível estudar os fenômenos de relaxação magnética das partículas possibilitando saber o estado magnético do material.

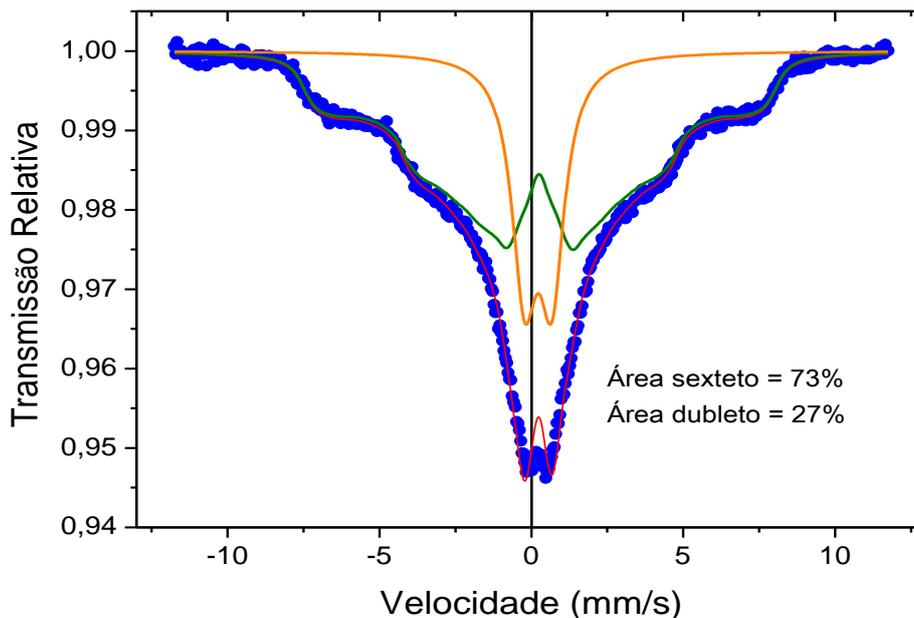


Figura 4.15: Medida de Espectroscopia Mössbauer da magnetita.

4.2.3 Medidas de magnetização

A Figura 4.16, mostra a curva de histerese magnética em 300K da amostra. O campo coercitivo é nulo e a magnetização para o campo de 1,2T é de 49,7 emu/g. Essa curva tem comportamento crescente o que indica que a magnetização para um campo de 1,2T ainda não esta no regime de saturação. O valor da magnetização de saturação da magnetita “bulk” é de 92 emu/g. Na literatura, a magnetização de saturação de nanopartículas magnéticas são menores que os de amostras tipo “bulk”, para explicar essa diminuição na magnetização alguns modelos foram propostos, de acordo com esses estudos a superfície das nanopartículas apresentam características diferentes do interior das partículas é desordenada devido a presença de vacâncias, há perda de periodicidade, há ligações com moléculas pertencentes a

vizinhança ou meio (-OH, surfactantes, etc) e tem anisotropia magnética que pode apresentar valores diferentes para cada sítio. Para materiais macroscópicos esse efeito não é tão pronunciado, entretanto em materiais nanométricos, devido ao aumento da relação área/volume, os momentos magnéticos das camadas superficiais se tornam tão importantes quanto os momentos ordenados do interior da partícula [71,72].

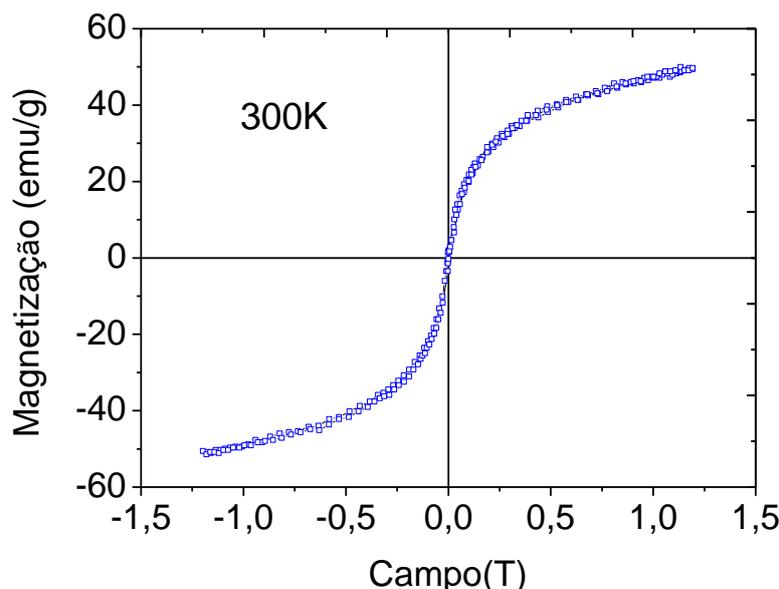


Figura 4.16: Curvas de Histerese das nanopartículas de magnetita.

4.2.3 Poder bactericida da prata metálica e do óxido de prata

Testes da atividade tóxica sobre as bactérias foram realizados com as nanopartículas de Ag e Ag₂O. Após a interação da prata metálica e o óxido de prata com a suspensão contendo as bactérias, pequenos volumes do sobrenadante dessa solução foram semeadas em placas de petri com meio de cultura sólido, após 24hs foi feita a contagem do número de unidades formadoras de colônia. Os resultados apontaram a ineficiência da prata metálica sintetizada nesse trabalho, já o óxido de prata se mostrou muito eficiente eliminando completamente as bactérias gram-negativas e positivas.

A ineficiência da prata metálica pode estar relacionada com o processo de síntese das nanopartículas. A prata é produzida a partir da quitosana, para eliminar o polímero é feita a

calcinação numa temperatura de 400°C, entretanto as partículas ficam ainda com os resíduos provenientes da queima, esses resíduos ficam depositados na superfície do metal e assim impedem a liberação de íons Ag⁺, tornando a amostra inerte para as bactérias.

4.2.4 Esferas Magnéticas de Alginato

Com a eficiência biocida do oxido de prata já confirmada, esferas de alginato foram produzidas, para promover a reticulação do alginato que é formado por uma cadeia de poliânions, utilizamos íons divalentes de cálcio, formando as esferas gelificadas, com magnetita e oxido de prata incorporados em sua estrutura.

As esferas, quando ainda molhadas, possuíam diâmetro de aproximadamente 2,0 mm, como podemos observar na Figura 4.17. Foram realizados testes bactericidas com essas amostras.



Figura 4.17: Esferas magnéticas de alginato.

4.2.5 Teste Biológico com as Esferas Magnéticas de Alginato Contendo Oxido de Prata

Esse teste foi realizado para analisar a capacidade bactericida das esferas de alginato contendo oxido de prata. Para assegurar que a eliminação das bactérias era exclusivamente proveniente da liberação dos íons de prata, realizamos o teste simultaneamente com as esferas magnéticas sem o oxido de prata (EMA), a formulação (EMA+ Ag₂O) e também com um controle positivo (+C, apenas a suspensão contendo as bactérias) e outro negativo contendo

somente as nanopartículas de óxido de prata (Ag_2O). Após 24hs de incubação, pequenos volumes da suspensão foram semeados em placas de Petri contendo o nutriente Agar, as placas ficaram em repouso por 18hs, posteriormente foi feita a contagem do UFC/ml (unidades formadoras de colônias por mililitro) e os resultados podem ser vistos na Tabela 4.8. De acordo com os resultados as esferas que não continham o óxido de prata, EMA, foram completamente ineficientes para eliminar as bactérias, comprovando dessa forma que a fonte de inibição dos microrganismos era proveniente do óxido de prata.

Tabela 4.8: Resultado do teste bactericida (Onde I representa quantidades de UFC incontáveis)

Amostra	E. coli (ufc/ml)	S. aureus (ufc/ml)
EMA	I	I
EMA+ Ag_2O	0	0
Ag_2O	0	0
+C	I	I

4.2.6 Teste Bactericida Cinético

Na figura 4.18 temos as fotografias do teste cinético realizado com as nanopartículas de óxido de prata, que após 30min de interação com o caldo contendo as bactérias, foi capaz de eliminar completamente os microrganismos testados, tanto E. coli como S. aureus.

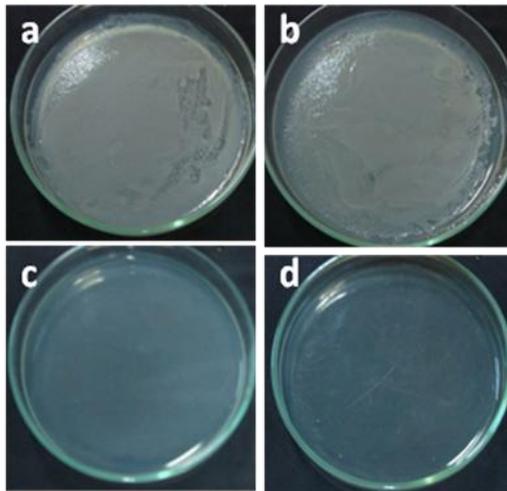


Figura 4.18: Resultado da interação das nanopartículas de oxido de prata com as bactérias *E. coli* durante (a) 0 min, (c) 30 min, e *S. aureus* durante (b) 0h, (d) 30 min.

Para as esferas magnéticas de alginato contendo oxido de prata realizamos um teste cinético de 6hs para observar sua efetividade sobre os organismos testados. Nas Figuras 4.19 e 4.20, são apresentadas as fotografias das placas, observamos que houve uma redução gradual no número de unidades formadoras de colônia para os dois tipos de bactérias.

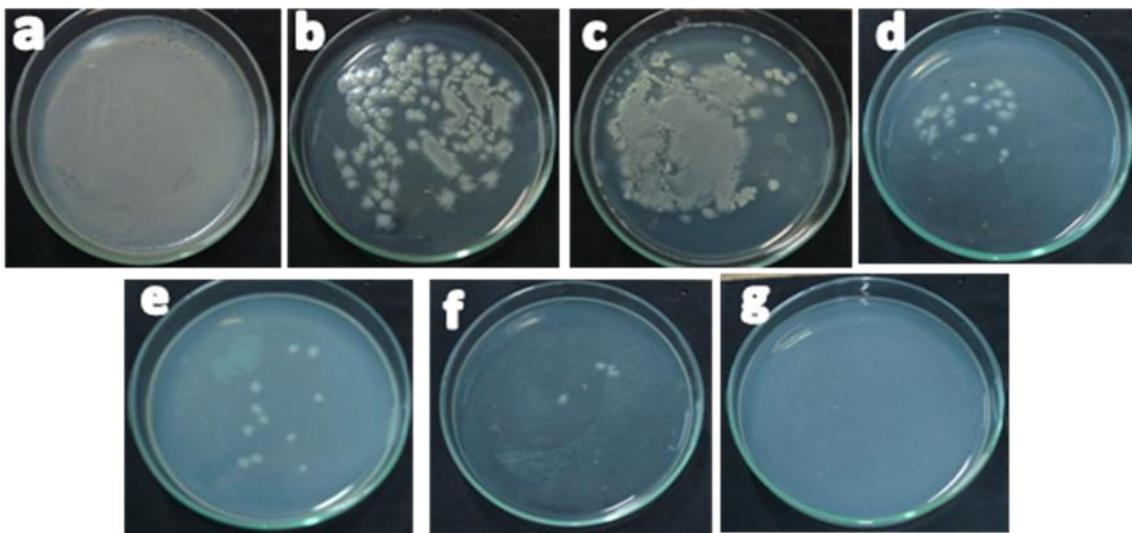


Figura 4.19: Teste cinético da interação da formulação com a bactéria *S. aureus*, (a) 0h, (b) 1h, (c) 2hs, (d) 3hs, (e) 4hs, (f) 5hs, (g) 6hs.

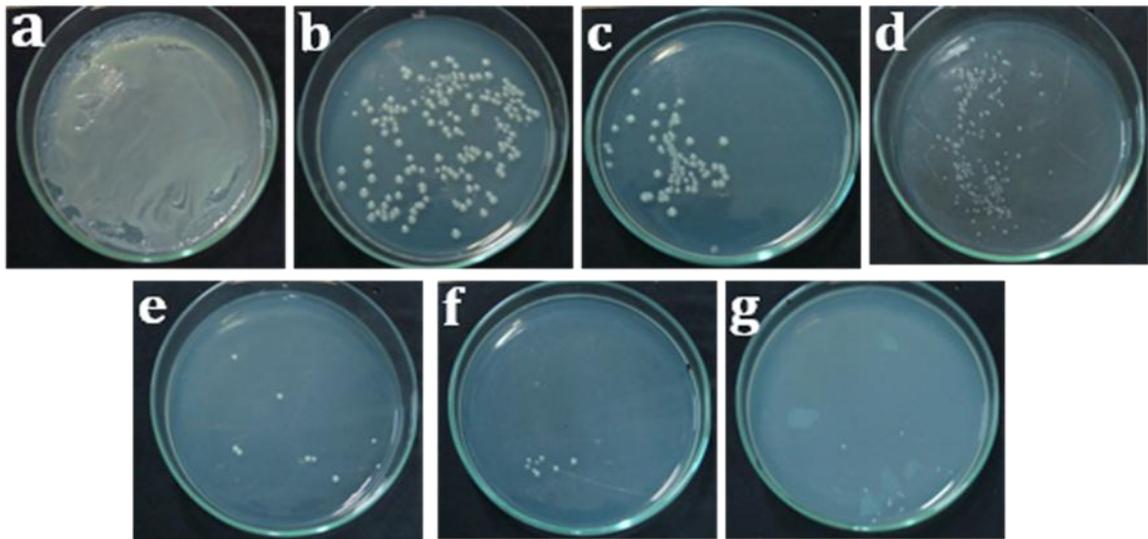
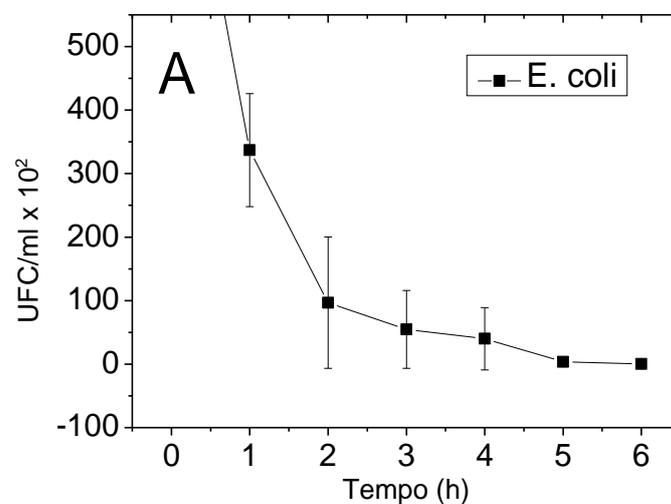


Figura 2.20: Teste cinético da interação da formulação com as bactérias *E. coli*, (a) 0h, (b) 1h, (c) 2hs, (d) 3hs, (e) 4hs, (f) 5hs, (g) 6hs.

O teste cinético foi repetido três vezes, e uma média dos eventos e desvio padrão foi calculada. O gráfico da Figura 4.21-A e B apresenta esses dados para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, em cada tempo. Nos gráficos também é apresentado o desvio padrão para cada tempo do teste cinético, mostrando que esse desvio diminui a medida que o tempo da interação aumenta, sendo que entre os momentos finais (5 e 6hs) esse desvio é praticamente nulo para as duas cepas.



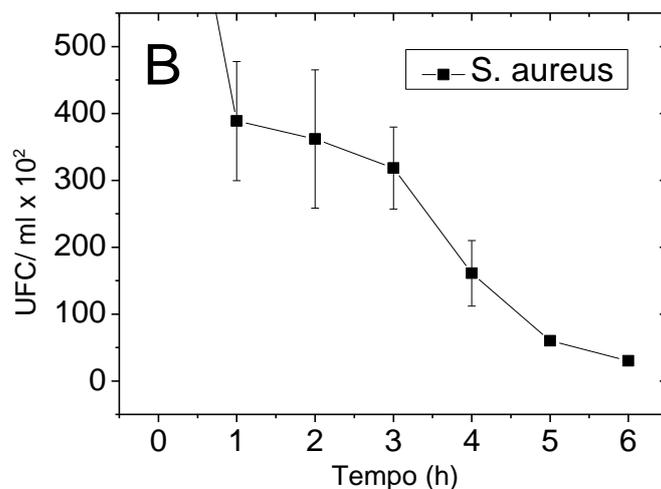


Figura 4.21: Gráfico da média das repetições do teste biocida cinético usando a formulação (EMA+Ag₂O) para *E. coli* (A) e *S. aureus* (B).

Medidas de pH foram realizadas durante o teste cinético tanto para a formulação como para nanopartículas de oxido de prata, sendo que para a formulação o pH permaneceu estável e aproximadamente neutro durante todo o processo, entretanto para o oxido de prata percebemos que após 30 min de interação houve um aumento do pH, tornando o meio levemente básico com pH em torno de 8, após 1h de interação o pH já estava em 9 e permaneceu nesse valor durante o tempo restante do processo.

Como podemos perceber através dos gráficos apresentados na Figura 4.21-A e B, o declínio do número de UFC diminui drasticamente para *E. coli* na primeira hora de interação e após 5h de interação temos a eliminação completa das bactérias, já para *S. aureus* o declínio maior ocorre entre 3 e 5hs de interação com formulação. O fato dos íons de Ag⁺ possuírem ação mais rápida para as bactérias gram negativas, possivelmente está relacionado as diferenças estruturais existentes na parede celular desses microrganismos. Os Ag⁺ tem maior dificuldade para penetrar na parede celular das bactérias gram-positivas porque essas possuem uma camada bem mais espessa de peptidoclicanos do que as bactérias gram-negativas, portanto uma maior quantidade de íons Ag⁺ poderiam ficar presos nessas estruturas, como foi já mencionado no capítulo 2, isto dificultaria a entrada dos ions no citoplasma da bactéria e assim seus mecanismos de ação podem ser retardados, essa maior resistência das bactérias

positivas pode ser também explicado simplesmente pelo fato de a parede celular dessas bactérias serem mais espessas.

4.2.7 Medidas de UV-VIS

Para confirmar que apenas os íons de Ag^+ são responsáveis pela eliminação das bactérias, realizamos medidas de UV-VIS, usamos o sobrenadante da suspensão aquosa contendo a formulação. Os resultados podem ser observados na Figura 4.23.

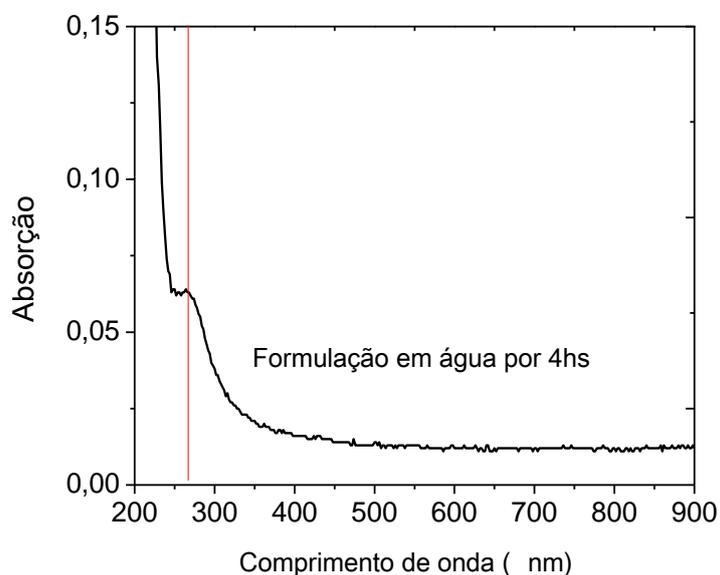


Figura 4.22: Medidas de UV-VIS da suspensão contendo a formulação.

Na literatura o pico de absorção UV-VIS de nanopartículas de prata e do óxido de prata está em torno de 420nm [73,74], e o pico referente aos íons Ag^+ está em torno de 270nm [75], o espectro UV-VIS do sobrenadante da suspensão aquosa da formulação não apresenta o pico relacionado às nanopartículas de óxido de prata, somente o pico referente aos íons de prata, dessa forma podemos concluir que as esferas de alginato não liberam essas nanopartículas para solução.

4.2.8 Separação Magnética

Após a realização dos testes bactericidas foi possível remover magneticamente as esferas para uma possível reutilização, de acordo com a figura 4.23.

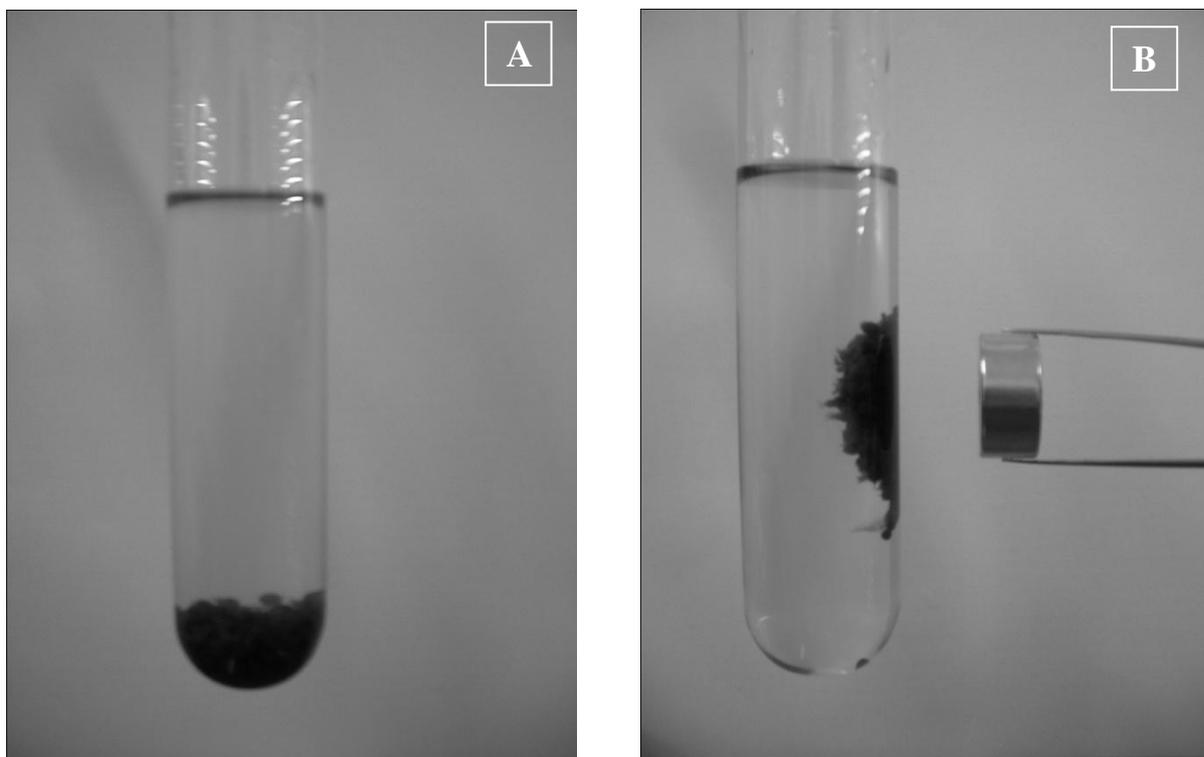


Figura 4.23: Esferas dispersas na água (A), Esferas atraídas pelo imã.

4.3 Terceira Etapa: Revestimento das Esferas de Alginato com uma Camada de Quitosana para Potencializar seu Efeito Biocida.

Preparamos amostras onde as esferas de alginato foram revestidas com a quitosana. A quitosana se deposita sobre as esferas de alginato, devido à atração eletrostática existente entre as cargas catiônicas da quitosana com as cargas aniônicas do alginato. Observamos que após o período em que as esferas de alginato ficam imersas na solução de quitosana diluída, estas ficam menores, isto pode está associado ao revestimento com o polímero, entretanto mais estudos são necessários para verificar a presença da quitosana na superfície das esferas de alginato.

Na Figura 4.24 e 4.25 vemos as fotografias das placas do teste cinético para *E. coli* e *S. aureus*, usando as esferas quitosana+formulação.

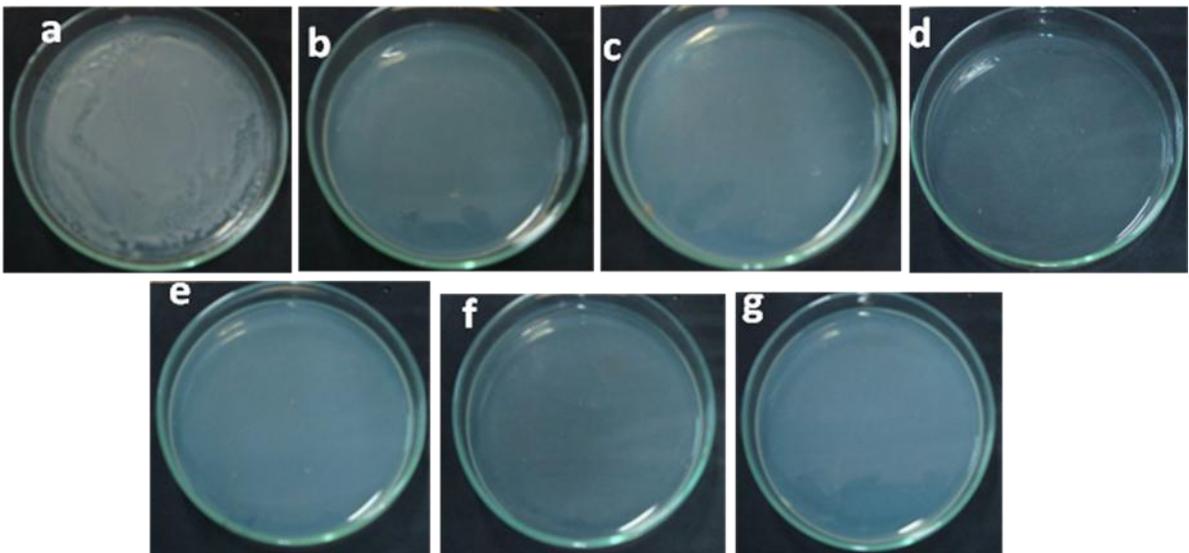


Figura 4.24: Teste cinético da interação da formação + quitosana com as bactérias *E. coli* (a) 0h, (b) 1h, (c) 2hs, (d) 3hs, (e) 4hs, (f) 5hs, (g) 6hs.

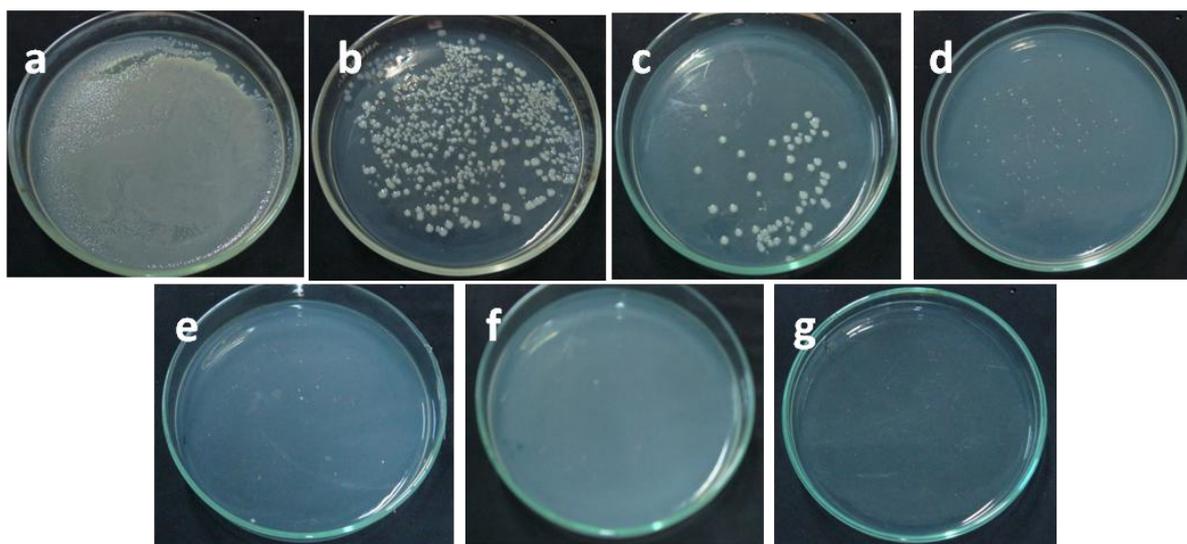


Figura 4.25: Teste cinético da interação da formação + quitosana com as bactérias *S. aureus* (a) 0h, (b) 1h, (c) 2hs, (d) 3hs, (e) 4hs, (f) 5hs, (g) 6hs.

Como podemos observar na Figura 4.26, o número de UFC de *E. coli* após uma hora de interação era nulo, ou seja esse tempo foi suficiente para eliminar completamente esses microrganismos.

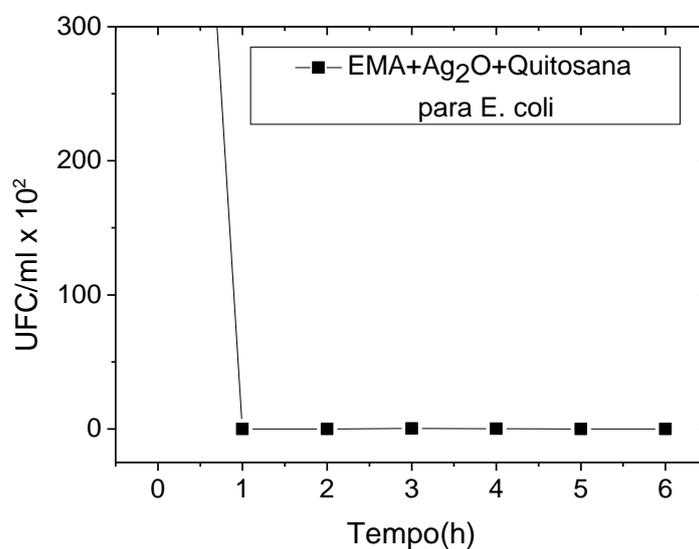


Figura 4.26: Gráfico do número de UFC de *E. coli* pelo tempo de interação com a formulação

Para *S. aureus* após 4hs de interação com a formulação só havia 600 UFC/ml, número muito reduzido se comparado com outras técnicas de esterilização, como a pasteurização, essa

técnica requer de altas temperaturas e geralmente no o final do processo ainda se tem 1000 UFC/ml [74]. De acordo com a Figura 4.27 após 5hs todas as bactérias haviam sido eliminadas.

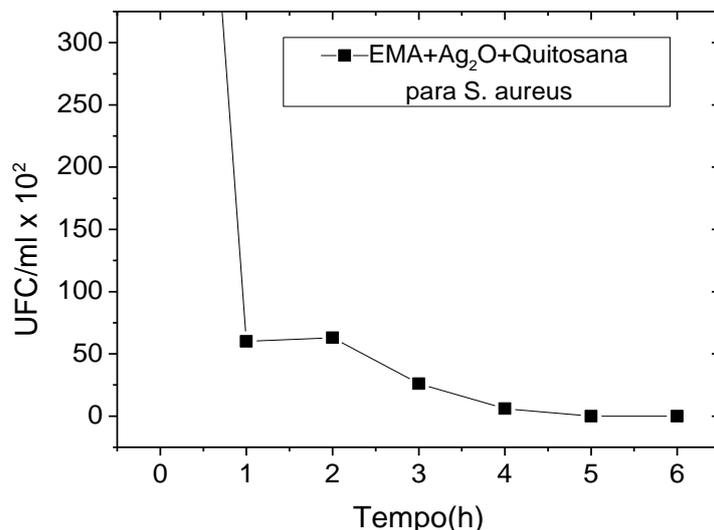


Figura 4.27: Gráfico do número de UFC de *S. aureus* pelo tempo de interação com a formulação.

Ao compararmos os resultados mostrados na seção 4.2, para as esferas magnéticas de alginato, com os resultados apresentados nesta seção, percebemos que a camada de quitosana potencializou o efeito biocida das esferas, isso ocorre porque esse polímero também possui atividade antimicrobiana devido às cargas protonadas em sua estrutura polimérica, essas cargas interagem eletrostaticamente com as moléculas aniônicas presentes na parede celular, provocando alterações na permeabilidade da membrana podendo resultar na morte celular. Podemos então somar os dois efeitos o da quitosana e do oxido de prata, e teremos um potente bactericida, que possui ação mais rápida do que as esferas que não foram recobertas com o polímero.

É importante ressaltar que foram realizadas medidas de pH ao longo do teste cinético, e o pH das esferas com essa camada de quitosana estava em torno de 5, é necessário manter esse pH levemente ácido, pois a ação da quitosana esta relacionada a interação das cargas catiônicas presentes em sua estrutura com as moléculas aniônicas da parede celular das

bactérias, como proposto no capítulo 2. Na literatura temos vários trabalhos que usam a quitosana com pH nessa faixa [77, 78].

CAPITULO 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 Conclusões

5.1.1 Primeira Etapa: Quitosana Magnética

Através do método empregado nesse trabalho para produção das amostras, conseguimos sintetizar magnetita incorporada na matriz polimérica da quitosana, controlamos o tamanho das nanopartículas alterando o diâmetro dos poros do biopolímero, para alterar esse diâmetro variamos alguns fatores, tais como acréscimo de Tween, e as concentrações de glutardialdeído.

Neste trabalho foi possível fazer um cálculo do número aproximado de grupos amino existentes na cadeia da quitosana, e vimos que esse valor estava em torno de $3,14 \times 10^{21}$ moléculas por grama de quitosana, assim foi possível calcular a concentração ideal de glutardialdeído necessária para gelificar o polímero, essa concentração ficou em torno de 2%. É importante salientar que como comentamos no capítulo 4, esse valor, de 2% corresponde à um sistema idealizado, mas sistemas reais podem apresentar variações desse valor.

De acordo com os resultados para as amostras que não possuem Tween 80, a quantidade em excesso do agente reticulante age negativamente no aumento do diâmetro das partículas, sendo que as amostras com concentrações entre 4 e 5% são as que apresentam o maior tamanho médio entre 10 e 11nm respectivamente. Temos também que abaixo da concentração limite para se gelificar a quitosana, o diâmetro das partículas diminui até o valor mínimo que corresponde a ausência do glutardialdeído. Em excesso, o glutardialdeído também acaba agindo de maneira a diminuir o tamanho das partículas, como pode ser evidenciado para as amostras com concentrações de 10 e 20% do agente reticulante onde há um declínio do diâmetro médio.

As amostras que possuem Tween se comportam de maneira diferente, temos que o aumento do glutardialdeído interfere positivamente no aumento do diâmetro das partículas.

Esse aumento pode estar relacionado ao processo de hidrólise do Tween, como proposto no capítulo 4, sendo que o maior diâmetro, 13nm, foi para a concentração de 20%.

De acordo com as análises da difração de raios-X, o parâmetro de rede para maioria das amostras ficou abaixo do valor da magnetita “bulk”, o que evidencia que temos uma mistura de magnetita e maghemita ou a formação da magnetita não estequiométrica. Esse efeito foi relacionado a uma série de fatores não muito bem definidos, entre eles o meio ácido da solução, a quitosana e o tempo necessário para gelificação após o acréscimo do glutardialdeído. A amostra contendo Tween e o maior valor da concentração de glutardialdeído, que gelificou em apenas 1h, é a que apresenta o parâmetro de rede mais próximo do da magnetita “bulk” em torno de 8,39Å.

As imagens de microscopia mostram que as partículas sintetizadas através desse método possuem forma aproximadamente esférica, e que os resultados estavam de acordo com os obtidos pela difração de raios-X.

As medidas de magnetização à temperatura ambiente indicaram que as partículas estavam no regime superparamagnético, o que era de se esperar pois todas as amostras apresentaram diâmetros abaixo do diâmetro crítico da magnetita que é de 25nm. A magnetização por grama de amostra total medida para o valor máximo do campo aumenta com a diminuição da concentração de glutardialdeído. Isso foi evidenciado através das medidas de absorção atômica, e pode estar relacionado a contribuição da massa do glutardialdeído a massa total da amostra, o que implica dizer que há uma diminuição proporcional na concentração de magnetita por grama de amostra.

Segundo as curvas de FC e ZFC das amostras com 5 e 20%, a temperatura de bloqueio magnético também diminuiu com o aumento do agente reticulante nas amostras que não possuem o Tween. Isso como consequência da diminuição do diâmetro.

Podemos então concluir que o agente reticulante também pode interferir diretamente nas características magnéticas da amostra, sendo portanto mais viável utilizar concentrações de glutardialdeído que estejam em torno da concentração calculada necessária para promover o reticulação da quitosana.

Temos que tanto a quitosana como o glutardialdeído e a magnetita são materiais biocompatíveis, e portanto as amostras produzidas através desse método são fortes candidatas para uma serie de aplicações em nanotecnologia, inclusive em aplicações biomédicas, como o transporte de fármacos por exemplo.

5.1.2 Segunda Etapa: Esferas Magnéticas de Alginato Dopadas com Oxido de Prata e sua Ação Bactericida

Produzimos partículas de prata metálica com diâmetro médio de 55nm. O difratograma de raios-X apresentou picos intensos e estreitos, indicando boa cristalinidade do grão. Realizamos testes para estudar a capacidade biocida desse material, entretanto, como mencionado anteriormente, não houve resultados positivos, pois a superfície do metal ficou afetada pelos resíduos provenientes da queima, dificultando a liberação de íons Ag.

Através desse estudo foi possível constatar também o efeito bactericida do oxido de prata, entretanto esse material pode ser tóxico para os mamíferos. Para evitar a toxicidade desse material e poder promover a desinfecção de determinados ambientes, como águas contaminadas por bactérias que são inapropriadas para o consumo humano, inserimos o oxido de prata em esferas magnéticas de alginato. Os testes indicaram que as esferas ao liberarem íons de Ag⁺ para a solução acabaram eliminando as bactérias testadas, E. coli e S. aureus. Após a desinfecção com as esferas é possível remove-las da solução com auxílio de um imã isso porque também inserimos nanoparticulas de magnetita nas esferas, fazendo com que estas tenham a capacidade de responderem a ação de um campo magnético externo.

Como vimos, os resultados mostram que as esferas agiram mais lentamente na eliminação das bactérias gram-positivas, isso porque esses microrganismos apresentam uma parede celular mais extensa, pois possuem uma espessa camada de peptidoclicanos em relação as negativas, esses peptidoclicanos possuem cargas negativas em sua estrutura, portanto parte dos íons Ag⁺ podem ficar presos a essas estruturas e menos íons penetrariam na célula.

As partículas de magnetita inseridas nas esferas de alginato, foram sintetizadas através do método de coprecipitação, e apresentaram uma larga distribuição de tamanho, de acordo

com as análises de microscopia eletrônica de transmissão. As medidas de magnetização indicaram que as partículas estão no regime superparamagnético, entretanto as medidas de espectroscopia Mössbauer indicaram que uma fração das partículas estão bloqueadas. As características magnéticas desse material tornou possível a separação magnética das esferas após a desinfecção.

Através de medidas de UV-VIS foi possível comprovar que as esferas de alginato não liberam nanopartículas de óxido de prata para a solução, assim após a desinfecção não ficariam resíduos tóxicos na solução. Esses resultados evidenciam que a ação bactericida estava inteiramente relacionada à liberação de íons Ag^+ para a solução.

Essas características, a capacidade de eliminar bactérias e a remoção magnética, tornam as esferas um forte candidato para substituir outros processos de desinfecção.

5.1.3 Terceira Etapa: Revestimento das Esferas de Alginato Dopadas com Óxido De Prata com uma Camada de Quitosana

Foi possível potencializar o efeito biocida das esferas através do revestimento com uma camada de quitosana em sua superfície.

Os resultados mostram que essas amostras foram capazes de realizar a esterilização completa de *E. coli* com apenas uma hora de interação e no caso de *S. aureus* depois de 5h de interação o meio se tornou estéril. Portanto essa camada de quitosana torna a ação das esferas contra as bactérias bem mais rápida.

5.2 Perspectivas

- Realizar mais estudos para comprovar que o glutardialdeído age como co-surfactante do Tween 80.
- Produzir amostras com Tween e utilizar concentrações abaixo da concentração calculada de glutardialdeído para gelificação da quitosana.

- Realizar medidas de infravermelho com transformada de Fourier nas esferas de alginato com a camada de quitosana e assim confirmar que as mesmas foram revestidas pela quitosana.
- Desenvolver um sistema “core-shell” de magnetita e prata e testar seu potencial bactericida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CULLITY B. D. Introduction to Magnetic Materials. Addison Wesley Publishing Company, 1972.
- [2] RIBERO, G. A. P. As propriedades magnéticas da matéria: um primeiro contato. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 22 n° 3, 2000.
- [3] CAMILO, R. L. Síntese e Caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltrióxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia. Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 2006.
- [4] GUPTA, A.K.; GUPTA, M. Review: Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials v. 26, p.3995-4021,2005.
- [5] JORDAN A.; SCHOLZ, R.; WUST R.; FÄHLING H.; FELIX R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. J. Magn. Magn. Mater, v. 201, p. 413-419, 1999.
- [6] MORNET, VASSEUR S.; GRASSET F.; VEVERKA P.; GOGLIO R.; DEMOURGUES A.; PORTIER J.; POLLERT E.; DUGUET E.. Magnetic nanoparticles design for medical applications Prog. Solid. State Chem. v. 34, n. 2-4, p. 237-247, 2006.
- [7] TARJAT, P. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. J. Magn. Magn. Mater, v. 290-291, p. 210-217, 2005.
- [8] TARJAT, P. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. J. P/jys. D; Appl. Phys. V. 36, p. 182-197, 2003.
- [9] ITO, A. SHINKAI M.; HONDA H.; KOBAYASH T. Review: Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. J. Biosci. Bioeng, v.100, n.1, p. 1-11, 2005.
- [10] PRODĚLALOVÁ, J.; J.; RITTCHI, B.; SPANOVA, A.; PETROVÁ, K.; BENES, M.J. Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles. J. Chromatogr. A v. 1056, p. 43-48, 2004.
- [11] AMBASHITA, R.D. WATTAL, P.K.; SINGH, S.; BAHADUR, D. Nanoaggregates of hexacyanoferrate (II)-loaded magnetite for removal of cesium from radioactive wastes. J. Magn. Magn. Mater, v. 267, p. 335-340, 2003.

- [12] KAMINSKI, M.D.; NUNEZ, L. Extractant-coated magnetic particles for cobalt and nickel recovery from acidic solution. *J. Magn. Magn. Mater.*, v. 293, p. 483-496, 2005.
- [13] NUNEZ, L.; KAMINSKI, M.D. Transuranic separation using organophosphorus extractants adsorbed onto superparamagnetic carries. *J. Magn. Magn. Mater.*, v. 194, p. 102-107, 1999.
- [14] SPEISER, P. P. Nanoparticles and liposomes: a state of the art. *Met. Find Exper. Clin. Pharmacol.*, v. 13, p. 337-342, 1991.
- [15] SHÜTT, W. Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy. Possibilities and limitations: a mini review. *Hibridona.*, v. 16(1), 1997.
- [16] LÜBBE, A. S.; BERGEMANN, C. Magnetically-controlled drug targeting. *Cancer J.*, v. 11, p. 3, 1998.
- [17] ALEXIOU, C.; BERGEMANN, C. Clinical applications of magnetic drug targeting. *J. Surg. Res.*, v. 95, p. 200-206, 2001.
- [18] HIERGRIST, R. Application of magnetite ferrofluids for hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.*, v. 201, p. 420-422. 1999.
- [19] SAFARIKOVA, M.; SAFARIK, I. The application of magnetic techniques in biosciences. *Magn. Electr. Separ.*, v. 10, p. 223-252, 2001.
- [20] VALENZUELA, R. *Magnetic Ceramics*, Cambridge University Press, 1994.
- [21] U. SCHWERTMANN; R. M. CORNELL. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*, p 135-140, 2000.
- [22] SILVESTRY-RODRIGUEZ, N.; SICAIROS-RUELAS, E. E.; GERBA, C. P.; BRIGHT, K. R. Silver as a Disinfectant. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2007. v. 191. p. 23-45
- [23] TORTORA, G. J.; FUNKE B. R.; CASE C. L. *Microbiologia*. Artmed, 2005
- [24] CLEMENT, J. C.; JARRETT P.S.; *Antibacterial Silver. Metal-Based Drugs.*, v. 1, p. 5-6, 1994.
- [25] 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 Part A.* 2000. v. 52, n° 4. p. 662-668.
- [26] A.T. MCMANUS, Chief Microbiology, US Army Institute of Surgical Research, Fort Sarn Houston, Texas (private communication, September 1995).

- [27] KLUEH,U.; WAGNER, V.; KELLY, S.; JOHNSON, A.; BRYERS, J. D. Efficacy of Silver-Coated Fabric to Prevent Bacterial Colonization and Subsequent Device-Based Biofilm Formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. v. 53. p. 621-631. 2000.
- [28] FOX, C.L.; MODAK, S.M.; Mechanism of Silver Sulfadiazine Action on Burn Wound Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 5, No. 6. p. 582-588, 1974.
- [29] SOLIOZ, M.; ODERMATT, A. Copper and Silver Transport by CopB-ATPase in Membrane Vesicles of *Enterococcus Hirae*. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 270, n°16, p. 9217-9221, 1995.
- [30] LOK, C. HO, C.; CHEN, R.; HE, Q.; YU, W.; SUN, H.; TAM, P. K.; CHIU, J.; CHE, C. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. v. 12, n° 4. p. 527-534, 2007.
- [31] RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. v. 27. p. 76-83, 2009.
- [32] GUGGENBICHLER, J. P.; BOSWALD, M.; LUGAUER, S.; KRALL, T. A New Technology of Microdispersed Silver in Polyurethane Induces Antimicrobial Activity in Central Venous Catheters. *Infection*. v. 27. p. 16-23, 1999.
- [33] RADHESHKUMAR, C.; MUNSTEDT, H. Antimicrobial polymers from polypropylene/silver composites—Ag⁺ release measured by anode stripping voltammetry. *Reactive & Functional Polymers*. v. 66. p. 780-788, 2006.
- [34] ALTIMAN, M. S. Divalent silver oxide bactericides. United Stats Patent. N° 5089584, 1992.
- [35] MARTINEZ-CASTANON, G.A.; NINO-MARTINEZ, N.; MARTINES-GUTIERREZ, F.; MARTINEZ-MENDOZA, J. R.; RUIZ, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. v. 10, n° 8. p. 1343-1348, 2008.
- [36] BRAYDICH-STOLLE L.; et al. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences*. v. 88, n° 2. 2005.
- [37] Wikipédia. Argyria. Acesso em 12 de janeiro de 2011 (<http://en.wikipedia.org/wiki/Argyria>).
- [38] KNOR E. Standard Protocol: To purify chitin from shellfish sources, National University of Singapore, p.2
- [39] KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microbial Technology*, v.35, p.126-139, 2004

- [40] GOOSEN, M. F. A. Applications of Chitin and Chitosan. Technomic Publishing Company, Pennsylvania, U.S.A., 1997, 336 p.
- [41] ZHENG, L.Y.; ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polymers, v.54, p.527-530, 2003.
- [42] ROBERTS, G.A.F. Chitin Chemistry. Macmillan Press, London, p. 350, 1992.
- [43] CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials, v.22, p.261-268, 2001.
- [44] RABEA, E. I.; BADAWY M. E-T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules - American Chemical Society, v.4 (6), p.1457-1465, 2003.
- [45] SANTOS, J.E; SOARES J.; DOCKAL E.; CAMPANA S. P.; CAVALHEIRO E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v.13 (4), p.242-249, 2003.
- [46] CHUNG Y-C.; SU Y.; CHEN C.; JIA G.; WANG J.; WU J. C. G.; LIN J. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. Acta Pharmacol. Sin. v. 25, n°7, p. 932. 2004.
- [47] YADAV A.V. Chitosan : a potential biomaterial effective against typhoid. Current. Science., v.87, n° 9, p.1176, 2004.
- [48] COMA V.; MARTIAL-GROS A.; GARREAU S.; COPINET, F.; SALIN, A. Edible antimicrobial films based chitosan matrix, Food Sci., v. 67 n°3, p. 1162, 2002.
- [49] COSTA SILVA HSR, SANTOS KSCR, FERREIRA E. I, Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. Quim. Nova, v. 29, n° 4, p.776, 2006.
- [50] RHOADES J.; ROLLER S. Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods. Appl. Environ. Microbiol., v. 66, n° 1, p.80, 2000.
- [51] SAGOO SK.; BOARD R.; ROLLER S. Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts Lett. Appl. Microbiol., v. 34, p.168, 2002.
- [52] LIM, S.H.; HUDSON, S.M. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. Journal of Macromolecular Science Part C – Polymer Reviews, v.43 n° 2, p.223-269, 2003.
- [53] LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. International Journal of Food Microbiology, v.95, p.147-155, 2004.

[54] LIU, Y. A templating route to nanoporous chitosan materials. Carbohydrate Research, v.340, p.2816–2820, 2005

[55] Polysorbate 80. Acessado em <http://en.wikipedia.org/wiki/Polysorbate_80>. Acessado em 10 de Dezembro de 2010.

[56] GURGEL, A. L.; SOARES, J. M.; CHAVES, D. S.; XAVIER, M. M.; BAGGIO-SAITOVITCH, E. M. Size selected synthesis of CoFe(sub 2)O(sub 4) nanoparticles prepared in a chitosan matrix. Journal of Applied Physics. v. 107, p. 746, 2010.

[57]Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:Picture_of_the_day/September_2006>. Acessado em 10 de Set. 2010.

[58] Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias, v.1, n.1, p.09-13, jan-jun 2006

[59] Humberto Henrique Kahn. Técnicas de caracterização, 2008-2010. Acessado em 10 de Setembro de 2010

[60] GONSER, U. Mössbauer Spectroscopy. Topics in Applied Physic (Springer-Verlag 1975).

[61] SAMPAIO, L. C.; GARCIA F.; GERALDO R. C.; GERNICCHIARO C.; TAKEUCHI A. Y. Técnicas de Magnetometria. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 22, n°3, p.406-410, 2000.

[62] Universidade Federal de São Paulo. Microscópio eletrônico de transmissão, 1994-2008. Acessado em < <http://www.neurofisiologia.unifesp.br/electronica.htm> >

[63] BORGES, D. L. G. Fundamentos da Espectroscopia de Absorção Atômica. Revista Analytica, n°18, 2005.

[64] Spectrophotometry. Disponível em < <http://fig.cox.miami.edu/~ddiresta/bil256/Lab1>> Acessado em 15 de Out. 2010

[65] KERWIN, B. A. Polysorbates 20 and 80 in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. Journal of Pharmaceutical Sciences, v 97, n° 8, 2008.

[66] THONGNGAM, M; MCCLEMENTS, D. J. Characterization of Interactions between Chitosan and an Anionic Surfactant. J. Agric. Food Chem, v. 52, p. 987-991, 2004.

[67] A.L. BRANDL; L.M. SOCOLOVSKY; J.C. DENARDIN; M. KNOBEL. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 294:127, 2005.

[68] PANKHURST, Q. A., CONNOLLY, J. JONES, S. K. DOBSON, J., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. Journal of Physics D: Applied Physics, v. 36, 167-181, 2003.

- [69] GOYA, F. G.; MORALES, M. P. Field Dependence of Blocking Temperature in Magnetite Nanoparticles. *Journal of Metastable and Nanocrystalline Materials*, v. 20-21, p. 673-678, 2004.
- [70] VALENZUELA, R. *Magnetic Ceramics*, Cambridge University Press, 1994
- [71] COEY, J.M.D. Noncollinear Spin Arrangement in Ultrafine Ferromagnetic Crystallites. *Physical Review Letters*, v.27, p. 1140-1142, 1971.
- [72] KODAMA, R. H.; BERKOWITZ A. E. Atomic-Scale Magnetic Modeling of Oxide Nanoparticles. *Physical Review B*, v.59, n°8, 1999.
- [73] Hu, Z.; Chan, W. L.; Szeto, S. Y. Nanocomposite of Chitosan and Silver Oxide and Its Antibacterial Property. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 108, p. 52–56, 2008
- [74] WEI, SUN, W.; QIAN, W.; YE, Y.; MA, X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research* v. 344 p. 2375–2382, 2009.
- [75] WANG, Q. YU H.; ZHONG H.; LIU J.; SUN, J.; SHEN J. Incorporation of Silver Ions into Ultrathin Titanium Phosphate Films: In Situ Reduction to Prepare Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Activity *Chem. Mater.* 2006, 18, 1988-1994
- [76] Pagina do Ministério da Agricultura, acessado em 17/02/2011: <
<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932> >
- [77] QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU X. Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 2696-2700, 2004.
- [78] WEI, D.; SUN, W.; QIAN, W.; YE, Y.; MA, X. The Synthesis of Chitosan-Based Silver Nanoparticles and their Antibacterial Activity. *Carbohydrate Research*, v. 344, p. 2375-2382, 2009.