



Joana Raquel Sequeira Quintela dos Reis

Licenciatura em Bioquímica

Funcionalização de Fibras de Celulose em Papel com Nanopartículas: Aplicação como bactericida

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT-UNL
Co-orientador: Rita Maria Mourão Salazar Branquinho, Doutora, FCT-UNL
e Maria Paula Duarte, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista
Arguente(s): Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando
Vogais: Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato
Doutora Rita Maria Mourão Salazar Branquinho



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2014

Funcionalização de Fibras de Celulose em Papel com Nanopartículas: Aplicação como bactericida

Joana Raquel Sequeira Quintela dos Reis

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Doutora Elvira Fortunato
Co-Orientador: Doutora Rita Branquinho e Professora Paula Duarte

Departamento de Química
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa

Setembro de 2014

Funcionalização de Fibras de Celulose em Papel com Nanopartículas: Aplicação como bactericida

Copyright © 2014 – Todos os direitos reservados. Joana Raquel Sequeira Quintela dos Reis

Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Para a minha irmã e melhor amiga,
Com amor.*

Agradecimentos

É com grande satisfação que encerro mais um importante ciclo da minha vida.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Investigação de Materiais (CENIMAT) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Antes de mais, um grande obrigada aos orientadores que me acompanharam e contribuíram para este projecto, nomeadamente a Professora Elvira Fortunato, a Doutora Rita Branquinho e a Professora Paula Duarte. A eles agradeço por toda a ajuda e disponibilidade que sempre me prestaram durante esta fase.

Agradeço a disponibilidade quer dos equipamentos quer dos laboratórios, bem como de todas as pessoas que me ajudaram e auxiliaram.

Também quero agradecer à minha família, pais e irmã, por todo o apoio prestado.

Um agradecimento muito especial a pessoa muito importante durante todos os anos que passei na FCT, ao Bruno Santos. Por todo o apoio prestado e palavras amigas. Pelo companheiro e amigo que sempre foste e serás.

Queria agradecer, a uma grande amiga, que conheci, durante o pouco tempo que estive com ela no CENIMAT, Cláudia Pontes, pois sem ela não teria conseguido.

Queria agradecer também, a três grandes amigas minhas, Luíza, Marisa e Sandra, que apesar de nos nossos caminhos só se terem cruzado durante este mestrado, sempre me apoiaram e me ajudaram a enfrentar os obstáculos que foram aparecendo no caminho.

Não podia deixar de mencionar duas pessoas que estiveram comigo na recta final, ajudando-me todos os dias e nunca me deixando desistir. Ao Hernani, que esteve comigo desde o primeiro dia de faculdade e à Ana Alonso, com quem me cruzei durante o seu percurso por Portugal, um enorme obrigada, pelos muitos bons momentos passados.

Por último mas não menos importante, quero agradecer a uma pessoa que conheci e que se tem tornado muito importante para mim. A ti, Danilo, que apesar dos nossos caminhos se terem cruzado recentemente, já tens um lugar especial na minha vida. Obrigada por todo o apoio e paciência

Resumo

As doenças infecciosas emergentes e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos, por parte das bactérias patogénicas e fungos, a um ritmo alarmante são uma questão de extrema preocupação. Apesar do aumento do conhecimento da patogénese microbiana e aplicação de terapias modernas, a taxa de mortalidade associada a infecções microbianas ainda permanece alta. Muitas destas infecções têm origem nos alimentos e água que ingerimos.

Torna-se, portanto, urgente procurar novas estratégias e encontrar novos agentes antimicrobianos, a partir de substâncias naturais e inorgânicas para desenvolver novos fármacos ou agentes para controlar as infecções microbianas.

É aqui, que a nanotecnologia entra em acção com o conceito de embalagem activa. Esta beneficia do uso de nanopartículas para aumentar a segurança e a qualidade de um produto pois estas possuem actividade antimicrobiana.

A maioria das embalagens é feita de papel, que possui óptimas propriedades e características (baixo custo, porosidade e biodegradabilidade), tornando-se um substrato cobiçado em diversas áreas de investigação.

Neste trabalho, uniu-se as vantagens do papel com as propriedades antimicrobianas das nanopartículas.

Assim, impregnaram-se diferentes substratos de papel com nanopartículas, com o objectivo de testar qual o que apresenta maior actividade antibacteriana. Para tal utilizou-se o cartão, o saco de refeições de take-away, papel de mesa e papel de talheres, os quais foram impregnados com nanopartículas de prata, cobre, óxido de zinco e óxido de tungsténio, com concentrações variadas. Estas nanopartículas foram testadas em cinco bactérias diferentes: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (RN4220) e *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Escherichia coli* (ATCC8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) e numa levedura *Candida albicans* (ATCC10231).

Dos testes anti-bacterianos realizados, concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos para o cartão com AgNPs.

Utilizando o cartão como substrato e as nanopartículas de prata como agente anti-bacteriano, estudou-se a influência da concentração de AgNPs (2, 10, 25 e 50mM). A concentração de 50mM revelou-se mais eficaz, em especial para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027).

Palavras-Chave: Papel; Nanopartículas de prata; Actividade anti-bacteriana; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027).

Abstract

Emerging infectious diseases and the development of antibiotic resistance by pathogenic bacteria and fungi at an alarming rate is a matter of serious concern. Despite increasing knowledge of microbial pathogenesis and applying modern therapies, the mortality rate associated with microbial infections remains high. Many of these infections come from food and water we ingest.

It is, therefore, urgent to search for new strategies and find new antimicrobial agents from natural and inorganic substances to develop a new generation of drugs or agents to control microbial infections.

It is here that nanotechnology comes into action with the concept of active packaging. In order to increase the safety and quality of a product, a package has been improved by the use of nanoparticles, because of their antimicrobial activity.

The majority of packages available in the market are made out of paper, which has excellent properties and characteristics (low cost, porosity, biodegradability among others), making paper a coveted substrate for various research areas.

In this work, the advantages of both paper and the antimicrobial properties of nanoparticles were combined to yield an active package.

To accomplish this purpose, different paper substrates were functionalized with nanoparticles, in order to test which one shows higher antibacterial activity. For this we used card board, a take-away meal bag, tableware paper and paper board, which were impregnated with silver, copper, zinc oxide and tungsten oxide nanoparticles with different concentrations.

These nanoparticles were tested in five different bacterial strains: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (RN4220) e *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Escherichia coli* (ATCC8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) and a yeast, *Candida albicans* (ATCC10231).

From the several antibacterial tests performed, it was concluded that the best results were achieved with the cereal box card as a substrate with AgNPs. A 50mM concentration proved to be more effective, in particular for *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) bacteria.

Keywords: Paper; Silver nanoparticles; Antibacterial Activity; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027).

Lista de Acrónimos

- ADN** - Ácido Desoxirribonucleico
- AgNPs** - Nanopartículas de Prata
- ATP** - Adenosina Trifosfato
- CuNPs** - Nanopartículas de cobre
- DLS** - *Dynamic light scattering*
- DRX**- Difração de Raios X
- EDS** - *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*
- ER** - Electrões Retrofundidos
- ES** - Electrões Secundários
- FTIR** - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*
- MRSA** - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
- NP** - Nanopartícula
- PG** - Peptoglicano
- PVA** - Polivinilacetato
- PVP** - Polivinilpirrolidona
- ROS** - Espécies Reactivas de Oxigénio
- SEM-FIB** - *Scanning Electron Microscopy-Focused Ion Beam*
- SPR** - *Surface Plasmon Resonance*
- UV** - Ultra Violeta
- TG** - Termogravimetria
- ZnONPs** - Nanopartículas de óxido de zinco
- WO₃NPs** - Nanopartículas de óxido de tungsténio

Lista de Símbolos

A - Absorvância

θ - Ângulo

λ - Comprimento de Onda

d - Distância

K - Factor Forma

I_0 - Intensidade do feixe incidente

I_t - Intensidade transmitida através da amostra

β - Distância a meia altura

P - Potência

R - Resolução

T_i - Temperatura inicial

T_f - Temperatura final

T - Transmitância

S - Velocidade

Índice de Matérias

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de Acrónimos	xiii
Lista de Símbolos	xiv
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xx
Enquadramento e Objectivos	xxii
1 Introdução	1
1.1 Papel	1
1.1.1 Composição	1
1.2 Nanopartículas	2
1.2.1 Nanopartículas metálicas	3
1.2.2 Nanopartículas de cobre	4
1.2.3 Nanopartículas de óxido de zinco	4
1.2.4 Nanopartículas de óxido de tungsténio	4
1.2.5 Nanopartículas de prata	5
1.3 Actividade anti-bacteriana	6
1.4 As bactérias	7
1.5 As bactérias na saúde	8
1.6 Mecanismo de acção das nanopartículas contra as bactérias	8
1.7 Toxicidade das nanopartículas	9
2 Técnicas de Caracterização	
2.1 Espectroscopia de UltraVioleta-Vísivel	11
2.2 Microscopia electrónica de varrimento	11

2.3	Espectroscopia dispersiva de raios-X	13
2.4	Difracção de raios-X	13
2.5	Dispersão de luz dinâmica	14
2.6	Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier	14
2.7	Análise termogavimétrica	15
3	Materiais e Métodos Experimentais	17
3.1	Materiais	17
3.1.1	Síntese das nanopartículas de prata	17
3.1.2	Dispersão das nanopartículas comerciais	18
3.2	Corte dos substratos de papel	18
3.3	Impregnação dos substratos de papel	19
3.4	Secagem dos substratos de papel	19
3.5	Testes anti-bacterianos	19
3.5.1	Procedimento utilizado na realização dos testes antimicrobianos	20
4	Discussão de Resultados	23
4.1	Caracterização dos substratos de papel	23
4.1.1	Microscopia Óptica	23
4.1.2	Microscopia electrónica de varrimento	25
4.1.3	Espectroscopia dispersiva de raios-X	29
4.1.4	Difracção de raios-X	30
4.2	Testes de dispersão das nanopartículas comerciais	32
4.3	Caracterização dos diferentes tipos de nanopartículas	34
4.3.1	Nanopartículas de óxido de zinco	34
4.3.1.1	Espectrofotometria de UV-Visível	34
4.3.1.2	Microscopia electrónica de varrimento	35
4.3.1.3	Espectroscopia dispersiva de raios-X	36
4.3.1.4	Difracção de raios-X	36
4.3.2	Nanopartículas de Cobre	38
4.3.2.1	Espectrofotometria de UV-Visível	38
4.3.2.2	Microscopia electrónica de varrimento	39
4.3.2.3	Espectroscopia dispersiva de raios-X	39

4.3.2.4	Difracção de raios-X	40
4.3.3	Nanopartículas de prata	41
4.3.3.1	Espectrofotometria de UV-Visível	41
4.3.3.2	Microscopia electrónica de varrimento	43
4.3.3.3	Espectroscopia dispersiva de raios-X	43
4.3.3.4	Difracção de raios-X	44
4.3.4	Nanopartículas de óxido de tungsténio	45
4.3.4.1	Espectrofotometria de UV-Visível	45
4.3.4.2	Microscopia electrónica de varrimento	46
4.3.4.3	Espectroscopia dispersiva de raios-X	46
4.3.4.4	Difracção de raios-X	47
4.4	Estudo da actividade anti-bacteriana das nanopartículas	49
4.4.1	Microscopia electrónica de varrimento	53
4.4.2	Difracção de raios-X	56
4.4.3	Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier	57
4.4.4	Análise térmica	58
5	Conclusões/perspectivas futuras	60
	Bibliografia	62
	Anexos	65

Índice de Figuras

Figura 1: A estrutura molecular da Celulose.

Figura 2: a) Taça Lycurgus do final da época Romana; b) Vidro rubi barroco.

Figura 3: Crescimento e estabilização das nanopartículas.

Figura 4: Estrutura celular das bactérias Gram-positivas.

Figura 5: Estrutura celular das bactérias Gram-negativas.

Figura 6: Mecanismos de toxicidade das nanopartículas (NPs) contra as bactérias. As NPs e os seus iões (por exemplo, prata e zinco) podem produzir radicais livres, resultando na indução do stress oxidativo (ou seja, espécies reactivas de oxigénio; ROS). AS ROS produzidas podem irreversivelmente danificar as bactérias (por exemplo, a membrana, o ADN e as mitocôndrias), resultando em morte bacteriana.

Figura 7: Equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB usado na caracterização dos materiais.

Figura 8: Equipamento de difracção de raios-X X'Pert Pro da PANalytical usado na caracterização dos materiais.

Figura 9: Equipamento FTIR (Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation) utilizado na caracterização dos substratos.

Figura 10: Impressora a laser utilizada para cortar os vários substratos de papel

Figura 11: Estufa EHRET-TK 4067 furnace

Figura 12: Colocação dos discos de papel contendo nanopartículas, nas placas de petri contendo as suspensões bacterianas.

Figura 13: Esterilização dos substratos de papel, durante uma hora, sob radiação ultra-violeta.

Figura 14: Observação microscopia do cartão (A) e do saco de refeições take-away (B).

Figura 15: Observação microscópica do papel de mesa (A) e do papel de talheres (B).

Figura 16: Observação microscópica do saco de papel de refeições de take-away. A) Parâmetros: P=15, S=100 e R=500. B) Parâmetros: P=5, S=100 e R=500.

Figura 17: Imagens obtidas por SEM do saco de papel de refeições de take-away.

Figura 18: Imagens obtidas por SEM do cartão.

Figura 19: Imagens obtidas por SEM do papel de mesa.

Figura 20: Imagens obtidas por SEM do papel de talheres.

Figura 21: Imagens obtidas por SEM do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de prata; A) Antes da exposição aos raios UV; B) depois da exposição aos raios UV.

Figura 22: Imagens obtidas por SEM do papel de talheres contendo 10mM de nanopartículas de prata; A) Antes da exposição aos raios UV; B) depois da exposição aos raios UV.

Figura 23: Espectro de EDS do cartão.

Figura 24: Difractograma obtido por Raios-X dos substratos de papel utilizados nesta experiência.

Figura 25: Medidas de DLS dos testes de dispersão para as das nanopartículas de óxido de zinco, cobre e óxido de tungsténio.

Figura 26: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de óxido de zinco comerciais, com concentração variável.

Figura 27: Imagens obtidas por SEM das nanopartículas de óxido de zinco comerciais.

Figura 28: Espectro de EDS das nanopartículas de óxido de zinco comerciais.

Figura 29: Difractograma obtido por Raios-X obtido das nanopartículas de óxido de zinco comerciais.

Figura 30: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de cobre comerciais, com concentração variável.

Figura 31: Imagens obtidas por SEM das nanopartículas de cobre comerciais.

Figura 32: Espectro de EDS das nanopartículas de cobre comerciais.

Figura 33: Difractograma obtido por Raios-X das nanopartículas de cobre comerciais.

Figura 34: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio com concentração de AgNO_3 variável.

Figura 35: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio com concentração de AgNO_3 variável. Medição feita uma semana após a primeira medição.

Figura 36: Imagens obtidas por SEM do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de prata.

Figura 37: Espectro de EDS do papel de mesa contendo 10mM de A nanopartículas de prata..

Figura 38: Difractograma obtido por Raios-X obtido do papel de mesa com e sem nanopartículas de prata.

Figura 39: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais, com concentração variável.

Figura 40: Imagens obtidas por SEM das nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais.

Figura 41: Espectro de EDS das nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais.

Figura 42: Difractograma obtido por raios-X obtido das nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais.

Figura 43: Imagens obtidas por SEM das cinco estirpes bacterianas. A) *Escherichia coli* (ATCC8739); B) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027); C) *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (RN4220); D) *Enterococcus faecalis* (ATCC29212).

Figura 44: Testes anti-bacterianos realizados com a bactéria *Pseudomonas*. A) Controlos (C^+ - Controlo Positivo Cartão; C^- - Controlo Negativo Cartão; M^+ - Controlo Positivo Mesa; M^- - Controlo Negativo Mesa). B) Papel de Mesa com nanopartículas de prata com 2, 10, 25 e 50mM de concentração. C) Cartão com nanopartículas de prata com 2, 10, 25 e 50mM de concentração.

Figura 45: Testes anti-bacterianos realizados com a bactéria *Saphylococcus aureus* A) Controlos (C^+ - Controlo Positivo Cartão; C^- - Controlo Negativo Cartão; M^+ - Controlo Positivo Mesa; M^- - Controlo Negativo Mesa). B) Papel de Mesa com nanopartículas de prata com 2, 10, 25 e 50mM de concentração. C) Cartão com nanopartículas de prata com 2, 10, 25 e 50mM de concentração.

Figura 46: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 2mM de nanopartículas de prata.

Figura 47: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 10mM de nanopartículas de prata.

Figura 48: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 25mM de nanopartículas de prata.

Figura 49: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 50mM de nanopartículas de prata.

Figura 50: Difractogramas obtido pela técnica de XRD para as nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio, com diferentes concentrações, no substrato de cartão.

Figura 51: Espectro obtido por FTIR do cartão com e sem nanopartículas de prata.

Figura 52: Análise termogravimétrica do cartão com e sem nanopartículas de prata.

Índice de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros ideais de corte para cada um dos substratos.

Tabela 2: Índice de cristalinidade dos diferentes substratos de papel.

Tabela 3: Diâmetro dos halos de inibição (mm) verificados com papéis impregnados com a suspensão de 10 mM de nanopartículas de prata com os seis microrganismos em estudo (média±desvio padrão).

Tabela 4: Médias dos três ensaios realizados para as cinco estirpes bacterianas com papel de mesa e cartão, variando a concentração de AgNPs.

Enquadramento e Objectivos

A seguir à pedra e às placas de argila, o papel, foi um dos primeiros suportes de comunicação das comunidades humanas. Com o avanço da tecnologia são cada vez mais as áreas em que o papel pode ser aplicado, e com diferente finalidade.

Por outro lado, as raízes históricas das nanopartículas remontam muito além do seu estudo científico intensivo actual. O tingimento de vidro com soluções coloidais de ouro recém-precipitadas já era conhecido no final de época greco-romana, bem como as suas propriedades anti-bacterianas.

Neste trabalho pretende-se conferir a substratos de papel encontrados em embalagens secundárias comuns, novas funcionalidades, devido à sua funcionalização com nanopartículas, tornando-os passíveis de serem aplicados na indústria alimentar.

Para tal, utilizam-se nanopartículas constituídas por diferentes materiais (prata, óxido de zinco, cobre, entre outros), como antibactericida. Devido a todas as vantagens que esta tecnologia possui, a sua aplicação na indústria alimentar e conseqüentemente na saúde é fundamental e imprescindível.

Dado o mestrado em que me encontro, e devido a paixão pela parte que envolve a nanotecnologia, vi neste projecto uma óptima oportunidade de unir duas áreas que me completam: a química e a nanotecnologia. Assim, em conjunto, é passivo, serem aplicadas a produtos alimentares de modo a encontrar ou otimizar os processos de combate às bactérias, já existentes.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Papel

O papel como suporte para escrita é o material mais usado nos dias de hoje, mas nem sempre foi assim.

Antes da criação do papel, o material mais utilizado para escrita, foi o pergaminho, feito com peles de animais. Na Índia, usavam as folhas de palmeiras, os esquimós utilizavam ossos de baleia e dentes de foca. Na China os livros eram feitos com conchas e cascos de tartaruga e posteriormente em bambu e seda. Entre outros povos era comum o uso da pedra, barro e até mesmo a casca das árvores.

Assim, a palavra papel provém do latim "papyrus", nome dado a um vegetal da família "Cepareae" (Cyperuapapyrus). A medula dos seus caules era empregada, como já referido, pelos egípcios, há 2 400 anos a.C. Entretanto foram os chineses os primeiros a fabricarem o papel como o atual. Entretanto, foram os chineses os primeiros a fabricar papel com as características que o atual possui.

T'sai Lun, um marquês, da dinastia chinesa Han, produziu uma substância feita de fibras da casca da amoreira, restos de roupas e cânhamo, humedecendo e batendo a mistura até formar uma pasta. Usando uma peneira e secando esta pasta ao sol, a fina camada depositada transformava-se numa folha de papel. O princípio básico deste processo é o mesmo usado até hoje. Esta técnica foi mantida em segredo pelos chineses durante quase 600 anos. [1]

1.1.1 Composição

O papel é formado por fibras celulósicas que se entrelaçam umas com as outras, garantindo a sua resistência. Essas fibras são retiradas da madeira. A composição química da fibra varia consoante o tipo de planta utilizado. No interior de uma planta existem variações de composição, até mesmo dentro da mesma parede fibrosa. No entanto, a parede celular é um material compósito complexo que contém componentes com funções estruturais e não estruturais, sendo os principais componentes a celulose, a hemicelulose e a lenhina.

A celulose é o principal elemento estrutural da parede celular que é um polissacárido linear constituído por de monómero β -1,4- -D-glucopirranose (Figura 1). [1]

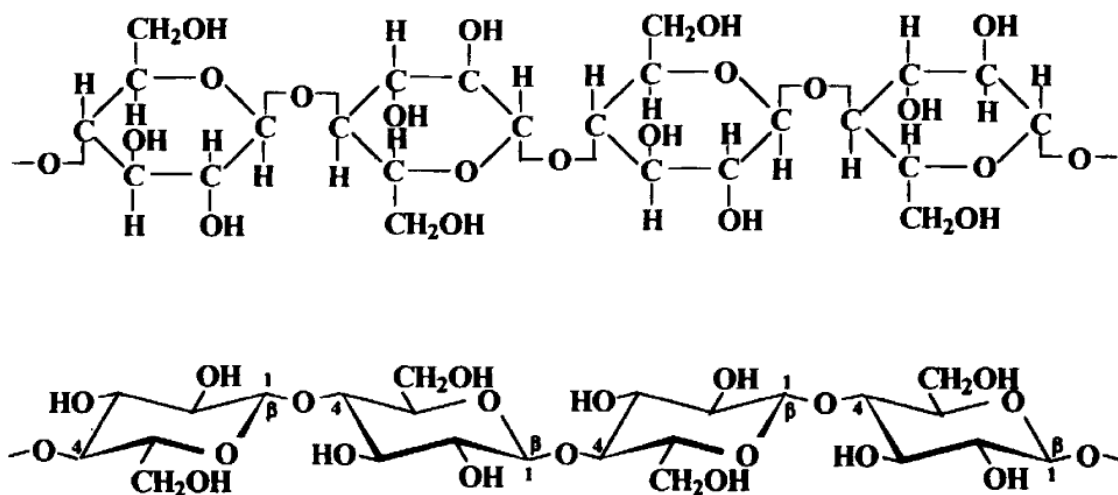


Figura 1: A estrutura molecular da Celulose. [1]

O grau de cristalinidade da celulose depende da sua fonte. Celulose de algodão e de alguns tipos de algas apresentam uma elevada cristalinidade, enquanto que a celulose da madeira tende a ser menos cristalina.

A lenhina é, a seguir à celulose, o polímero mais abundante e importante nas plantas, pois é responsável pela rigidez da parede celular e mantém também as células unidas. A lenhina é um polímero aromático natural altamente ramificado, e com uma complexa estrutura tridimensional constituído por unidades de fenilpropano com diferentes padrões de substituição e unidas por vários tipos de ligações. [2]

Devido a sua heterogeneidade a lenhina apresenta uma estrutura amorfa que não pode ser descrita por uma estrutura simples. A sua estrutura está também relacionada com a maior ou menor facilidade de deslenhificação, ou seja, a sua remoção mediante o processo de cozimento, que no caso das folhosas é mais facilitada não só pelos diferentes teores de lenhina, relativamente as resinosas mas também devido a diferenças na estrutura. [3]

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados, com grau de polimerização baixo e que, à semelhança da celulose, funcionam como material estrutural, além de servir como substância de reserva. A composição das hemiceluloses depende fortemente da espécie. [4]

1.2 Nanopartículas

As raízes históricas das nanopartículas remontam muito além do seu estudo científico intensivo actual. Isto é válido tanto para o fabrico e a utilização de nanopartículas.

O tingimento de vidro com soluções coloidais de ouro recém-precipitadas já era conhecido no final de época greco-romana. [5] Os tons vermelho-violeta são típicos, mas também o são as variações roxas e vermelho-vinho, que têm encontrado ampla utilização em fábricas de vidro e porcelana desde o século XVIII (Figura 2). A surpreendente variedade de cores é devido

às partículas de ouro coloidal, com diâmetros típicos variando de 1 a 50 nm, e a correlação da dimensão de partícula com a ressonância plasmónica que é responsável pela cor. [6]

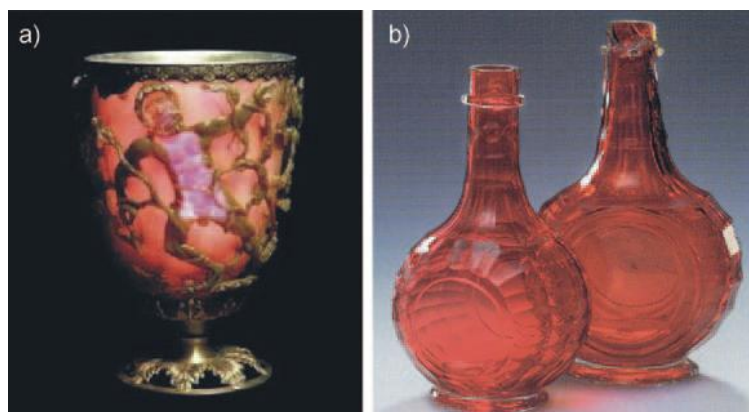


Figura 2: a) Taça Lycurgus do final da época Romana; b) Vidro rubi barroco. [6]

As nanopartículas são amplamente definidas como partículas que têm uma ou mais dimensões na ordem dos 100 nm ou menos. Devido às suas propriedades químicas, físicas e biológicas únicas, as nanopartículas são consideradas como tendo um elevado interesse numa ampla gama de aplicações, que vão desde o biosensoriamento à catálise, fabricação de nanodispositivos, fabricação de têxteis entre outros. As propriedades intrínsecas de uma nanopartícula de metal são determinadas principalmente pelo seu tamanho, forma, composição, cristalinidade e estrutura, que dependem fortemente, da especificidade do método e da implementação das condições experimentais usadas na sua síntese. [7-8]

1.2.1 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas possuem propriedades ópticas, electrónicas, químicas e magnéticas únicas, diferentes dos materiais a granel da mesma espécie. Estas propriedades dependem principalmente do tamanho, forma e composição da nanopartícula.

A manifestação mais proeminente de confinamento nas propriedades ópticas das nanopartículas metálicas é o aparecimento de uma ressonância morfológica, a ressonância plasmónica de superfície (SPR), que aumenta fortemente as suas respostas lineares e não lineares em torno de comprimentos de onda específicos [9-13].

Esta ressonância é uma consequência directa do confinamento dieléctrico (ou seja, do efeito de campo local) e, num modelo clássico elementar, pode ser interpretada em termos de um movimento colectivo dos electrões numa nanopartícula. No caso dos metais nobres, a SPR aparece como uma ressonância bem definida no espectro de absorção do material, com as características espectrais determinadas pelas propriedades de condução dos electrões e do seu núcleo no meio confinado. [9-10]

1.2.2 Nanopartículas de cobre

As nanopartículas metálicas são de grande interesse devido às suas excelentes propriedades físicas e químicas catalíticas. Entre as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de cobre (CuNPs) têm recebido considerável interesse público, devido a suas boas propriedades ópticas, eléctricas e térmicas. As CuNPs foram consideradas rentáveis, em comparação com metais nobres como a prata, o ouro e a platina. Assim, estas são potencialmente aplicadas nos campos de catálise, fluidos de arrefecimento e tintas condutoras. Devido à ressonância plasmónica de superfície, as CuNPs apresentam propriedades ópticas não lineares melhoradas, o que permitiu a sua larga aplicação em dispositivos ópticos e materiais ópticos não-lineares, como interruptores ópticos ou óculos fotocromáticos. [14-17]

1.2.3 Nanopartículas de óxido de zinco

Entre os vários óxidos de metais estudados quanto à sua actividade antibacteriana, as nanopartículas de óxido de zinco, foram estudadas como sendo altamente tóxicas para as bactérias. Além disso, a sua estabilidade sob condições de processamento adversas e relativamente baixa toxicidade combinada com as propriedades antimicrobianas potentes favorece a sua aplicação como agentes antimicrobianos. [13]

Muitos estudos têm demonstrado que algumas nanopartículas feitas de óxidos de metais, tais como ZnONPs, têm toxicidade selectiva para as bactérias e exibem apenas um efeito mínimo sobre as células humanas, o que torna interessante a sua utilização em indústrias agro-alimentares. [14]

1.2.4 Nanopartículas de óxido de tungsténio

Devido ao elevado potencial de comportamento fotocondutor usado em dispositivos electrocrómicos e sensores, o óxido de tungsténio (WO_3) é o candidato mais promissor aplicado na investigação de materiais electrocrómicos, no tingimento de células solares sensibilizadas, e sensores de gás. As propriedades melhoradas do material nanoestruturado, normalmente resultam da sua enorme área de superfície, que fornece grandes quantidades de área activa para reagir, ou seja, fotocromismo, onde as etapas de coloração e branqueamento aumentam rápida e significativamente a radiação da película fina de óxido de tungsténio sob o efeito da luz. [18]

1.2.5 Nanopartículas de prata

Como já mencionado, as novas propriedades de NPs têm sido exploradas numa ampla gama de potenciais aplicações na medicina, cosméticos, energias renováveis, recuperação ambiental e dispositivos biomédicos [19-21]. Entre elas, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm atraído grande interesse devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas únicas em comparação com os seus homólogos na macro escala [22].

As AgNPs têm propriedades físico-químicas distintas, incluindo uma elevada condutividade eléctrica e térmica, estabilidade química, a actividade catalítica e comportamento óptico não linear.

Estas propriedades conferem-lhes um elevado potencial para serem usadas em tintas, microelectrónica e imagiologia médica [23]. Além disso, as AgNPs apresentam amplo espectro de actividade bactericida e fungicida [24] o que as torna extremamente populares numa gama diversificada de produtos de consumo, incluindo plásticos, sabonetes, pastas, alimentos e têxteis, aumentando o seu valor de mercado.

A nanoprata pode ser usada na forma líquida, tal como um colóide (revestimento e de pulverização) ou contida dentro de um champô (líquido) e também pode estar incorporada na forma de um sólido, tal como um polímero ou ser suspensa numa barra de sabão (sólido).

A nanoprata também pode ser utilizada tanto na indústria têxtil, incorporando-a na fibra (fiadas) ou utilizada em membranas de filtração de sistemas de purificação de água.

Existem muitos produtos e aplicações que utilizam a nanoprata em produtos de consumo; as aplicações relacionadas com a nanoprata, actualmente têm um elevado grau de comercialização.

Actualmente, muitos métodos têm sido relatados para a síntese de AgNPs usando rotas químicas, biológicas, físicas e fotoquímicas. Cada método tem as suas vantagens e as desvantagens com os problemas comuns que são os custos, escalabilidade, tamanhos de partículas e distribuição de tamanho.

Entre os métodos existentes, os métodos químicos têm sido utilizados principalmente para a produção de AgNPs. Estes oferecem uma maneira fácil de sintetizar AgNPs em solução. Geralmente, o processo de síntese química de AgNPs em solução emprega os seguintes componentes principais: (i) Precursores de metal, (ii) agentes de redução e (iii) estabilizadores. A formação de soluções coloidais de prata a partir da redução de sais de prata envolve duas fases de nucleação e crescimento subsequente. Está também descrito que o tamanho e a forma das AgNPs sintetizadas, estão fortemente dependentes destas fases. [25]

Além disso, para a síntese de AgNPs monodispersas com distribuição de tamanho uniforme, é necessário que todos os núcleos se formem ao mesmo tempo. A nucleação inicial e o subsequente crescimento de núcleos iniciais pode ser controlado por ajustamento dos parâmetros da reacção tais como temperatura da reacção, o pH, os precursores, os agentes de redução (por exemplo, NaBH₄, etileno-glicol, glucose), e agentes de estabilização (ou seja, PVA, PVP, oleato de sódio). Um mecanismo geral, que representa o processo de crescimento e estabilização das nanopartículas acima descrito, está representado na Figura 3.

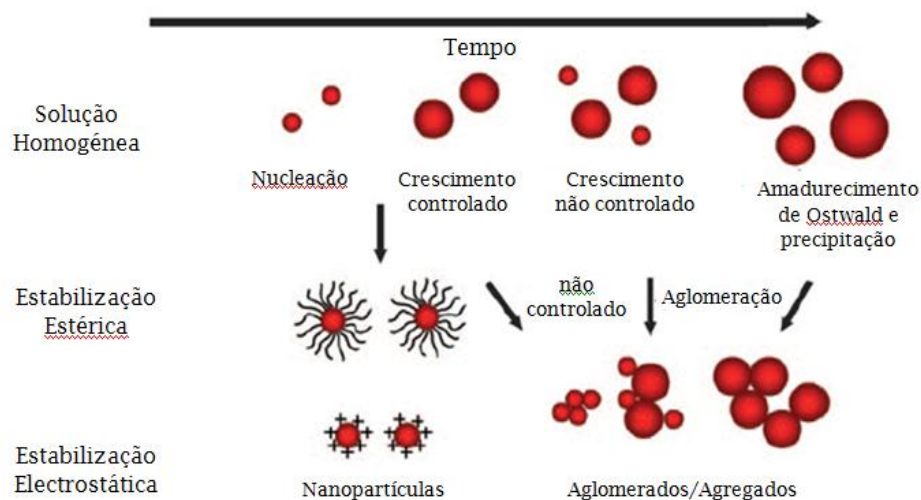


Figura 3: Crescimento e estabilização das nanopartículas. [26]

1.3 Actividade anti-bacteriana

Os anti-bacterianos podem ser definidos como um grupo de substâncias de várias fontes, como por exemplo de origem bacteriana, fúngica, semi-sintética ou sintética, que têm em comum a propriedade de provocar a morte ou a inibição bacteriana. [27]

Em geral, estes agentes podem ser classificados como bactericida, que mata bactérias, ou bacteriostáticos, que retardam o crescimento bacteriano.

Agentes anti-bacterianos são fundamentais para combater as doenças infecciosas. No entanto, com o seu amplo uso e abuso, o aparecimento da resistência bacteriana aos fármacos anti-bacterianos tornou-se um fenómeno comum, o que é um problema grave. A resistência é na maioria das vezes com base em processos evolutivos que ocorrem durante, por exemplo, a terapia antibiótica, e leva à resistência hereditária. [28]

Os agentes anti-bacterianos são muito importantes na indústria têxtil, desinfecção indústria, água, remédios e embalagens de alimentos.

Os compostos orgânicos utilizados para a desinfecção têm algumas desvantagens, incluindo toxicidade para o corpo humano, por isso, o interesse em desinfectantes inorgânicos tais como as nanopartículas de óxidos metálicos, tem vindo a crescer.

Geralmente, as nanopartículas metálicas mostram actividade anti-bacteriana e antifúngica, embora existam preocupações de segurança ambiental e humana em relação à liberação e consumo de nanopartículas metálicas que estão ainda a ser exploradas. A libertação excessiva de prata, por exemplo, provoca a poluição do ambiente que por sua vez faz com que a prata seja prejudicial para os seres humanos e para os animais. [27-29]

1.4 As bactérias

A parede da célula bacteriana está concebida para fornecer força, rigidez, e forma, e para proteger a célula da ruptura osmótica e de danos mecânicos. De acordo com a sua estrutura, componentes e funções, a parede da célula bacteriana pode ser dividida em duas categorias principais: Gram-positiva (+) e Gram-negativa (-). A parede de células de bactérias Gram-positivas contém uma camada espessa (isto é, 20-50 nm) de peptidoglicano (PG), que está ligada a ácidos teicóicos que são únicos para a parede celular das Gram-positivas (Figura 4).

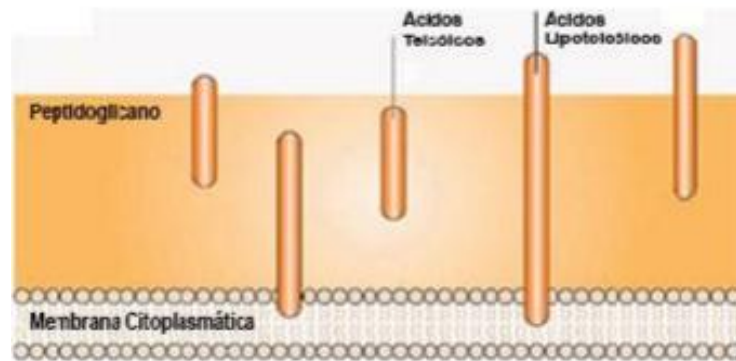


Figura 4: Estrutura celular das bactérias Gram-positivas. [27]

Em contrapartida, as paredes celulares das bactérias Gram-negativas são mais complexas, tanto estruturalmente como quimicamente. Mais especificamente, nas Gram-negativas, a parede da célula compreende uma camada fina de PG e contém uma membrana externa, que cobre a superfície da membrana.

A membrana externa das bactérias Gram-negativas, muitas vezes confere resistência a compostos hidrofóbicos, incluindo os detergentes e contém como um componente único, lipopolissacarídeos, que aumentam a carga negativa das membranas celulares e são essenciais para a integridade estrutural e a viabilidade das bactérias (Figura 5). [27]

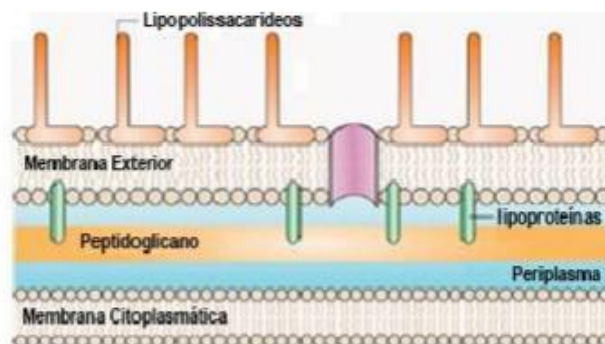


Figura 5: Estrutura celular das bactérias Gram-negativas. [27]

1.5 As bactérias na saúde

Nos últimos anos, um número crescente de surtos de doenças infecciosas têm surgido. Estas doenças infecciosas têm não só ocorrido em países em desenvolvimento com baixos níveis de higiene e saneamento, como também nos países desenvolvidos.

Os agentes patogénicos presentes nos alimentos e na água são os principais factores para o aparecimento dessas doenças, sendo que a sua transmissão coloca em perigo a saúde pública. O surto de doenças infecciosas emergentes é um encargo significativo para as economias globais e saúde pública.

Para além do surgimento destas doenças, outro problema têm-se vindo a verificar. A alta ocorrência de resistência por parte dos microorganismos diferentes, para a maioria dos agentes antimicrobianos, tem sido de alvo de grande atenção. A Organização Mundial de Saúde Animal, Alimentação e Agricultura e a Organização Mundial de Saúde, comentaram sobre a grave ameaça representada por organismos patogénicos resistentes aos antimicrobianos para saúde humana e animal. O uso extensivo de agentes antimicrobianos quimioterápicos levou à pressão selectiva para incentivar as taxas crescentes de resistência aos antimicrobianos. [30,31]

A resistência dos microorganismos aos antibióticos está a aumentar progressivamente, com relatórios que mostram que um grande número de agentes antimicrobianos reconhecidos existentes demonstraram resistência por uma espécie de microorganismo ou de outra, ou seja, não existe um único agente anti-microbiano disponível para uso humano e animal que não tenha demonstrado resistência por parte dos microorganismos. Este desenvolvimento obrigou os médicos a confiar em testes de susceptibilidade anti-microbiana *in vitro* para fins de diagnóstico. A este respeito, a síntese ou extracção de compostos, tais como nanopartículas com propriedades antimicrobianas é essencial, e tem aplicações potencialmente promissoras na luta contra o número crescente de microorganismos patogénicos resistentes aos antimicrobianos que representam uma ameaça contínua à saúde humana e animal. [32,33]

1.6 Mecanismo de acção das nanopartículas contra as bactérias

Os mecanismos exactos da toxicidade das nanopartículas contra as várias bactérias ainda não são completamente compreendidos. As NPs são capazes de aderir à membrana das bactérias por interacção electrostática e perturbar a integridade da membrana bacteriana. A nanotoxicidade é geralmente desencadeada pela indução de stress oxidativo, por formação de radicais livres, isto é, o ROS, após a administração de nanopartículas.

Os mecanismos de toxicidade das NPs dependem da composição, modificação da superfície, das propriedades intrínsecas, e das espécies bacterianas. Há muitos estudos publicados sobre os efeitos anti-bacterianos de várias NPs.

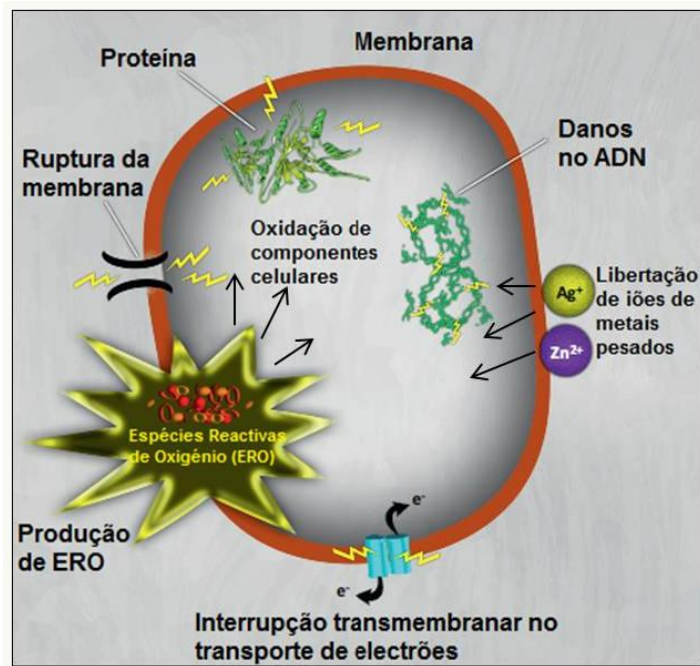


Figura 6: Mecanismos de toxicidade das nanopartículas (NPs) contra as bactérias. As NPs e os seus íões (por exemplo, prata e zinco) podem produzir radicais livres, resultando na indução do stress oxidativo (ou seja, espécies reactivas de oxigénio; ROS). AS ROS produzidas podem irreversivelmente danificar as bactérias (por exemplo, a membrana, o ADN e as mitocôndrias), resultando em morte bacteriana. [27]

Ainda assim, existem várias hipóteses de como as NPs actuam sobre as bactérias. No caso da prata, o ião prata e os compostos à base de prata são altamente tóxicos para os microorganismos, mostrando fortes efeitos biocidas contra dezasseis espécies de bactérias, incluindo *Escherichia coli*, e os fungos. O mecanismo de toxicidade de prata depende da interacção entre o metal e as membranas celulares.

Na membrana plasmática, a prata ou liga-se às proteínas ligadas à membrana ou na própria camada dupla de lípidos e desestabiliza a membrana, provocando fugas de íões e ruptura das células. Dentro da célula, a prata liga-se e interrompe a função das membranas mitocondriais, interferindo com a energia (ATP), obtendo-se as reacções da cadeia respiratória.

A prata também se pode ligar especificamente às enzimas celulares e ao ADN e interfere com as suas funções. Os íões de prata têm apenas uma utilidade limitada como agentes antimicrobianos, pois são necessárias grandes quantidades de íões de prata, que também são tóxicas para o hospedeiro. [27]

1.7 Toxicidade das Nanopartículas

A pele humana, os pulmões e o tracto gastro-intestinal estão em contacto constante com o meio ambiente. Embora a pele seja, em geral, uma barreira eficaz contra substâncias estranhas, os pulmões e o tracto gastro-intestinal são mais vulneráveis. Estas três formas são os pontos mais prováveis de entrada para as nanopartículas.

Devido ao seu pequeno tamanho, as nanopartículas podem deslocar-se a partir destes portais de entrada para o sistema circulatório e linfático, e, finalmente, para os tecidos e órgãos do corpo. Algumas nanopartículas, dependendo da sua composição e tamanho, pode produzir danos irreversíveis às células pelo stress oxidativo e/ou lesão dos organelos.

Nem todas as nanopartículas produzem estes efeitos adversos para a saúde - a toxicidade das nanopartículas depende de vários factores, incluindo: o tamanho, a agregação, a composição, a cristalinidade, a funcionalização da superfície, etc. Além disso, a toxicidade de qualquer nanopartícula num organismo é determinada pela genética do indivíduo, que fornece a caixa de ferramentas bioquímica através da qual o indivíduo se pode adaptar e lutar contra substâncias tóxicas. [34]

Técnicas de Caracterização

2.1 Espectroscopia de UltraVioleta-Visível

A espectroscopia de UV-Visível é uma técnica que se baseia na passagem de um feixe luminoso, com um comprimento de onda variável, que atravessa a amostra, dando origem a um espectro de absorção que relaciona absorvância em função do comprimento de onda.

As nanopartículas têm propriedades ópticas que são sensíveis ao tamanho, à forma, à concentração, ao estado de aglomeração, e índice de refração próximo da superfície das nanopartículas, o que torna a espectroscopia de UV-Visível, uma ferramenta valiosa para a identificação, caracterização e estudo destes materiais.

As nanopartículas feitas de certos metais, como ouro e prata, interagem fortemente com comprimentos de onda específicos de luz e as propriedades ópticas únicas destes materiais é a base para o campo de plasmónicas.

Neste trabalho, esta técnica permite retirar bastante informação. Com base no alargamento das bandas, podemos inferir sobre a distribuição de tamanhos das NPs. O máximo do pico de absorção fornece uma noção da concentração de NPs em solução. O comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvância, fornece informação sobre o tamanho das nanopartículas. [35,36]

2.2 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento é uma técnica muito aplicada para a obtenção de imagens da superfície das amostras, isto é, a sua morfologia.

O microscópio electrónico de varrimento é constituído por fonte de electrões, sistema de lentes, bobinas de varrimento, colector de electrões e por um tubo de raios catódico.

O princípio de funcionamento baseia-se na incidência de um feixe de electrões num ponto da superfície da amostra-alvo, e a subsequente recolha dos sinais electrónicos emitidos pelo material-alvo. As amostras são percorridas sequencialmente por um feixe de electrões acelerado por uma tensão que varia entre 0 e 40KV, finamente focado através de um sistema de lentes electromagnéticas. Da interacção do feixe electrónico com a amostra resulta a emissão de diversos tipos de radiação e electrões, entre os quais os electrões secundários (ES) utilizados na formulação da imagem da amostra (com energias inferiores a 50eV). Os electrões secundários são electrões da amostra que sofrem excitação e “escapando-se” da superfície. Os electrões

retrodifundidos (ER) permitem a distinção, na amostra em análise, de regiões de átomos leves e pesados.

Os electrões secundários têm origem nos processos de interacção não elástica dos electrões primários e retro difundidos com os electrões de maior energia de ligação.

A observação de imagens obtidas através da detecção de ES tem forte contraste topográfico, sendo o contraste uma consequência da emissão dos electrões retro - difundidos, cuja intensidade é crescente com o número atómico. O facto de os ES provirem de um volume de interacção pequeno torna possível a obtenção de excelentes imagens, possibilitando a observação do contraste topográfico.

Os electrões retrodifundidos identificam os electrões da superfície da amostra com energia elevada. A emissão de ER resulta de interacção elástica ou de perdas de energia. A utilização dos electrões retro difundidos permite a observação clara da rugosidade das amostras em estudo, devido ao efeito de sombra. Os ER não são afectados por efeitos locais de má condutividade dos materiais. Na análise destes electrões é necessário ter especial atenção à localização amostra/detector, pois deste posicionamento depende grande parte da qualidade referente ao contraste topográfico.

Devido ao facto de os ER serem provenientes de camadas profundas do material, a resolução das imagens obtidas tem grande dependência do feixe incidente e do número atómico médio local do material.

Este método de caracterização oferece uma excelente resolução e uma grande profundidade de campo. Assim, esta técnica foi utilizada com o intuito de estudar a morfologia e tamanho das NPs, presentes nas várias amostras.

O equipamento de SEM permite efectuar a medição aproximada das NPs mas, devido às reduzidas dimensões, este tipo de medição não é a mais adequada, no entanto, possibilita a determinação da existência de alguma tendência de aumento ou diminuição do tamanho das partículas bem como estudar a sua aglomeração. [37-40]

De modo a proceder-se à caracterização dos materiais utilizados na realização deste trabalho foi utilizado o equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB, ilustrado na Figura 7.



Figura 7: Equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB usado na caracterização dos materiais.

Este tipo de microscopia, pode ser acoplada com a espectroscopia de raios X por dispersão em energia.

2.3 Espectroscopia dispersiva de raios-X

A Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS) faz uso do espectro de raios-X emitidos por uma amostra sólida, bombardeada com um feixe de electrões, focado para se obter uma análise química localizada.

A análise qualitativa envolve a identificação das linhas do espectro e é relativamente simples devido à simplicidade do espectro de raios-X. A análise quantitativa (determinação das concentrações dos elementos presentes) envolve medir as intensidades de linha para cada elemento da amostra e para os mesmos elementos em padrões de calibração de composição conhecida. [41]

2.4 Difracção de raios-X

A difracção de raios-x (DRX) é uma técnica experimental, não destrutiva, muito importante na caracterização cristalográfica de sólidos. Os raios-x são difractados pelos átomos de diferentes planos de átomos de um cristal, separados pela distância d . Parte da radiação incidente é reflectida pelo primeiro plano de átomos, mas a restante radiação penetra na estrutura, sendo reflectida pelos restantes planos de átomos interiores. Os percursos percorridos pelos raios reflectidos pelos planos dos átomos interiores são superiores aos dos planos dos átomos exteriores. Sempre que a diferença de percurso entre os raios difractados ($2d\sin\theta$) se igualar a um múltiplo inteiro (n) do comprimento de onda (λ) da radiação incidente ocorre interferência construtiva, verificando-se a lei de Bragg:

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

Um espectro de difracção de raios-x típico consiste em uma sequência de picos caracterizados pelas suas posições, intensidades, larguras, etc.

Existem factores que promovem o alargamento dos padrões de difracção, nomeadamente: o tamanho de grão e as tensões uniformes e não uniformes.

A largura do pico de difracção é influenciada pelo número de átomos, ou seja, pelo volume do cristal. Quanto maior é o tamanho do grão maior é o alargamento do pico de difracção.

As tensões não uniformes, num cristal, originam deformações não homogéneas que variam ao longo do volume do material, originando o alargamento dos picos de difracção.

Tensões de compressão uniformes, na direcção paralela à superfície, originam uma diminuição do espaçamento d entre os planos, ocorrendo uma contracção da célula unitária, e

um deslocamento dos picos de difracção. [39,42] O aparelho usado na caracterização dos materiais deste estudo, X'Pert Pro da PANalytical, encontra-se ilustrado na figura 8.



Figura 8: Equipamento de difracção de raios-X X'Pert Pro da PANalytical usado na caracterização dos materiais.

2.5 Dispersão de luz dinâmica

A Dispersão de Luz Dinâmica (DLS) é uma técnica que usa a luz que interage com as partículas que se deslocam na solução e é dispersa, pelo que a sua frequência é alterada. Em geral, esta técnica é aplicada na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas num líquido. O movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão faz com que a luz seja espalhada com intensidades diferentes.

Assim, quanto menores as partículas, maior a mudança na frequência de luz. Este método é capaz de medir partículas desde alguns nanómetros a alguns micrómetros. Por conseguinte, é aplicável para a determinação do tamanho das nanopartículas. [43]

2.6 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma técnica de caracterização química que fornece informação sobre os grupos funcionais presentes no material. A radiação infravermelha pertence ao espectro de radiação electromagnética e corresponde à região de número de onda entre 10 000 e 100 cm^{-1} . O seu comprimento de onda é maior que o da luz visível.

A radiação infravermelha é absorvida pela molécula, causando alterações no estado vibracional das ligações covalentes. Esta absorção é quantificada, mas a alteração do estado vibracional provoca alteração dos estados rotacionais circundantes. Por esta razão o espectro obtido é apresentado em forma de bandas.

O princípio de funcionamento do FTIR está em determinar a atenuação que um feixe de radiação infravermelha sofre ao interagir com a amostra, em função da frequência, comprimento de onda, ou número de onda. O resultado é normalmente, um espectro de intensidade em função do número de onda, denominado espectro infravermelho.

O espectro infravermelho pode ser apresentado em função da transmitância ou da absorvância da amostra. Denomina-se transmitância (T_r) ao rácio entre a intensidade transmitida através da amostra (I_t) e a intensidade do feixe incidente (I_0). [39]

$$T_r = \frac{I_t}{I_0}$$

A absorvância (A) está relacionada com a transmitância segundo a Lei de Lambert-Beer:

$$A = -\log_{10}(T_r)$$

Este equipamento foi utilizado para caracterizar os substratos de papel utilizados neste trabalho.



Figura 9: Equipamento FTIR (Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation) utilizado na caracterização dos substratos.

2.7 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica é uma técnica analítica utilizada para determinar a estabilidade térmica de um material e a sua fracção de componentes voláteis por monitorização da alteração de peso que ocorre como uma amostra é aquecida. A medição é realizada

normalmente em ar ou numa atmosfera inerte, tal como hélio ou árgon, e o peso é registado como uma função do aumento da temperatura.

Assim, em termogravimetria um gráfico contínuo da variação da massa em função da temperatura é obtido, quando uma substância é aquecida a uma velocidade uniforme ou mantido a uma temperatura constante.

Um gráfico da variação da massa em função da temperatura (T) é referido como a curva de termogravimetria (curva TG). Para a curva de TG, geralmente traçasse a massa (m), diminuindo no eixo das ordenadas (y), e temperatura (T), aumentando para a direita no eixo das abcissas (x). A curva TG ajuda a revelar o grau de pureza das amostras analíticas e na determinação do modo das suas transformações dentro de determinado intervalo de temperatura.

Numa curva de TG de uma única fase de decomposição, existem duas temperaturas características: temperatura inicial (T_i) e a temperatura final (T_f). T_i é definida como a mais baixa temperatura à qual o início de uma mudança de massa pode ser detectado pelo equilíbrio térmico operando sob condições particulares e T_f como a temperatura final à qual a decomposição em particular parece ser completa.

A diferença $T_f - T_i$ é denominada como intervalo de reacção. Numa termogravimetria dinâmica, uma amostra é submetida ao aumento contínuo da temperatura geralmente linear com o tempo enquanto que, numa termogravimetria estática, a amostra é mantida a uma temperatura constante, durante um período de tempo durante o qual qualquer alteração na massa é anotada. [44]

Neste trabalho usou-se o equipamento *Simultaneous Thermal Analyzer, Netzsch* (TG-DSC - STA 449 F3 Jupiter) para medir TG para caracterizar a decomposição e a estabilidade térmica dos substratos de papel impregnados em diversas condições. A análise foi feita sob atmosfera do ar até 550°C com 5°C/min.

Materiais e Métodos Experimentais

3.1) Materiais

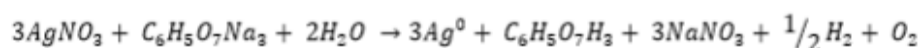
Na realização desta dissertação foram utilizados quatro substratos de papel diferentes, de modo a podemos comparar qual deles é o mais eficaz no que diz respeito a actividade anti-microbiana. Assim, os substratos de papel utilizados foram: (i) saco de refeições de take-away, (ii) caixa de cartão de cereais (DIA, S.A.), (iii) papel de mesa de restauração e (iv) papel de talheres.

A impregnação destes substratos foi feita com diferentes tipos de nanopartículas, nomadamente: (i) prata (nanopartículas sintetizadas); (ii) cobre (*Sigma-Aldrich*; 40-60nm); (iii) óxido de zinco (*PlasmaChem*; ZnO-nanopowder, Ca. 14 nm) e (iv) óxido de tungsténio (*Sigma-Aldrich*, >100nm), sendo estas três últimas, nanopartículas comerciais.

Os testes realizados incluem nanopartículas tanto comerciais como sintetizadas, de modo a serem feitas comparações no que diz respeito a sua morfologia, tamanho e, mais importante, actividade antibacteriana.

3.1.1) Síntese das nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata foram sintetizadas com base na utilização de um agente redutor capaz de reduzir prata sólida a prata iónica ($Ag^+ \rightarrow Ag^0$). Neste estudo, o agente redutor empregue, foi o citrato de sódio, e as nanopartículas formam-se de acordo com a seguinte reacção:



Assim, foram preparadas quatro soluções distintas: (i) três soluções de nitrato de prata (*Roth*, > 99%, CAS: 7761-88-8) cuja concentração variou entre 1, 2 e 10mM e cujo volume de água adicionado foi de 50ml e (ii) uma solução de citrato de sódio (*Roth*, > 99%, CAS: 6132-04-3) de concentração igual a 0.03 M onde se dissolveram 0,50 g de citrato de sódio em 50 ml de água.

As soluções de nitrato de prata foram colocadas em aquecimento com refluxo e sob agitação vigorosa e constante. A solução foi aquecida até à ebulição, adicionou-se, gota a gota, 5 ml da solução de citrato de sódio, até haver uma mudança de cor para amarelo. Aquando desta mudança, o sistema de aquecimento foi removido e a solução foi deixada arrefecer à temperatura ambiente. [45]

3.1.1) Dispersão das nanopartículas comerciais

O objectivo destes testes é averiguar qual o melhor método para a dispersão das nanopartículas em pó comercializadas, que irão ser usadas para posteriores testes antibacterianos. Para tal recorreu-se ao sonicador de ponta (*HIELSHER M80, UP400S*) e ao ultrassons (*Banho Ultra Sons Sonica, modelo 3200 EP S3*).

Para posterior análise dos resultados obtidos, o factor utilizado para aferir sobre qual o melhor método para dispersar as nanopartículas comerciais utilizadas nesta dissertação, é tempo.

3.2) Corte dos substratos de papel

Recorrendo a uma impressora a laser, própria para cortar papel, os substratos a ser testados neste trabalho, foram cortados em círculos de 6mm de diâmetro, pois esta é a dimensão standard dos discos antimicrobianos comercializados.

Uma vez que o papel é cortado pelo laser, as suas extremidades ficam sempre queimadas. No entanto, é possível minimizar este efeito, tendo em conta a manipulação dos três parâmetros, desta impressora: (i) potência, (ii) velocidade e (iii) resolução.

Por norma, a resolução não sofre alterações, sendo sempre mantido a 500. A chave para se obter o corte desejado com o mínimo de danos nos rebordos dos papéis, é alcançar o equilíbrio entre a potência e a velocidade. Uma maior potência irá queimar mais o papel aquando da realização do corte mas se aumentarmos a velocidade, o corte é feito de forma mais acelerada.

Uma vez que a espessura não é a mesma várias combinações de potências e velocidades foram testadas, de modo a otimizar os parâmetros de corte, para cada substrato.



Figura 10: Impressora a laser utilizada para cortar os vários substratos de papel

3.3) Impregnação dos substratos de papel

Na impregnação dos vários tipos de substratos recorreu-se à técnica de pulverização com volume e pressão constantes de 14ml e 1bar, respectivamente. Deste modo, foram feitas no total 8 deposições em cada um dos substratos estudados.

Os papéis impregnados, foram cortados em quadrados com dimensões 7 x 7 cm.

Esta técnica consiste na utilização de pistola de spray, que permite uma deposição homogénea da solução de nanopartículas nos substratos utilizados neste estudo. As duas variantes desta técnica, são: (i) o volume de solução a depositar e (ii) a pressão utilizada na deposição.

Para tal, cada um destes substratos foi impregnado com nanopartículas tanto comerciais, óxido de zinco, cobre e óxido de tungsténio, como nanopartículas sintetizadas, prata.

3.4) Secagem dos substratos de papel

Entre cada impregnação, foi necessário proceder a secagem dos substratos de papel. Para tal, utilizou-se a estufa, *EHRET-TK 4067* furnace (figura 11). Esta foi mantida à temperatura de 100°C. Esta técnica traz vantagens em relação a outras, como por exemplo, secagem numa placa de aquecimento, uma vez que não há oscilações da temperatura permitindo uma secagem mais rápida e homogénea.



Figura 11: Estufa EHRET-TK 4067 furnace

3.5) Testes anti-bacterianos

A realização destes testes contou com a colaboração da Professora Paula Duarte do Departamento de Ciência e Tecnologia da Biomassa.

De modo a definirmos as concentrações das soluções de nanopartículas, recorreu-se à técnica DLS, explicada no capítulo 2.

No caso das nanopartículas comerciais, uma vez tendo conhecimento do tamanho esperado para as mesmas, variou-se a concentração entre 0,5; 1; 2; 5 e 10mM.

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a até 2mM os tamanhos das nanopartículas encontram-se dentro do tamanho descrito pelo fabricante. Para 5 e 10mM, os tamanhos são superiores ao esperado, pois como no mesmo volume, a quantidade de nanopartículas é superior, elas tendem a agregar. Assim, aquando da medição, o aparelho de DLS calcula o tamanho não de uma, mas de um conjunto de nanopartículas.

Deste modo, realizaram-se dispersões das nanopartículas comerciais com 2 e 10mM. A síntese das nanopartículas de prata também foi efectuada nestas condições.

Uma vez impregnados os substratos de papel com as respectivas soluções e concentrações, seguiu-se a realização dos testes anti-bacterianos.

3.5.1) Procedimento utilizado na realização dos testes antimicrobianos

O método por difusão em agar é uma forma simples e rápida de verificar a sensibilidade dos microrganismos a agentes antimicrobianos (anti-bacterianos e/ou antifúngicos). Estes testes relacionam o tamanho da zona de inibição do crescimento com a dose da substância ensaiada e são mais comumente empregados para determinação de antibióticos.

O método de difusão em agar emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de mono ou bicamada, através do qual a substância-teste se difunde. Na superfície da placa inoculada é colocado um disco com o agente a testar. Se este agente for antimicrobiano então o microrganismo inoculado não crescerá numa área concêntrica à volta do mesmo, se aí existirem concentrações do antimicrobiano iguais ou superiores à concentração inibitória mínima. A zona de inibição de crescimento à volta do disco (halo de inibição), terá maior ou menor dimensão conforme a sensibilidade do microrganismo ao agente a testar, também podendo interferir na dimensão do halo factores como propriedades físico-químicas do antimicrobiano, velocidade e taxa de difusão, composição ou espessura do meio de cultura. Este método apenas permite uma informação qualitativa quanto à sensibilidade dos microrganismos (sensível, intermédio ou resistente) [46].

A actividade antimicrobiana foi estudada testando a sensibilidade aos substratos de papel de três bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (RN4220) e *Enterococcus faecalis* (ATCC29212); de duas bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) e ainda a uma levedura *Candida albicans* (ATCC10231). Todas as estirpes foram gentilmente cedidas pela Empresa Elisa Câmara Lda à excepção do *S. aureus* (MRSA) que foi gentilmente cedido pelo Departamento de Ciências da Vida da FCT/UNL.

Todos os procedimentos foram realizados em condições de esterilidade em câmara de fluxo laminar. Todo o material e meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C, durante 15 minutos.

As estirpes bacterianas utilizadas nos ensaios cresceram em meio Mueller-Hinton Broth (Biokar Diagnostics) em incubadora orbital, a 37°C e 210 rpm, tendo a densidade celular sido ajustada a 1×10^8 UFC/mL com meio Mueller-Hinton Broth antes do início do ensaio. No caso da levedura o crescimento foi efectuado a 30°C tendo a densidade celular sido ajustada a 1×10^7 UFC/mL.

Para a realização dos ensaios de actividade antimicrobiana prepararam-se placas de Petri contendo 20 mL de agar Mueller-Hinton (Biokar Diagnostics). Estas placas foram inoculadas com 100 µL de cada uma das suspensões microbianas preparadas como descrito no parágrafo anterior. A inoculação das placas foi efectuada por incorporação em agar de superfície. Assim, os 100 µL das várias culturas foram adicionados a tubos de vidro contendo 2 mL de meio Mueller-Hinton Broth suplementando com agar (Becton Dickinson) numa concentração de 0,6% (p/v), previamente fundido a 100 °C e mantido líquido em banho a 45°C. O conteúdo dos tubos foi então espalhado de forma perfeitamente uniforme pela superfície das placas.

Após o agar de superfície ter solidificado colocaram-se os discos correspondentes aos vários substratos de papel a testar impregnados com as nanopartículas, não impregnados ou impregnados com uma suspensão de nitrato de potássio e citrato de sódio para garantir que a actividade antimicrobiana não era devida a nenhum dos reagentes utilizados na síntese das nanopartículas (Figura 12). As placas foram colocadas no frigorífico durante meia hora, para garantir a difusão completa dos compostos com actividade antimicrobiana e, em seguida, foram a incubar em estufa a 37°C durante 24 horas, no caso das bactérias, ou a 30°C durante 48 horas, no caso da levedura. Todos os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes e sempre a partir de inóculos diferentes. A actividade antimicrobiana foi determinada através da medição, efectuada com o auxílio de uma régua, do diâmetro dos halos de inibição desenvolvidos em redor dos vários discos aplicados.



Figura 12: Colocação dos discos de papel contendo nanopartículas, nas placas de petri contendo as suspensões bacterianas.

Inicialmente foram realizados testes, aplicando apenas discos de cartão com 10 mM de AgNPs em placas de Petri não inoculadas, de modo a aferir a esterilidade dos substratos. Após a incubação, verificou-se a presença de crescimento microbiano, em torno dos discos de papel. Deste modo, procedeu-se a esterilização de todos os substratos, por exposição à radiação ultravioleta, durante uma hora (30 minutos de cada lado), na câmara de fluxo laminar (Figura 13).

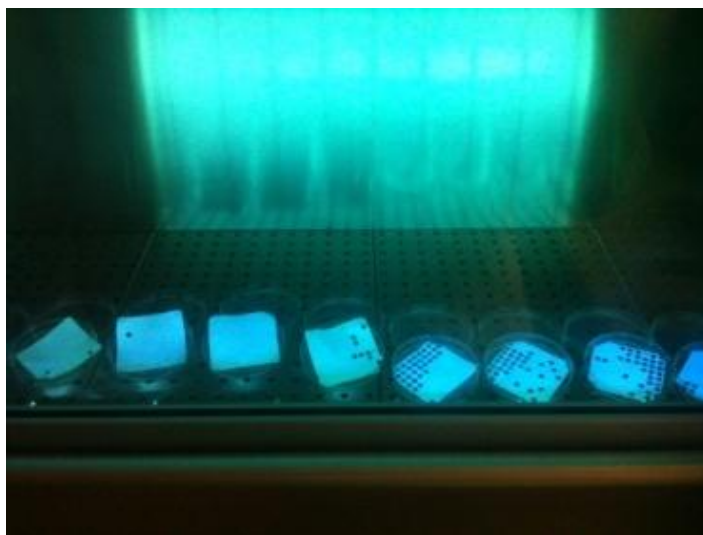


Figura 13: Esterilização dos substratos de papel, durante uma hora, sob radiação ultra-violeta.

Resultados e Discussão

4.1) Caracterização dos substratos de papel

O trabalho baseia-se na funcionalização de diferentes substratos de papel com diferentes tipos de nanopartículas. O objectivo principal consiste em conferir novas funcionalidades ao papel, nomeadamente, actividade antibacteriana, transformando estes substratos passivos em embalagens activas com possível aplicação a nível industrial.

Os substratos utilizados estão relacionados com a indústria alimentar, nomeadamente, o papel de mesa, papel de talheres, cartão de caixas de cereais e saco de refeições de take-away. Todos estes substratos são embalagens secundárias, ou seja, embalagens que não estão em contacto directo com os alimentos. Isto é factor importante pois é possível, através deste estudo, garantir uma maior esterilização dos alimentos que consumimos sem comprometer a saúde pública, uma vez que, os estudos sobre a toxicidade dos metais pesados são ainda rudimentares.

Por observação dos papéis, verifica-se que estes variam entre si em vários aspectos como na espessura, cor, textura, pelo que o tipo e a quantidade de fibras entre eles também serão diferentes. Isto porque o processo de fabrico de cada substrato de papel difere consoante a sua aplicação que é também distinta entre eles.

4.1.1) Microscopia óptica

Como já mencionado anteriormente, os substratos a serem utilizados, diferem entre si em termos de aspecto e espessura, como mostram as Figuras 14 e 15.

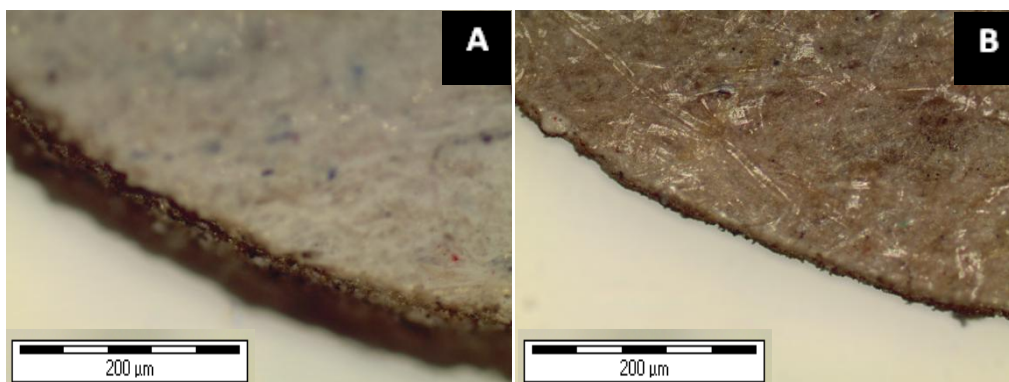


Figura 14: Observação microscopia do cartão (A) e do saco de refeições take-away (B).

Olhando para a Figura 14 vemos que ambos os papéis apresentam uma coloração acastanhada devido ao facto de serem ambos papéis reciclados. Enquanto que o cartão aparenta possuir uma morfologia granular, no saco de refeições de take-away são visíveis algumas fibras de aparência cilíndrica.

Para além da morfologia, estes dois substratos também se diferenciam pela sua espessura, sendo visível que o cartão é mais espesso que o saco de refeições de take-away.

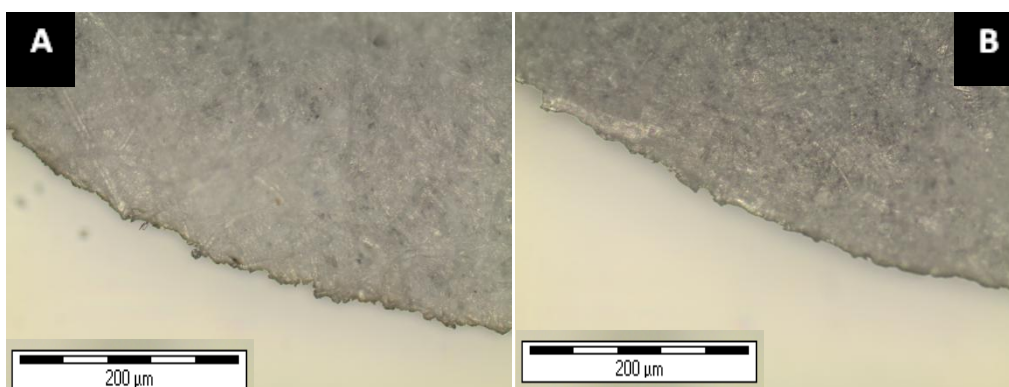


Figura 15: Observação microscópica do papel de mesa (A) e do papel de talheres (B).

Já no caso dos papéis “brancos”, estes são semelhantes tanto na espessura como na sua aparência. Através desta técnica não se pode aferir muito sobre a possível geometria das fibras que os constituem.

Deste modo, para cada substrato, fizeram-se vários ensaios, de modo a acertar os parâmetros de corte para cada um. O objectivo é minimizar danos nas extremidades do papel que possam interferir com os testes de actividade anti-bacteriana. Desta forma, recorreremos ao microscópio óptico para observar estas extremidades, e definir quais os parâmetros de velocidade e potência a utilizar em diante para cada substrato. A título de exemplo, apenas se apresentam de seguida, os resultados referentes ao saco de refeições de take-away (Figura 16).

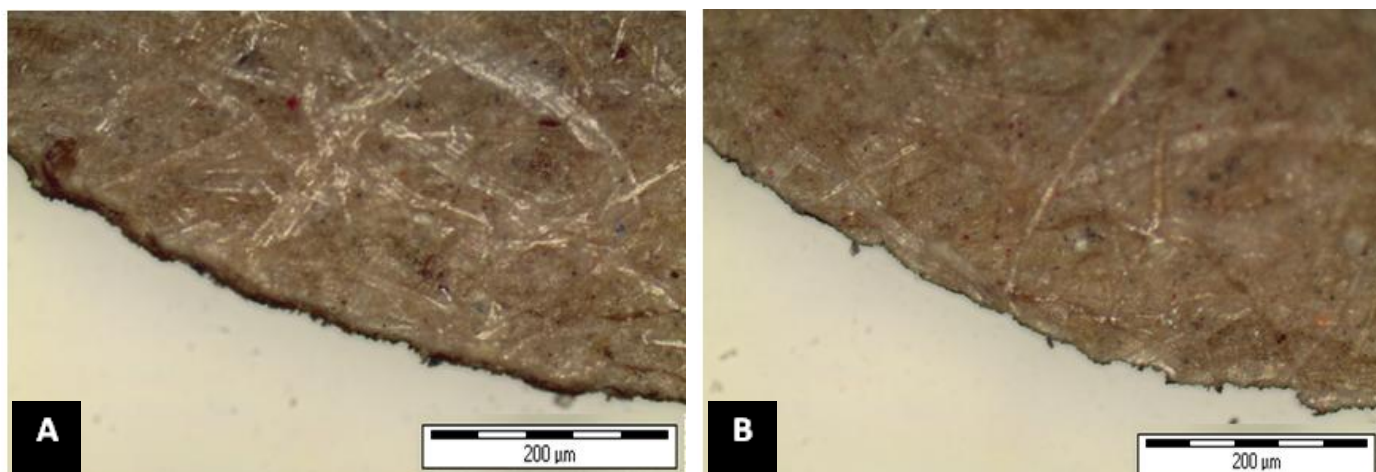


Figura 16: Observação microscópica do saco de papel de refeições de take-away. A) Parâmetros: P=15, S=100 e R=500. B) Parâmetros: P=5, S=100 e R=500.

Pegando no exemplo do saco de refeições de take-away, é visível que mantendo a velocidade ($S=100$) constante para ambos os ensaios, que uma diminuição da potência de 15 (figura 16 A) para 5 (Figura 16 B)) é acompanhada de uma extremidade menos queimada.

Desta forma, por comparação, para cada substrato, dos vários ensaios feitos, foi possível estabelecer os parâmetros de corte ideais para cada um destes papéis, como mostra a Tabela 1:

Tabela 1: Parâmetros ideais de corte para cada um dos substratos:

Substrato	Potência	Velocidade	Resolução
Saco de refeições de take-away	5	100	500
Cartão de Cereais	40	100	500
Papel de Mesa	2	100	500
Papel de Talheres	3	100	500

4.1.2) Microscopia electrónica de varrimento

A Microscopia Electrónica de Varrimento é uma técnica muito aplicada para a obtenção de imagens da superfície das amostras, isto é, a sua morfologia à nanoescala. Deste modo, aplicou-se esta técnica para a observação do tipo e da quantidade de fibras que constituem os diferentes substratos de papel. Nas figuras Figura 17, Figura 18, Figura 19 e Figura 20 podem-se observar as imagens obtidas por SEM dos diferentes substratos.

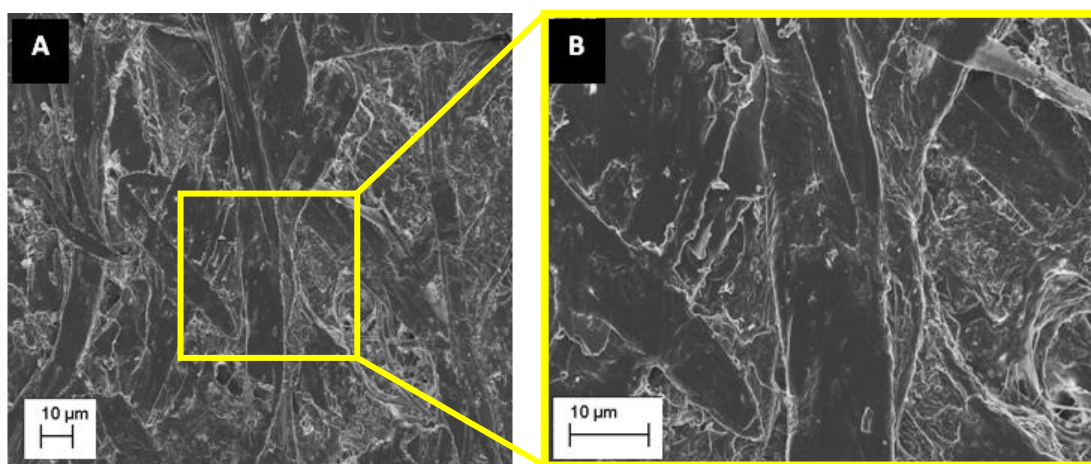


Figura 17: Imagens obtidas por SEM do saco de papel de refeições de take-away.

Através das imagens SEM podemos concluir que todos os papéis, são constituídos por uma malha tridimensional de fibras, muito provavelmente de celulose.

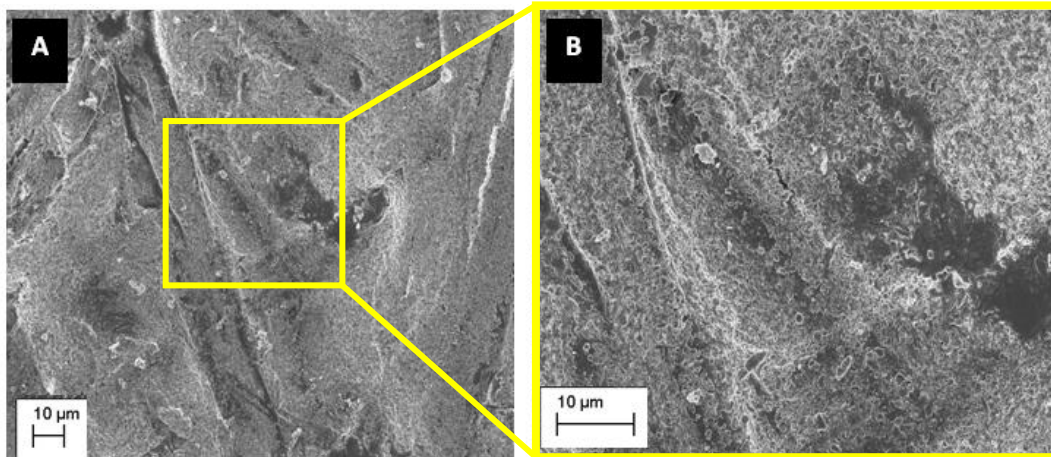


Figura 18: Imagens obtidas por SEM do cartão.

Todos os papéis apresentam um emaranhado de fibras, morfologia irregular e formam uma estrutura porosa semelhante (Figura 17, Figura 19 e Figura 20), diferenciada na geometria das fibras.

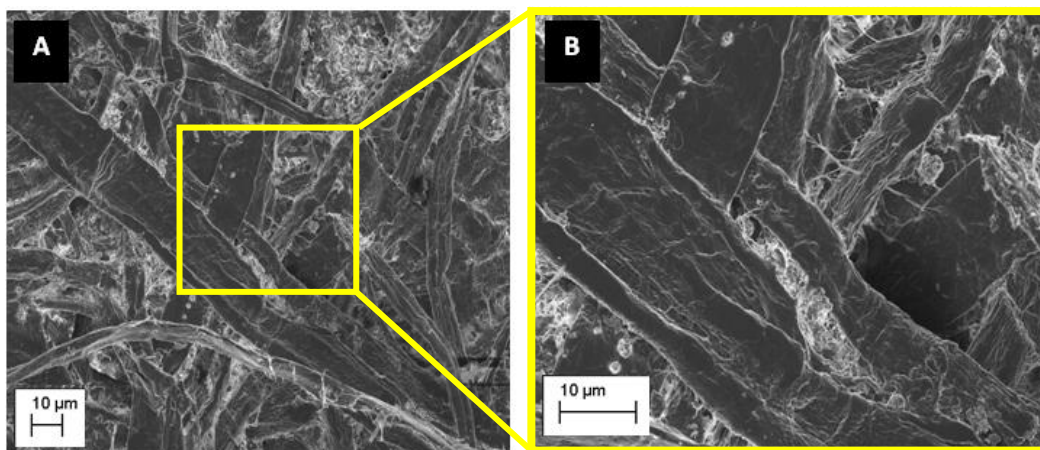


Figura 19: Imagens obtidas por SEM do papel de mesa.

Olhando para o saco de refeições de take-away, verifica-se que o substrato apresenta fibras com uma geometria cilíndrica enquanto as fibras que constituem o papel de mesa e de talheres, apresentam uma geometria mais achatada (Figura 19 e Figura 20 B). Isto contribui para um aumento da porosidade e da espessura do papel.

Este facto é corroborado, pelo facto do papel de mesa apresentar uma maior quantidade de zonas profundas (mais escuras que as regiões superficiais).

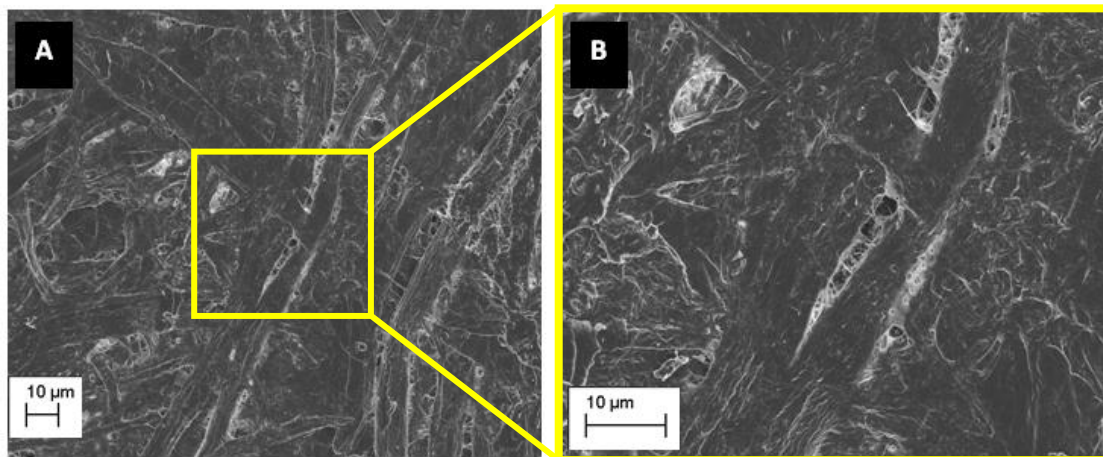
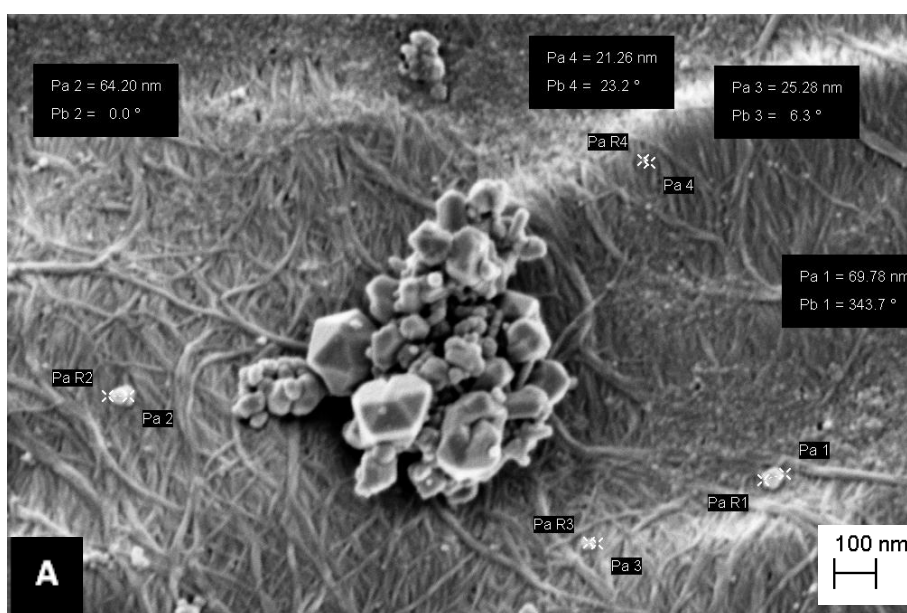


Figura 20: Imagens obtidas por SEM do papel de talheres.

Por sua vez, o cartão (Figura 18) apresenta uma morfologia de superfície mais homogênea, não sendo possível distinguir nenhum tipo de rede fibrosa. Ao invés, apresenta uma superfície repleta de poros, aparentando uma porosidade bastante elevada.

Como já mencionado, devido a contaminações presentes nos substratos de papel, estes foram expostos 1h à luz ultravioleta de modo a eliminar qualquer tipo de bactérias existente. No entanto, esta exposição foi feita já com as nanopartículas impregnadas no papel pelo que se torna imperativo saber se os raios UV afectam as nanopartículas no que diz respeito ao seu tamanho, forma e quantidade impregnada. Assim, utilizando SEM, obteve-se imagens do papel de mesa impregnado com 10mM de prata, antes e após o tratamento com raios UV, de modo a verificar se, existe alteração nas NPs.

Os resultados que se seguem dizem respeito ao papel de mesa e de talheres contendo prata com uma concentração de 10mM. Os resultados para o cartão não se encontram presentes pois não foi possível visualizar os tamanhos das NPs presentes (Figura 21).



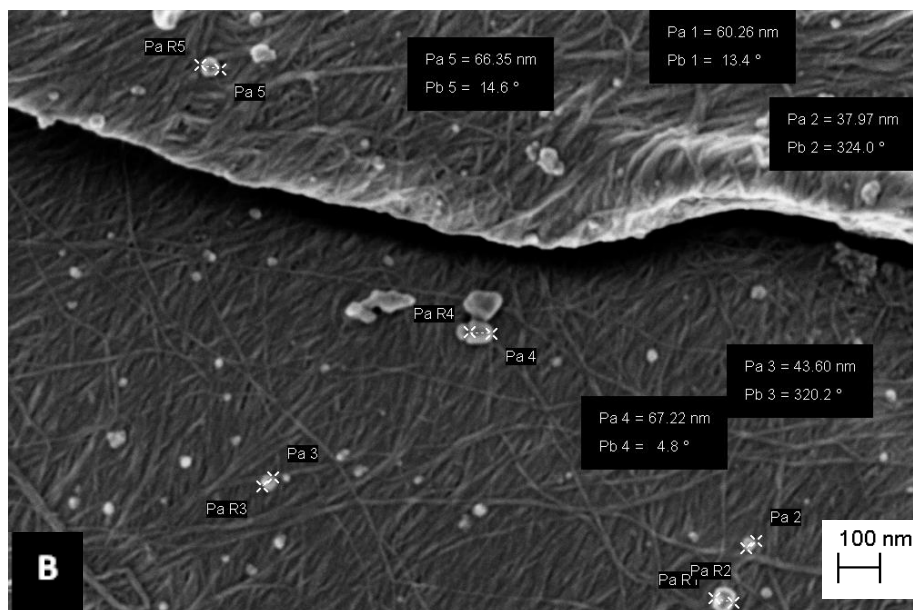
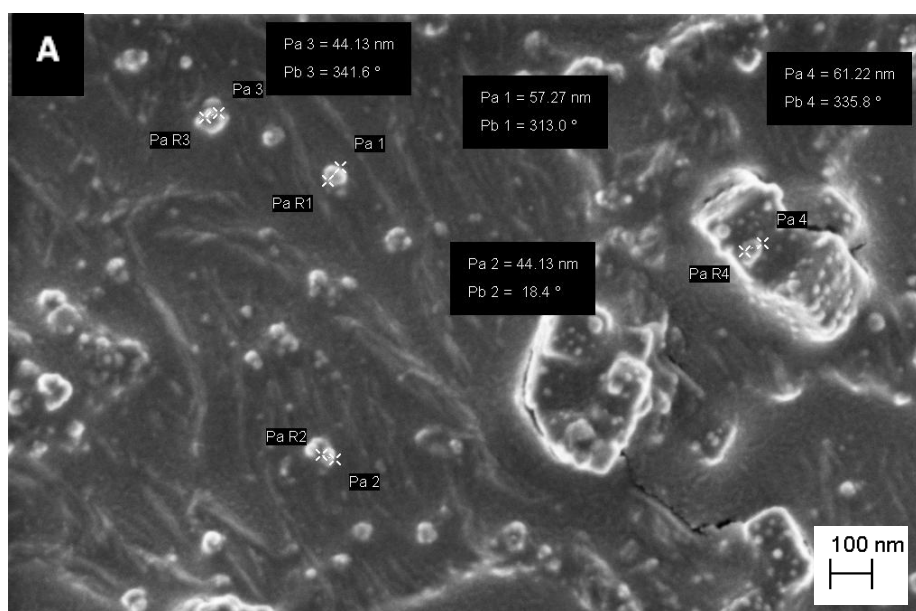


Figura 21: Imagens obtidas por SEM do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de prata; A) Antes da exposição aos raios UV; B) depois da exposição aos raios UV.

Podemos observar que apesar do tratamento por exposição aos raios UV, os tamanhos das nanopartículas pouco variam. O formato das nanopartículas antes do UV varia desde octaedros, a nanorods e esferas. O mesmo não se verifica na amostra após o tratamento por acção dos UV. Pode dever-se ao facto da zona observada não ser exactamente a mesma.



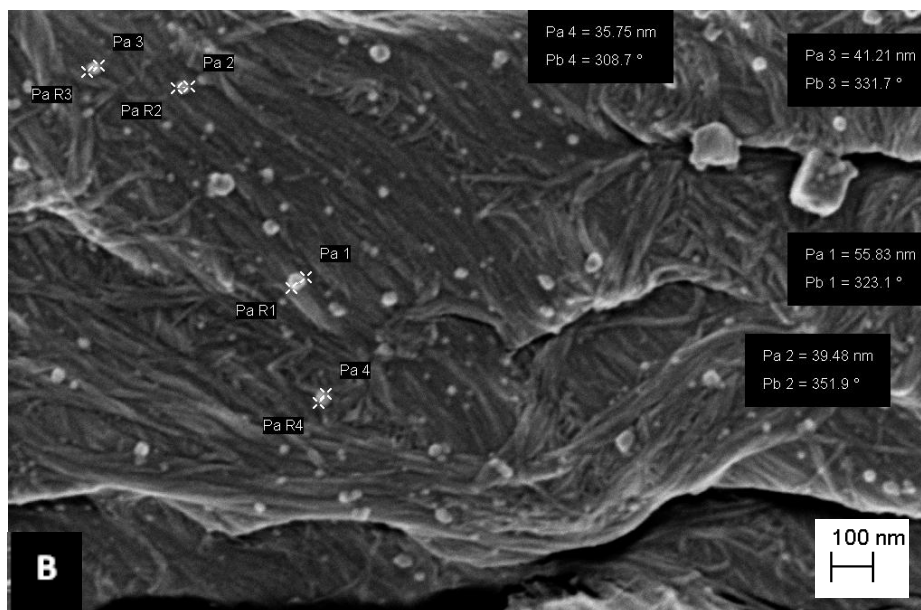


Figura 22: Imagens obtidas por SEM do papel de talheres contendo 10mM de nanopartículas de prata; A) Antes da exposição aos raios UV; B) depois da exposição aos raios UV.

Também para o papel de talheres, verifica-se o mesmo, ou seja, o tamanho e morfologia das nanopartículas permanece praticamente inalterado antes e após dos UV.

4.1.3) Espectroscopia dispersiva de raios-X

Como descrito no Capítulo 2, a EDS fornece uma análise química elementar das amostras em estudo. É uma ferramenta do SEM que utiliza o feixe de electrões para excitar a amostra, levando à produção de radiação secundária específica e característica do elemento.

É importante referir que apenas o espectro do cartão será apresentando como exemplo, uma vez que os restantes substratos são semelhantes em constituição, como mostrado na Figura 23.

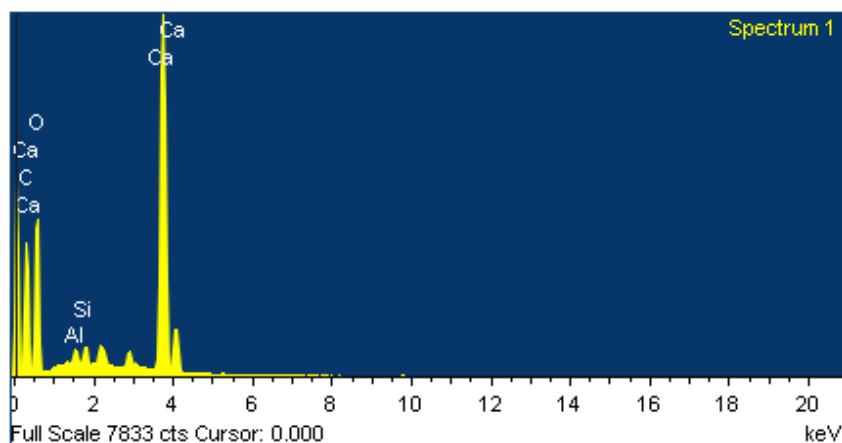


Figura 23: Espectro de EDS do cartão.

Assim, analisando o espectro de EDS obtido, verifica-se a presença, em quantidades elevadas, de carbono e de oxigênio. Isto está de acordo com o facto deste, bem como dos restantes substratos, ser constituído por fibras de celulose, que é um polissacarídeo, polímero de glucose.

No entanto, verifica-se que o cartão, por se tratar de um papel reciclado, apresenta maior variedade de elementos. A presença de alumínio e silício, leva a crer que a este substrato seja adicionado o composto Kaolinite, que é utilizado para melhorar a aparência do papel, o qual é caracterizado pelo brilho, suavidade, brilho e opacidade, e de maior relevância, melhora a capacidade de impressão.

A detecção de cálcio, também indica a presença de um outro aditivo, o carbonato de cálcio, aquando do fabrico do papel.

4.1.4) Difraccção de raios-X

Os quatro substratos de papel utilizados nesta experiência foram analisados pela técnica de difraccção de raios-X de modo a identificarmos os picos de cada difractograma, e percebendo a estrutura cristalina de cada um, como evidencia a Figura 24.

Ao observarmos os diferentes difractogramas, verifica-se que o papel de talheres apresenta apenas vários picos distintos, contrariamente aos restantes. No entanto, estes quatro picos cristalinos, são comuns a todos os outros substratos. Quatro deles, são característicos da estrutura cristalina da celulose do tipo I: $14,8^\circ$, $16,4^\circ$; $22,6^\circ$ e $34,4^\circ$. Ao pico formado entre os ângulos $14,8^\circ$ e $16,5^\circ$ são atribuídos o plano cristalográfico (101).

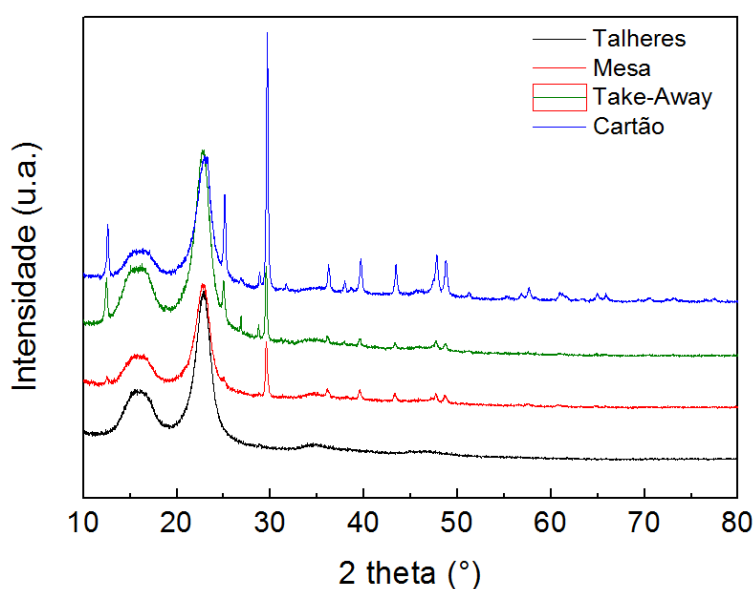


Figura 24: Difractograma obtido por Raios-X dos substratos de papel utilizados nesta experiência.

A razão pela qual este pico engloba dois ângulos distintos, está relacionado com o facto das fibras de celulose conterem elevadas quantidades de materiais amorfos, como a lenhina e a hemicelulose, estes dois picos fundem-se, aparecendo como um único pico largo. Este fenómeno pode ser observado tanto nos difractogramas do papel branco como nos difractogramas do papel reciclado.

Os ângulos 22,6° e 34,4° correspondem aos planos (002) e (004) ou (032), respectivamente.

Também presente em todos os papéis acima representados, excepto no papel de talheres, é o composto carbonato de cálcio (calcite - CaCO_3), cujos picos aparecem a um ângulo de 29,47°, 39,5°, 46,7° e 48,6°, correspondentes aos planos cristalográficos (104), (113), (018) e (116), respectivamente.

Este composto é um aditivo comum no fabrico do papel, uma vez que melhora as propriedades de opacidade e brilho do papel, através da formação de aglomerados leves e porosos.

Para além destes compostos, existe um outro composto conhecido como Kaolinite, que é, comum aos papéis reciclados (saco de refeições de take-away e cartão). Este composto apresenta picos para os ângulos: 12,40°; 23,11° e 24,94°, que correspondem aos planos cristalográficos (001), (10-1) e (002), respectivamente. Este composto, cuja fórmula química é $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tal como a calcite, é adicionado no fabrico do papel com o objectivo de aumentar a sua opacidade.

No entanto, o pico a 23,11° é visível para os quatro substratos diferentes, pelo que a Kaolinite está presente em todos os substratos de papel estudados.

Estes resultados estão de acordo com a análise EDS, no que diz respeito ao papel reciclado. Neste substrato foram identificados por EDS elementos que correspondem à estrutura química da Kaolinite, tais como o alumínio e silício, e cálcio, constituinte do carbonato de cálcio. O carbono e o oxigénio, os outros constituintes da calcite foram também identificados, mas como são os principais elementos que constituem a molécula de celulose, a sua associação ao carbonato de cálcio não pode ser concluída com base na análise elementar.

A análise EDS ao papel branco revela os mesmos elementos, que corresponde à identificação obtida por XRD, na qual foi identificada a estrutura cristalina da Kaolinite.

Através dos difractogramas podemos calcular o índice de cristalinidade dos vários substratos, recorrendo à equação descrita pelo método empírico de Segal:

$$ICr (\%) = \frac{I_{(002)} - I_{(am)}}{I_{(002)}} \times 100$$

Onde $I_{(002)}$ é o valor da intensidade máxima do pico observado para o ângulo $2\theta = 22,6^\circ$, que representa a componente cristalina dos substratos em estudo; $I_{(am)}$ é o valor da intensidade de difracção verificada a um ângulo $2\theta = 18^\circ$, que representa a componente amorfa dos papéis em estudo.

Na Tabela 2, encontram-se os valores do índice de cristalinidade calculados para os diferentes substratos.

Tabela 2: Índice de cristalinidade dos diferentes substratos de papel

Substrato	Cartão	Papel de Mesa	Papel de Talheres	Saco de refeições de take-away
Índice de Cristalinidade (%)	70,9	72,6	79,1	72,0

O índice de cristalinidade relaciona a componente cristalina e amorfa da celulose presente na amostra de papel.

Observando os resultados obtidos, verifica-se que os papéis reciclados (cartão e saco de refeições de take-away) são os que apresentam um menor índice de cristalinidade, enquanto que o papel de talheres é o que apresenta um valor maior.

Por vezes, durante o fabrico do papel, os tratamentos mecânicos e químicos são empregues na purificação das fibras de celulose e eliminação de materiais amorfos (lenhina e hemicelulose). Estes processos podem causar mudanças na estrutura das fibras convertendo a celulose tipo I em tipo II. Esta transformação irá causar uma alteração das ligações de hidrogénio. Apesar da estrutura de celulose de tipo II ser termodinamicamente mais estável, o seu índice de cristalinidade é inferior ao da celulose do tipo I.

Apesar de os valores apresentarem ligeiras diferenças entre si, podemos afirmar que todos os substratos, são constituídos maioritariamente por celulose tipo I, como verificamos pelos difractogramas obtidos por DRX. Estas diferenças podem dever-se aos processos de fabrico empregues em cada substrato.

No caso do óxido de zinco, nos difractogramas obtidos para os quatro substratos estudados, apenas é visíveis os picos referentes ao óxido de zinco num dos papéis, nomeadamente no papel de talheres.

4.2) Testes de dispersão das nanopartículas comerciais

No que diz respeito aos testes de dispersão efectuados nas soluções contendo nanopartículas comerciais concluiu-se que o ultrassons é o método mais eficaz nesta dispersão. Isto porque o tempo de dispersão utilizando o sonicador de ponta é muito superior em comparação com o ultrassons. Isto pode dever-se a vários motivos, um deles, a presença de um atenuador na montagem do aparelho que faz com que seja necessário mais tempo para dispersar certas soluções.

Outro factor que pode contribuir para uma performance menos eficaz por parte do sonicador de ponta, é a ausência de agitação. Deste modo, assim que a sonicação começa, as partículas são empurradas para as extremidades dificultando a dispersão.

Uma vez escolhido o método de dispersão, ultrassons, estudou-se a agregação das nanopartículas com o aumento da concentração de modo a podermos trabalhar com as nanopartículas usando a concentração máxima à qual o seu tamanho ainda é o indicado pelo fabricante. Para tal, variou-se a concentração entre 0,5; 1; 2; 5 e 10mM e realizaram-se medições utilizando a técnica de DLS (capítulo 2). Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 25.

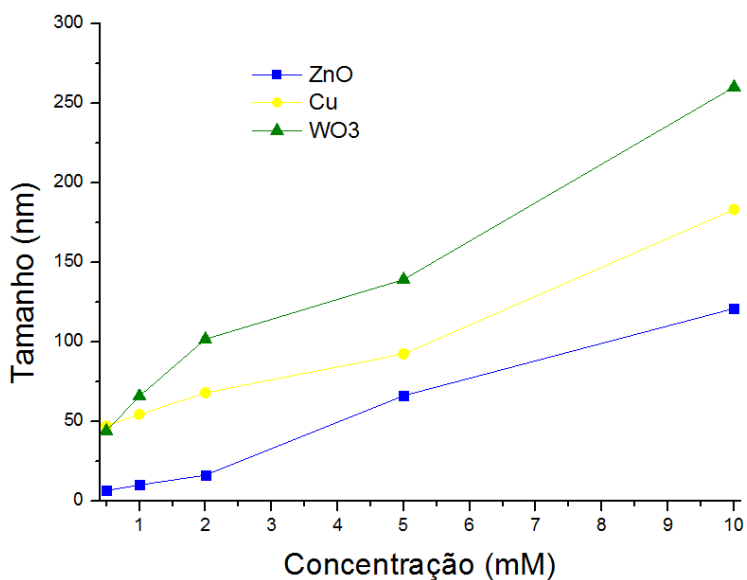


Figura 25: Medidas de DLS dos testes de dispersão para as das nanopartículas de óxido de zinco, cobre e óxido de tungstênio.

Por observação do gráfico, é visível que um aumento da concentração se traduz num aumento do tamanho das nanopartículas. Este resultado é esperado, uma vez que para o mesmo volume, a quantidade de partículas presente aumenta, causando a sua agregação. Esta aglomeração é agravada pela ausência de um estabilizador.

4.3) Caracterização dos diferentes tipos de nanopartículas

Na impregnação dos vários substratos de papel, foram utilizadas nanopartículas de prata (sintetizadas), cobre, óxido de zinco e óxido de tungstênio (comerciais). A sua caracterização foi feita com recorrência a várias técnicas anteriormente mencionadas tais como; espectrofotometria de UV-visível, SEM, EDS e DRX.

4.3.1) Nanopartículas de óxido de zinco

No estudo efectuado com as nanopartículas de óxido de zinco, utilizaram-se nanopartículas comerciais; ZnONPs em pó. Em seguida, apresentam-se as várias caracterizações (morfológica, composicional e estrutural) destas nanopartículas comerciais.

4.3.1.1) Espectrofotometria de UV-Visível

O espectro de absorvância das nanopartículas de óxido de zinco comerciais dispersas em água foi obtido para valores de comprimento de onda no intervalo de 200 - 800 nm, como mostra a Figura 26. A concentração de ZnONPs foi variada entre 0,5, 1 e 2mM.

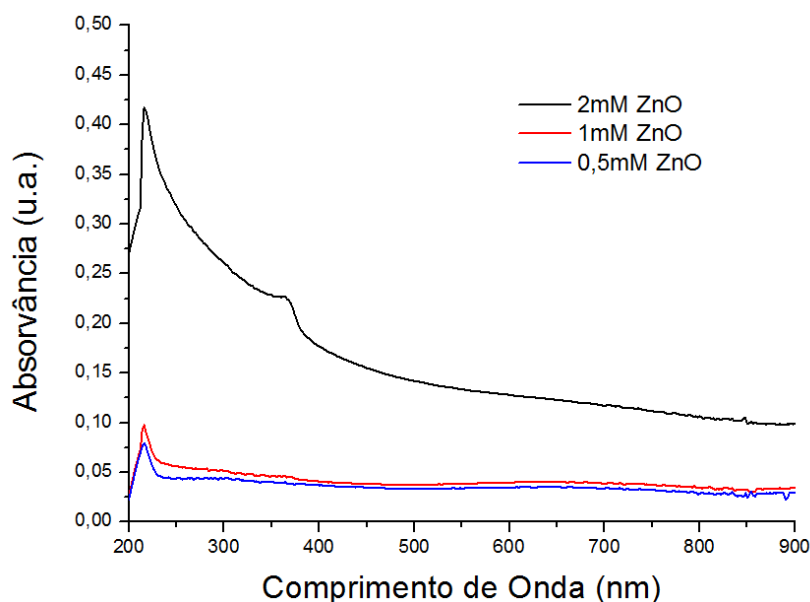


Figura 26: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de óxido de zinco comerciais, com concentração variável.

Por observação do espectro de Uv-Visível obtido para as ZnONPs, verifica-se, primeiramente, um aumento da absorvância com o aumento da concentração, tal como era esperado. Isto acontece pois, um aumento de concentração, é acompanhado por um aumento de nanopartículas em solução, para um valor de volume fixo.

Verifica-se que para a concentração mais elevada (2mM) verifica-se um segundo pico, a 375nm. Por norma e segundo a literatura, é a 375nm que se verifica o pico de absorção máximo, sendo que este está relacionado com o confinamento quântico a que as nanopartículas estão sujeitas. Para este comprimento de onda o tamanho registado por parte das NPs é de cerca de 30nm. [47]

No entanto, o comprimento de onda ao qual ocorre o máximo de absorção, para as três concentrações testadas, apresenta um deslocamento para o azul, aparecendo a um comprimento de onda de 215nm. Este comportamento observado pode dever-se ao facto de o óxido de zinco ser afectado por radiação UV distante cujo comprimento de onda se encontra a <200nm. [47]

Ainda assim, vemos que a banda de absorção é estreita o que é indicativo de nanopartículas cuja distribuição de tamanhos é pequena.

O facto de o pico estar deslocado para zonas de maior energia, menor comprimento de onda, é indicativo de nanopartículas de pequenas dimensões.

4.3.1.2) Microscopia electrónica de varrimento

Para a caracterização morfológica das nanopartículas de óxido de zinco comerciais, fez-se uma dispersão em etanol.

Assim, a Figura 27, diz respeito à imagem obtida das nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas.

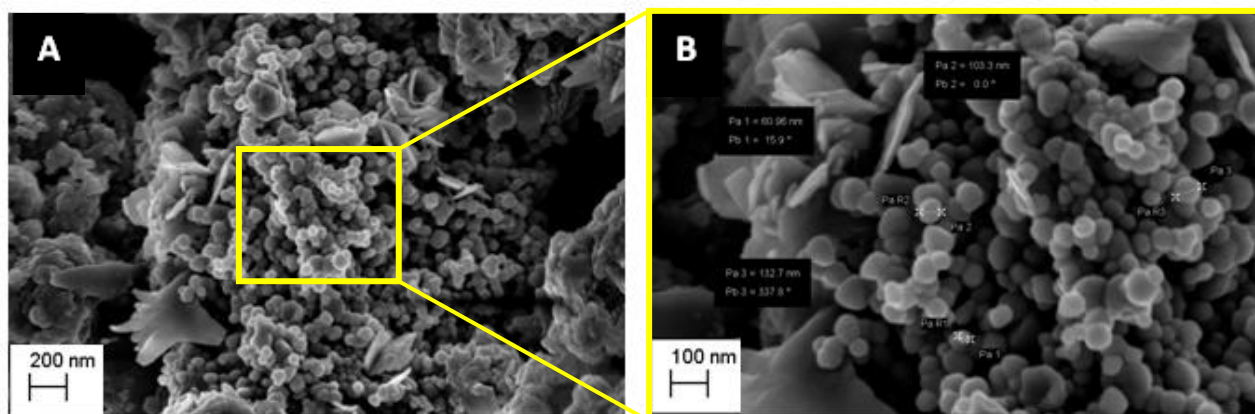


Figura 27: Imagens obtidas por SEM das nanopartículas de óxido de zinco comerciais.

Olhando para as imagens obtidas por SEM verificamos que os tamanhos obtidos são muito díspares do tamanho indicado pelo fabricante. As nanopartículas apresentam uma grande diversidade de tamanhos que vão desde os 60 a 132nm, possivelmente devido a aglomerados de nanopartículas de menores dimensões.

Também é visível a presença de aglomerados de grandes dimensões, provavelmente devido a uma quantidade excessiva de ZnO em pouco etanol, levando a uma má dispersão.

Estes resultados não estão de acordo com o que se esperaria obter após a análise do espectro de UV-Vísivel, que indicava a obtenção de nanopartículas de tamanhos pequenos

devido ao pico de absorção máximo estar desviado para comprimentos de onda muito baixo (cerca de 200nm).

4.3.1.3) Espectroscopia dispersiva de raios-X

Para uma caracterização química e elemental das várias nanopartículas, recorreu-se ao EDS, como se pode ver na Figura 28.

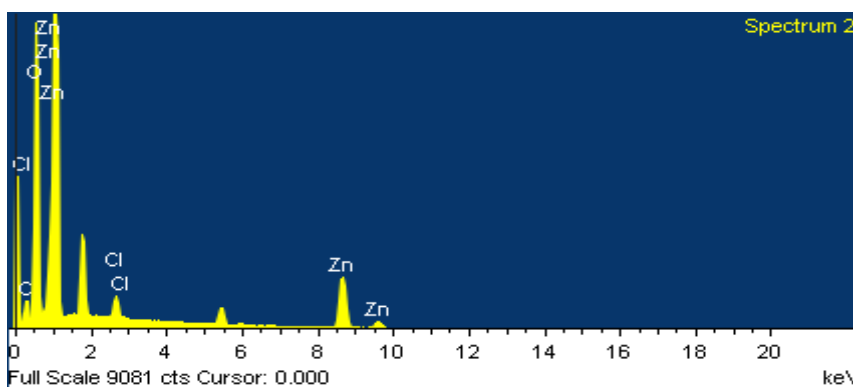


Figura 28: Espectro de EDS das nanopartículas de óxido de zinco comerciais.

Analisando o espectro, verifica-se a presença de zinco e de oxigénio em elevadas quantidades como era expectante.

No entanto, também o cloro se faz notar. Uma vez que as nanopartículas são dispersas apenas em água desionizada, este componente poderá ser empregue durante a síntese destas nanopartículas.

4.3.1.4) Difraccção de Raios-X

A Figura 29 representa o difractograma obtido na análise das NPs de ZnO comerciais.

Recorrendo à ficha de identificação de ZnO com a referência 00-036-1451, e forma hexagonal, é possível identificar alguns dos picos observados.

Assim, temos picos a 31,7°; 34,4°; 36,2°; 47,5°; 62,8°; 66,3°; 67,9°; 69,1° e 72,5°, correspondentes aos planos (1 0 0), (0 0 2), (1 0 1), (1 0 2), (1 0 3), (2 0 0), (1 1 2), (2 0 1) e (0 0 4), respectivamente.

Os restantes picos, embora residuais, não foram possíveis de identificar, sendo provavelmente referentes a compostos utilizados na síntese das nanopartículas uma vez que estas são comerciais.

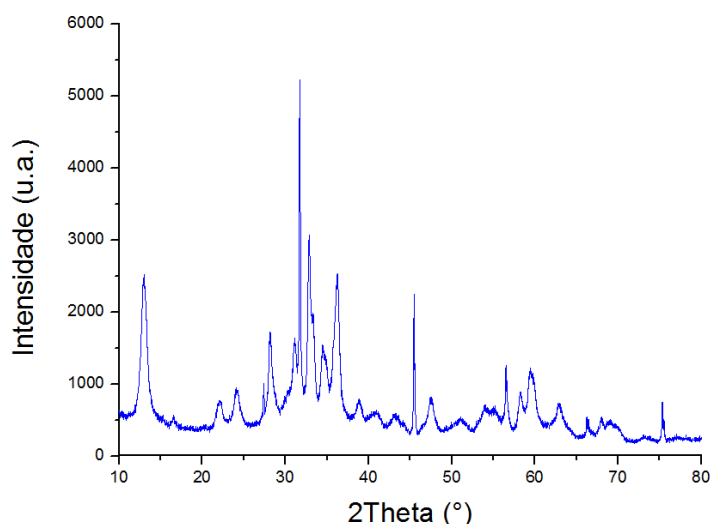


Figura 29: Difratograma obtido por Raios-X obtido das nanopartículas de óxido de zinco comerciais.

Através do difratograma é possível estimar o tamanho das cristalites obtidas.

Para tal, recorreremos à equação de Debye-Scherrer:

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Onde, K = factor forma, λ = comprimento de onda (Å), β (FWHM) é a considerada medida da largura de um pico de difracção no ponto onde a intensidade cai para a metade e θ = ângulo de difracção de Bragg em radianos. [39] No nosso caso $K=0.9$ (partículas esféricas) e $\lambda=1.5406\text{Å}$ (Angstroms).

Para as ZnONPs, obteve-se cristalites cujo tamanho é de 30,53nm, o que não está de acordo com as indicações do fabricante (14nm).

Comparando com os tamanhos das nanopartículas medidos por SEM, verifica-se que os valores não estão próximos dos obtidos por XRD, devido a aglomeração das mesmas.

4.3.2) Nanopartículas de cobre

Para as nanopartículas de cobre, foram utilizadas nanopartículas comerciais em pó. A suspensão utilizada para as caracterizações que se seguem, continha 10mM de CuNPs.

4.3.2.1) Espectrofotometria de UV-Visível

À semelhança das ZnONPs, também para as CuNPs, se traçou um espectro de absorvância variando a concentração entre 0,5, 1 e 2mM. Novamente a faixa de comprimento de onda foi de 200 a 800nm (Figura 30).

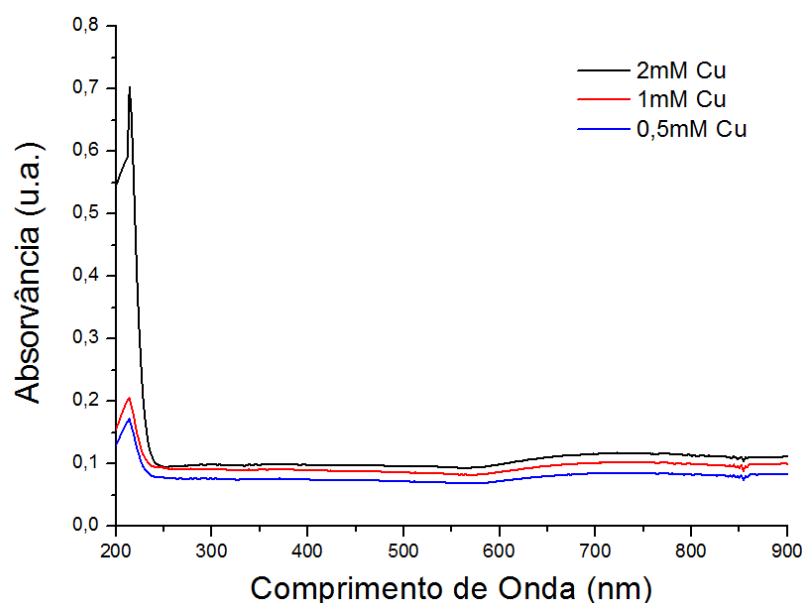


Figura 30: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de cobre comerciais, com concentração variável.

Novamente, verifica-se um aumento da absorvância com a concentração como desejado. O pico de absorção máximo ocorre a 210nm.

Metais com electrões livres possuem ressonâncias plasmónicas no espectro visível, que dão origem a cores intensas. Esta propriedade é principalmente observada em Au, Ag e Cu, devido à presença de electrões livres de condução. O campo eléctrico da radiação recebida induz a formação de um dipolo nas nanopartículas. A força restauradora na nanopartícula tenta compensar este, resultando num comprimento de onda de ressonância única. [48]

Assim, o comprimento de onda depende de um número de factores, entre os quais o tamanho da partícula e a sua forma, bem como a natureza do meio envolvente. [49]

De acordo com a literatura, largura de banda da ressonância aumenta com a diminuição do tamanho das partículas, devido ao aumento do espalhamento de electrões na superfície. Desta forma, é possível concluir-se que as nanopartículas aqui estudadas, apresentam tamanhos superiores a 20nm.

4.3.1.2) Microscopia electrónica de varrimento

Tal como para as ZnONPs, a caracterização morfológica das nanopartículas de cobre comerciais, foi feita com recurso a uma dispersão em etanol.

Desta vez, a imagem obtida refere-se às nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas. A Figura 31 que se segue diz respeito às nanopartículas de cobre.

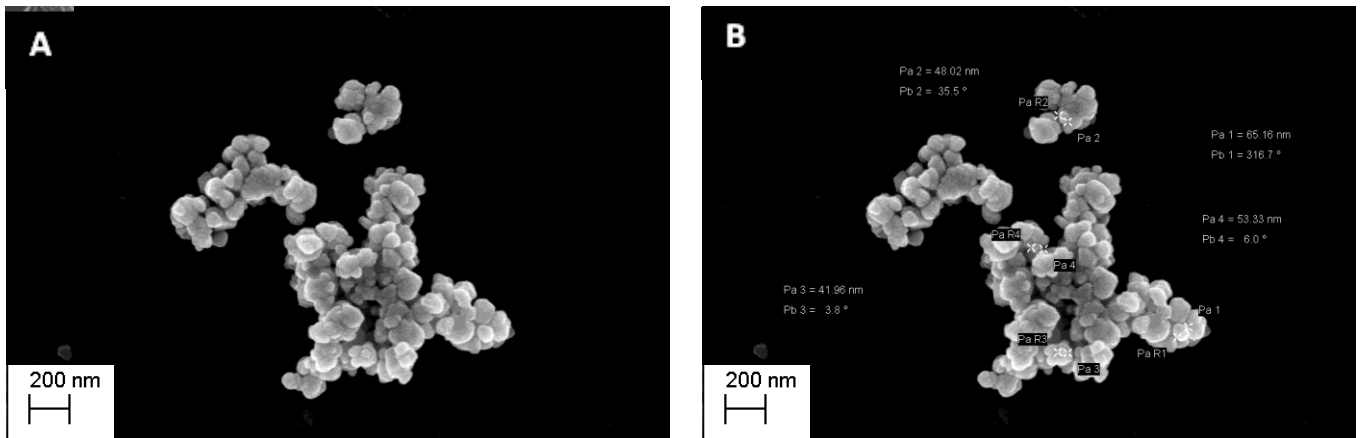


Figura 31: Imagens obtidas por SEM das nanopartículas de cobre comerciais.

As imagens obtidas por SEM evidenciam tamanhos que variam desde 41 a 65nm, que estão de acordo com a gama descrita pelo fabricante.

4.3.2.3) Espectroscopia dispersiva de raios-X

O espectro de EDS referente às nanopartículas de cobre encontra-se representado pela figura 32.

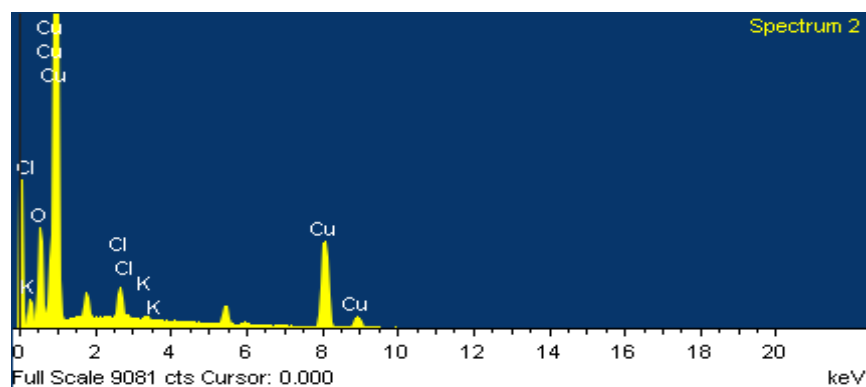


Figura 32: Espectro de EDS das nanopartículas de cobre comerciais.

Analisando o espectro de EDS, verifica-se a presença, maioritária, de cobre como era esperado. No entanto, são novamente detectados elementos que não se esperavam encontrar, nomeadamente cloro e potássio. Uma vez que, à semelhança das ZnONPs, também as CuNPs são

comerciais, não é passível sabermos quais os compostos, utilizados na síntese e que podem ser a origem dos elementos.

4.3.2.4) Difrração de Raios-X

O difractograma referente às nanopartículas de cobre, encontra-se representado na Figura 33.

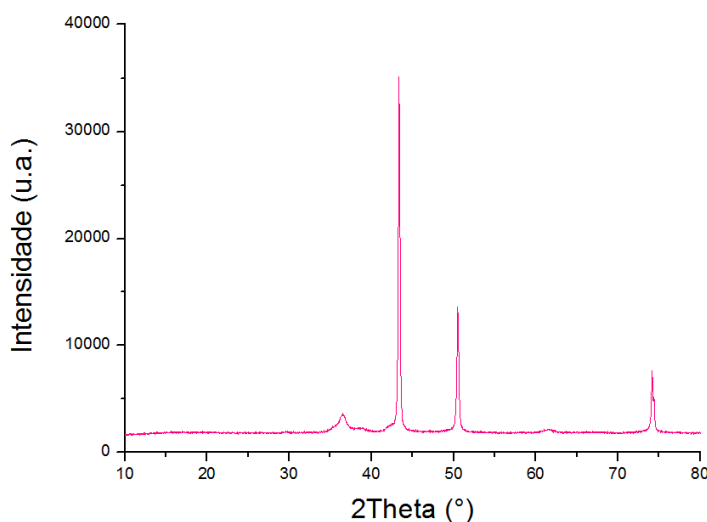


Figura 33: Difractograma obtido por Raios-X das nanopartículas de cobre comerciais.

A identificação dos planos, que se segue, foi feita recorrendo-se às fichas de identificação 00-045-0937 e 00-005-0667, ambas do óxido de cobre, monocíclico e cúbico, respectivamente.

Relativamente ao difractograma das CuNPs, são visíveis quatro planos cristalográficos. Os dois primeiros dizem respeito ao mesmo plano (1 1 1) mas a compostos diferentes. Isto é, o primeiro pico a 36,4°, é referente à cuprita (Cu_2O) enquanto que o segundo pico, a 43,3°, diz respeito ao cobre (Cu).

Os dois picos restantes, aparecem a um ângulo 2θ de 50,4° e 74,1°, que correspondem aos planos (2 0 0) e (2 2 0), respectivamente. Também estes planos são referentes ao cobre.

Recorrendo à equação de Debye-Scherrer, estimou-se o tamanho das cristalites. Assim, para as CuNPs, obteve-se, um tamanho de 46,01nm. Apesar de este valor estar de acordo com as indicações do fabricante (40-60nm), é também coerente com os valores obtidos por SEM.

4.3.3) Nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata, foram obtidas através de uma síntese química via citrato de sódio (reduztor). Estas foram posteriormente estudadas por algumas das técnicas anteriormente descritas (capítulo 2).

4.3.3.1) Espectrofotometria de UV-Visível

Através da espectrofotometria UV - visível é possível obter uma caracterização óptica das nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio. Os dados aqui apresentados são referentes a 0,5, 1 e 2mM de AgNO_3 , como mostra Figura 34.

Com o aumento de concentração ocorre um alargamento das bandas, que está relacionado com a distribuição de tamanhos das AgNPs. O pico de absorção máximo fornece uma noção da concentração de AgNPs em solução. O deslocamento do comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção, fornece informação sobre o tamanho das nanopartículas. [35,36]

O espectro de UV-Visível confirma a presença de AgNPs, preparadas pelo método de redução de AgNO_3 com citrato de sódio, devido a presença de um pico de absorvância máxima a cerca de 420nm, característico das AgNPs, cujo tamanho varia entre 10 e 20nm. [50]

Com base neste gráfico, verifica-se que um aumento da concentração de AgNO_3 , está associado a uma maior absorvância. Isto está de acordo com o facto de uma maior concentração de AgNO_3 implicar uma maior quantidade de reagente, logo um maior número de AgNPs que levam ao aumento da absorvância.

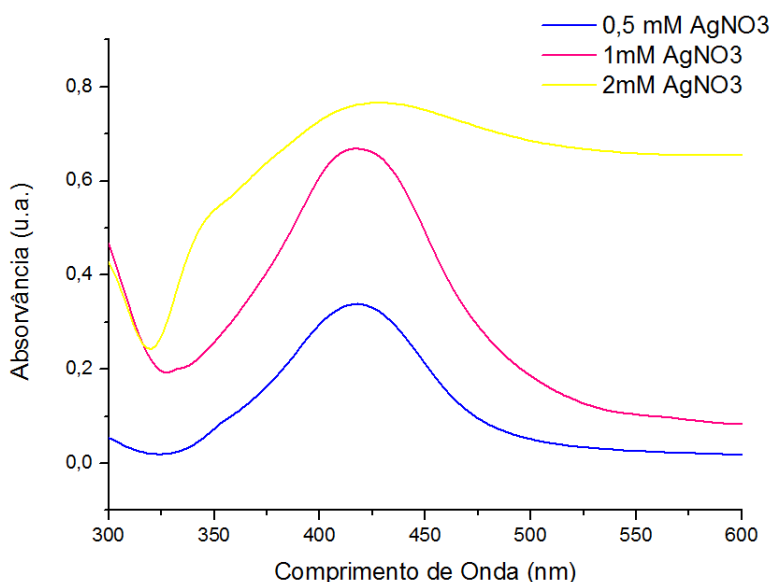


Figura 34: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio com concentração de AgNO_3 variável.

Segundo a literatura [35,36], à medida que as AgNPs aumentam de tamanho, o comprimento de onda é deslocado para a região vermelha do espectro visível. Tal acontecimento não foi verificado pelo que, apesar do número de AgNPs aumentar, o seu tamanho das AgNPs permanece inalterado. Isto revela que não houve agregação por parte das nanopartículas, mesmo não tendo sido utilizado um estabilizador.

O facto das bandas para a concentração de 2mM de AgNO_3 ser mais largas que as restantes, é indicativo de uma grande distribuição de tamanhos, possivelmente devido à precipitação das AgNPs em solução.

De modo a estudar a estabilização das AgNPs em solução, foi realizada uma outra medição, uma semana após a síntese (Figura 35).

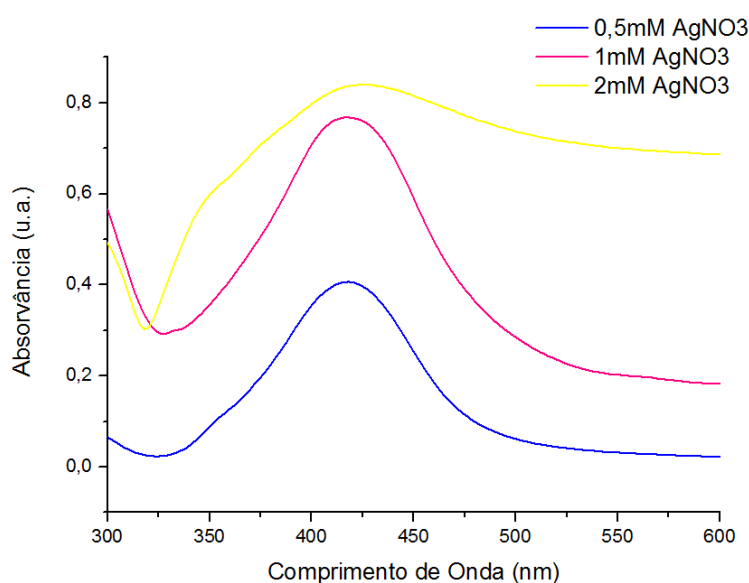


Figura 35: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio com concentração de AgNO_3 variável. Medição feita uma semana após a primeira medição.

Uma semana após a síntese não houve agregação das AgNPs, facto que é reforçado devido a ausência de um segundo pico, não se regista nenhum alargamento das bandas e a absorvância em vez de diminuir, aumentou. O comprimento de onda correspondente ao pico máximo, também não sofre grandes alterações, outra indicação de que as nanopartículas não agregaram. Este facto foi observado para todas as concentrações estudadas.

A ausência de um estabilizador, leva a que a taxa de nucleação espontânea diminua, e um menor número de núcleos são formados durante o rebentamento da nucleação. Assim, o passo reaccional de crescimento é mais rápido e acelerado pela ausência de uma camada polimérica formada por este agente, o que faz com que, o tamanho médio de partícula, seja maior. [51]

4.3.3.2) Microscopia electrónica de varrimento

Uma vez que não se realizou SEM da solução de prata de 10mM, apresenta-se aqui o papel de mesa após a sua pulverização com estas nanopartículas (Figura 36).

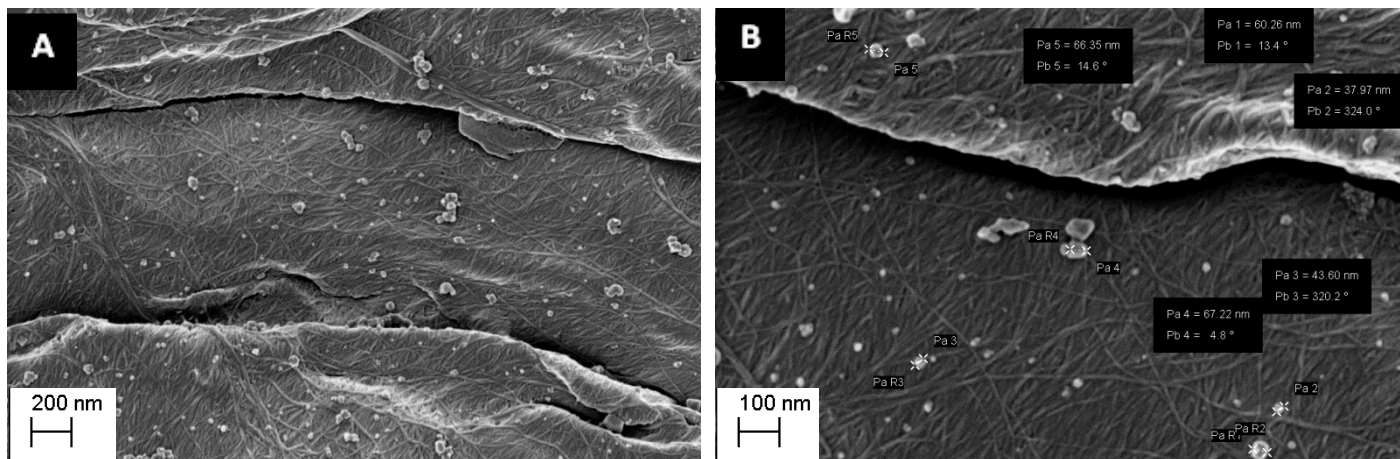


Figura 36: Imagens obtidas por SEM do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de prata.

O tamanho das nanopartículas medidas por SEM varia entre 38 e 67nm, aproximadamente. No entanto, verifica-se que a maioria das nanopartículas possui um tamanho entre os 60 e 70nm, apresentando uma pequena variedade de tamanhos. Este resultado era esperado uma vez, que as AgNPs são sintetizadas em condições controladas.

Apesar da diversidade de tamanhos ser pequena, a sua presença pode dever-se ao facto de não utilizado nenhum agente estabilizador, tornando-se mais difícil controlar a agregação das nanopartículas.

4.3.3.3) Espectroscopia dispersiva de raios-X

O papel de mesa contendo 10mM de AgNPs, foi analisado por esta técnica, de modo a identificar-se os elementos presentes na amostra, como evidenciado na Figura 37.

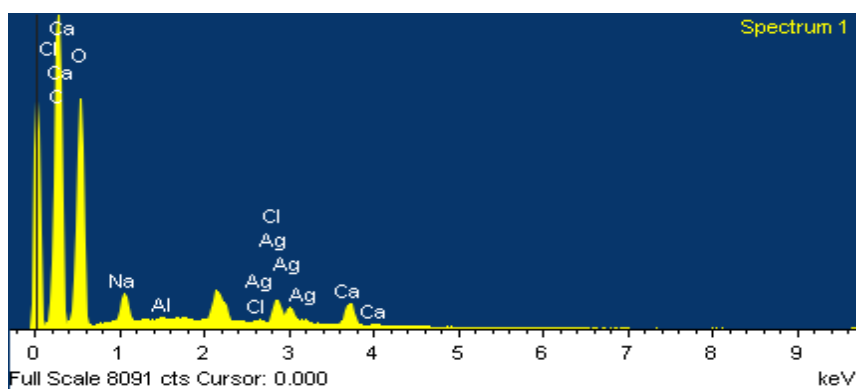


Figura 37: Espectro de EDS do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de prata.

Para o espectro das AgNPs, estão presentes alguns dos elementos mencionados anteriormente, referentes ao substrato de papel, nomeadamente, o carbono, o oxigénio, o cálcio e o alumínio.

Como era de se esperar, verifica-se a presença de prata e de sódio. O primeiro proveniente do nitrato de prata e este último encontra-se presente no agente redutor utilizado durante a síntese, o citrato de sódio.

Não se verifica a presença de nenhum contaminante.

4.3.3.4) Difraccção de Raios-X

Tal como anteriormente, apenas será discutido o difractograma referente ao papel de talheres com e sem as nanopartículas de prata uma vez que a relevância é a identificação dos picos pertencentes apenas à prata (Figura 38). Para tal recorreu-se a ficha de identificação da prata, com número de identificação **00-004-0783**.

De acordo com a literatura sabe-se que os picos característicos da estrutura cúbica de faces centradas da prata são correspondentes aos ângulos de 2θ a 38° , 44° , 64° , 77° , 82° que correspondem aos planos cristalográficos (111), (200), (220), (311), (222), respectivamente.

No entanto, observando o difractograma obtido apenas podemos observar um único pico.

Apesar de pouco intenso, podemos ver no difractograma obtido para as AgNPs via citrato de sódio um pico a 38° , sendo este característico da estrutura cúbica da prata e correspondente ao plano (1 1 1).

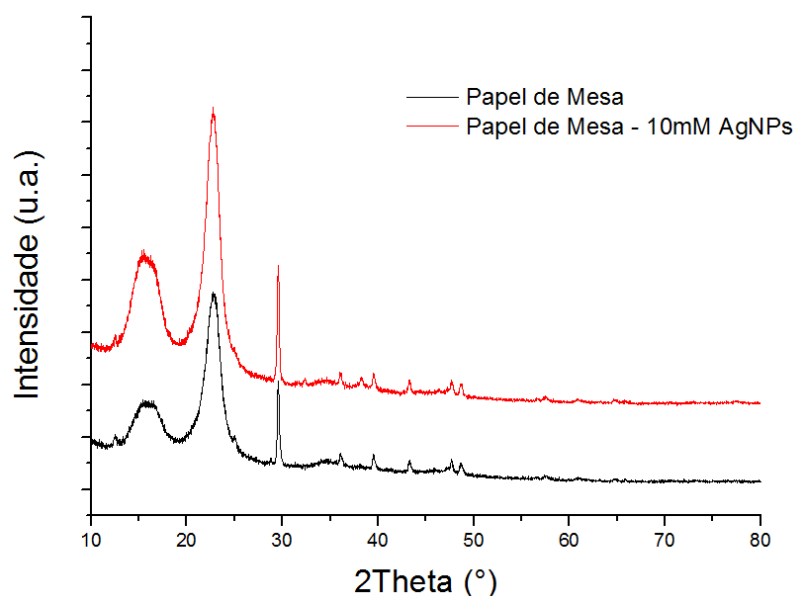


Figura 38: Difractograma obtido por Raios-X obtido do papel de mesa com e sem nanopartículas de prata.

Uma vez mais, recorrendo a equação de Debye-Scherrer, estimou-se o tamanho das cristalites com base no difractograma obtido. O tamanho obtido foi de 68,05nm. Por comparação com o SEM, vemos que está de acordo com o tamanho das nanopartículas medidos.

4.3.4) Nanopartículas de óxido de tungsténio

Tal como as outras nanopartículas comerciais já abordadas, as WO_3 NPs foram dispersas em água, seguindo-se da sua caracterização utilizadas técnicas já conhecidas.

4.3.4.1) Espectrofotometria de UV-Visível

Para se traçar o espectro UV-Visível para estas nanopartículas, novamente, variou-se a concentração entre 0,5; 1 e 2mM e variou-se o comprimento de onda também entre 200 e 900nm (Figura 39).

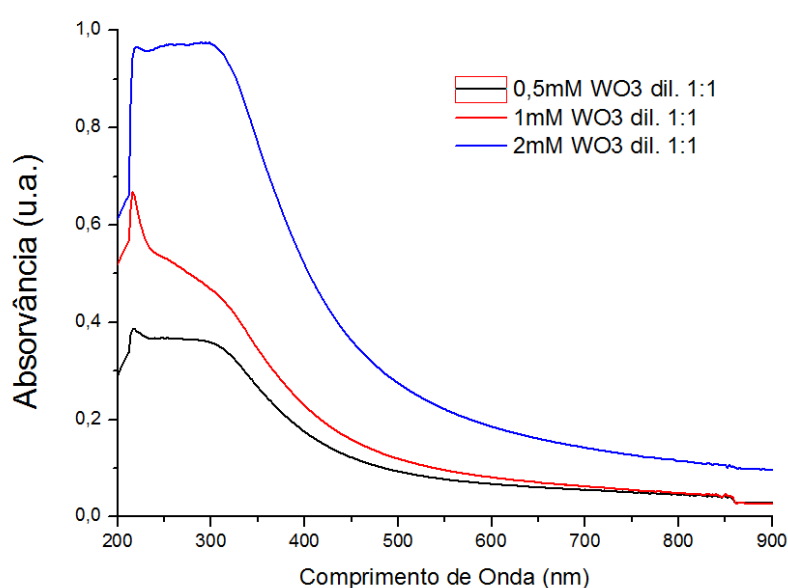


Figura 39: Espectro de UV-Visível das nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais, com concentração variável.

Observando a Figura 39, verifica-se novamente um aumento da absorvância com um aumento da concentração, como era esperado. O facto de se observar para todas as concentrações uma banda alargada, revela uma grande distribuição de tamanhos. É bem conhecido que, como consequência do confinamento quântico, o espectro de absorção Uv-vis de nanopartículas de semicondutores é dependente do tamanho. Particularmente, o comprimento de onda no máximo de absorção diminui devido à diminuição do tamanho das nanopartículas. A diminuição de tamanho das partículas aumenta a energia da banda óptica das nanopartículas, indicando a presença de efeito de confinamento quântico. [52]

4.3.4.2) Microscopia electrónica de varrimento

A imagem obtida é referente ao papel de mesa pulverizado com nanopartículas de óxido de tungsténio sintetizadas. Para tal, utilizou-se microscópio electrónico de varrimento (SEM).

A Figura 40 diz respeito somente às nanopartículas comerciais em pó, dispersas em etanol. De acordo com o fabricante, estas nanopartículas apresentam tamanhos inferiores a 100nm, o que foi verificado por SEM.

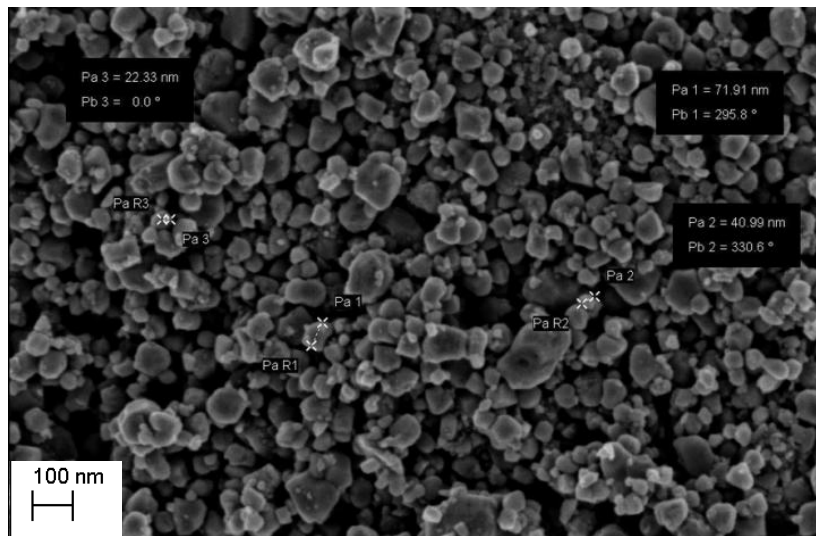


Figura 40: Imagens obtidas por SEM das nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais.

Podemos observar uma grande diversidade de tamanhos, que se reflecte nas medições feitas as nanopartículas, cujo tamanho varia desde 22 a 72nm, aproximadamente, tal como se previa, pela observação do espectro de Uv-visível, devido à existência de bandas alargadas.

No entanto, verifica-se a presença de alguns aglomerados. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por DRX.

4.3.4.2) Espectroscopia dispersiva de raios-X

Seguindo o que foi feito para as nanopartículas anteriormente discutidas, realizou-se EDS para o papel de mesa, desta vez, com nanopartículas de óxido de tungsténio (Figura 41).

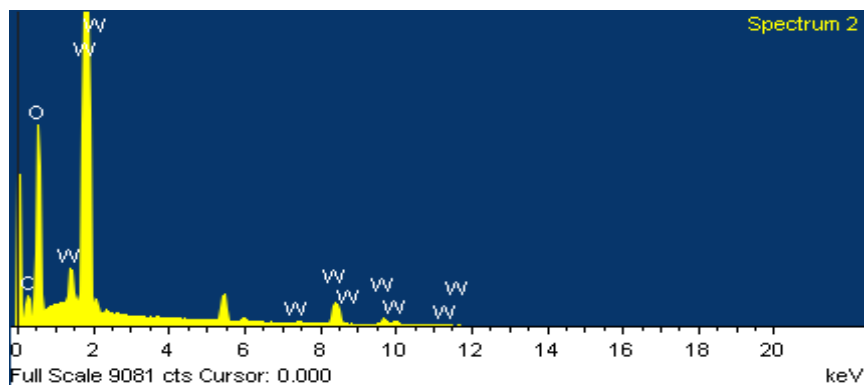


Figura 41: Espectro de EDS das nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais.

No caso destas nanopartículas, a análise química elementar revela os constituintes das nanopartículas, isto é o tungstênio e o oxigênio.

4.3.4.3) Difração de Raios-X

O difractograma que se segue, que é referente à suspensão de nanopartículas de óxido de tungstênio sintetizadas, foi obtido para valores de ângulos de 2θ entre os 10° - 80° (Figura 42).

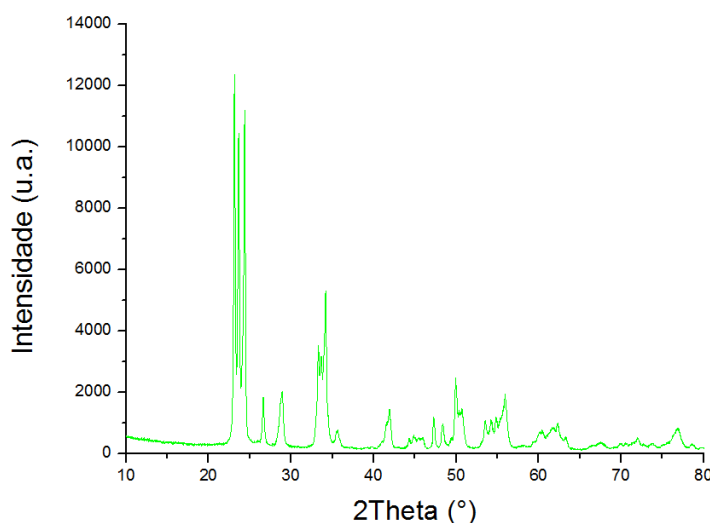


Figura 42: Difractograma obtido por raios-X obtido das nanopartículas de óxido de tungstênio comerciais.

Comparando o difractograma da Figura 42 com a ficha de identificação **00-032-1395** do óxido de tungstênio com estrutura anórtica, verificamos que são detectados vários planos. Os três primeiros planos (0 0 2), (0 2 0) e (2 0 0) correspondem a um ângulo 2θ de $23,1^\circ$; $23,6^\circ$ e $24,3^\circ$, respectivamente.

Ainda é possível identificar os planos (0 -2 1), (1 1 2), (0 2 2), (0 -2 2), (2 0 2), (1 1 2) e (2 2 2) correspondentes aos ângulos $26,6^\circ$; $28,8^\circ$; $33,0^\circ$; $33,7^\circ$; $34,1^\circ$; $35,5^\circ$ e $41,8^\circ$, respectivamente.

Como existem muitos mais planos para além dos 40° , é necessário recorrer a outras fichas, também referentes ao WO_3 , para os identificar. A diferença entre estas fichas, está no sistema cristalino que o WO_3 apresenta. Isto significa que provavelmente estas NPs comerciais são compostas por uma mistura de fases cristalinas diferentes que pode ocorrer consoante o tipo de síntese.

Assim, recorrendo à ficha de identificação **00-043-1035** do óxido de tungstênio com estrutura monoclinica, identifica-se os planos (-3 1 2), (-3 2 1), (3 1 2), (2 3 2), (-3 2 2), (-1 1 4), (0 2 4), (2 0 4) e (2 1 4), referentes a um ângulo 2θ igual a $45,3^\circ$; $45,7^\circ$; $46,0^\circ$; $50,21^\circ$; $50,24^\circ$; $50,3^\circ$; $53,4^\circ$; $54,2^\circ$ e $55,7^\circ$, respectivamente.

Para os planos observados a partir do ângulo 60° , é necessário recorrer a uma outra ficha, ficha de identificação **00-033-1387** do óxido de tungstênio com estrutura hexagonal, para

os identificar. Deste modo registam-se para os ângulos 61,3°; 63,4°; 64,0°; 68,1°; 72,3°; 74,4°; 77,7° e 78,6°, os planos (2 1 2), (4 0 1), (3 2 0), (4 1 0), (3 1 2), (1 0 3), (4 0 2) e (3 3 0), respectivamente.

Por forma a pudermos comparar os tamanhos das WO₃NPs obtidos por SEM, com o tamanho das mesma obtidos por XRD, calculou-se o tamanho das cristalites, recorrendo, novamente, à equação de Debye-Scherrer. O tamanho obtido foi de 40,68nm.

Por comparação com os tamanhos medidos por SEM vemos que para uma das medições efectuada (40,99nm), os valores obtidos para cada técnica são coerentes, apesar de ser visível uma variedade de tamanhos das nanopartículas.

No entanto, os valores obtidos, encontram-se dentro da gama, indicada pelo fabricante, ou seja, inferiores a 100nm.

4.4) Estudo da actividade anti-bacteriana das nanopartículas

Para o estudo da actividade antimicrobiana dos substratos de papel impregnados com as diferentes nanopartículas foram realizados testes anti-bacterianos. Para tal, recorreu-se a cinco estirpes de bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (RN4220) e *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Escherichia coli* (ATCC8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) cujas imagens obtidas por SEM se apresentam na Figura 43. Realizou-se ainda um ensaio de actividade antifúngica tendo-se utilizado a levedura *Candida albicans* (ATCC10231).

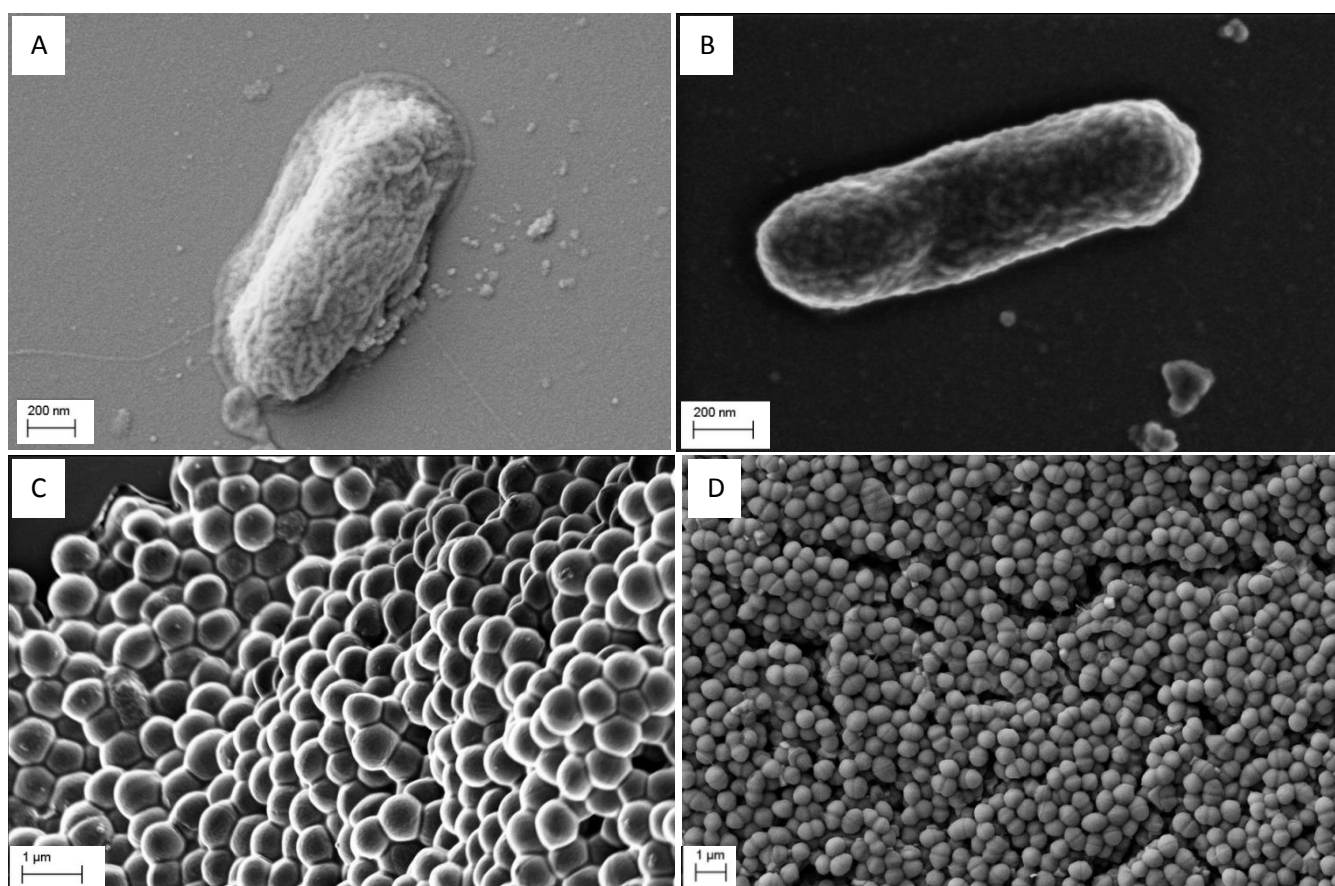


Figura 43: Imagens obtidas por SEM de quatro estirpes bacterianas. A) *Escherichia coli* (ATCC8739); B) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027); C) *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (RN4220); D) *Enterococcus faecalis* (ATCC29212).

Como já mencionado, os testes para determinação da actividade anti-microbiana foram feitos utilizando, primeiramente, os papéis impregnados com uma suspensão de 10 mM de concentração de cada uma das nanopartículas em estudo. Os controlos utilizados foram os quatro substratos de papel (papel de mesa, talheres, cartão e saco de take-away) impregnados com uma suspensão de nitrato de potássio e citrato de sódio para garantir que a actividade anti-microbiana não era devida a nenhum dos reagentes utilizados. Estes materiais de controlo serviram para verificar se o efeito anti-bacteriano era efectivamente devido às nanopartículas de prata e não devido aos agentes redutores utilizados. Como controlo negativo utilizaram-se os mesmos substratos de papel mas sem funcionalização, ou seja, sem serem pulverizados.

Estes materiais de controlo serviram para verificar se o efeito anti-bacteriano era efectivamente devido às nanopartículas de prata e não devido aos agentes redutores utilizados.

Devido a se terem feitos muitos ensaios, com quatro substratos e cinco bactérias diferentes, apenas serão apresentados os resultados relacionados com os substratos impregnados com AgNPs, demonstraram uma maior actividade anti-bacteriana (Tabela 3).

Tabela 3: Diâmetro dos halos de inibição (mm) verificados com papéis impregnados com a suspensão de 10 mM de nanopartículas de prata com os seis microrganismos em estudo (média±desvio padrão).

Nanopartículas de Prata - 10mM					
Bactérias Substrato	SA	MRSA	Enterococcus	E. Coli	Pseudomonas
Cartão	8 ± 1,4	8,3 ± 0,5	7,3 ± 0,5	9 ± 0,9	8,5 ± 1,3
Papel de Mesa	7,3 ± 1,1	6,8 ± 0,4	nd	7,2 ± 0,3	nd
Papel de Talheres	nd	nd	nd	nd	nd
Saco do McDonalds	nd	nd	nd	nd	nd

nd - Não detectado

Dos vários controlos efectuados apenas o papel de talheres impregnado com a suspensão de nitrato de potássio e citrato de sódio apresentou actividade antimicrobiana em relação ao *S. aureus* e em relação ao MRSA. Uma vez que essa actividade, determinada pela medição do diâmetro dos halos de inibição, era idêntica à do mesmo papel pulverizado com a solução contendo as nanopartículas o ensaio foi considerado negativo para estes microrganismos. Desta forma, concluiu-se que, para os restantes microrganismos, os elementos constituintes do papel ou da suspensão de nitrato de potássio e citrato de sódio não apresentaram qualquer actividade antimicrobiana e que os efeitos observados resultaram da actividade das nanopartículas, neles impregnados.

Dos quatro substratos de papel impregnados com as nanopartículas de prata com uma concentração de 10 mM apenas se conseguiu detectar actividade anti-bacteriana com o cartão em todas as bactérias testadas, e com o papel de mesa, em todas as bactérias com excepção do *E. faecalis* e *Pseudomonas*. Nenhuma das amostras testadas apresentou actividade antifúngica, uma vez que nunca se verificou o aparecimento de halos de inibição nas placas inoculadas com *C. albicans*. Para todas as bactérias testadas verificaram-se sempre halos de inibição superiores quando as nanopartículas de prata se encontravam impregnadas no cartão do que quando se

encontravam impregnadas no papel de mesa, verificando-se a maior diferença no caso do *E. faecalis* onde apenas se detectou actividade anti-bacteriana com o cartão.

Em relação às restantes nanopartículas, apenas se detectou actividade antimicrobiana quando o substrato utilizado foi o papel de mesa, tendo sido verificada actividade anti-bacteriana com as nanopartículas de cobre em relação ao *S. aureus*, óxido de zinco em relação ao *S. aureus* e ao MRSA, e óxido de tungsténio em relação ao *S. aureus*, MRSA e *E. faecalis*. Contudo estes ensaios registaram alguma falta de reprodutibilidade pelo que estes resultados carecem de confirmação. Assim, com excepção das nanopartículas de prata, as restantes nanopartículas apenas pareceram ter alguma actividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas. Já em relação à *C. albicans* nenhuma das nanopartículas testada mostrou ser capaz de inibir o seu crescimento.

Com base nos resultados obtidos, repetiram-se novamente os ensaios de actividade anti-bacteriana, desta vez utilizando apenas o cartão e o papel de mesa impregnados com soluções com diferentes concentrações de nanopartículas de prata, nomeadamente, de 2, 25 e 50mM. Foram feitos três ensaios para as novas concentrações, como anteriormente, para garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos. As Figuras 44 e 45 são apresentadas, respectivamente, as fotografias das placas resultantes destes ensaios com a *P. aeruginosa* (bactéria Gram-negativa) e com o *S. aureus* (bactéria Gram-positiva).

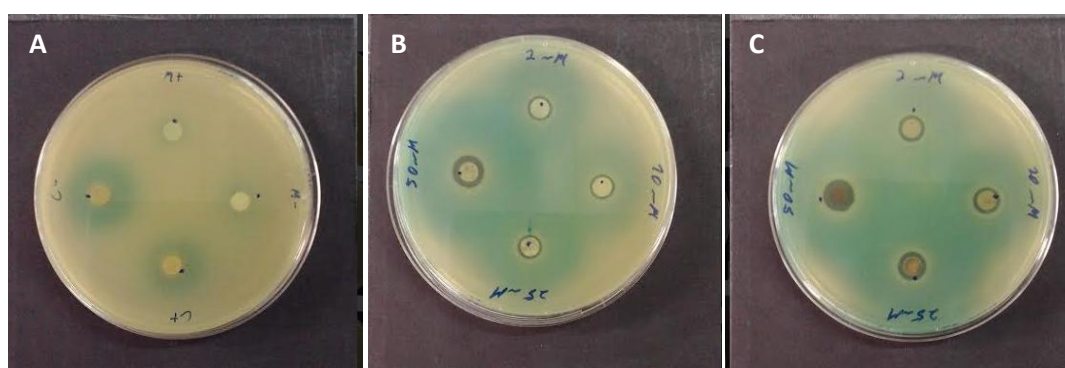


Figura 44: Testes anti-bacterianos realizados com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027). A) Controlos (C⁺ - Controlo Positivo Cartão; C⁻ - Controlo Negativo Cartão; M⁺ - Controlo Positivo Mesa; M⁻ - Controlo Negativo Mesa). B) Papel de Mesa com nanopartículas de prata com 2, 10, 25 e 50mM de concentração. C) Cartão com nanopartículas de prata com 2, 10, 25 e 50mM de concentração.

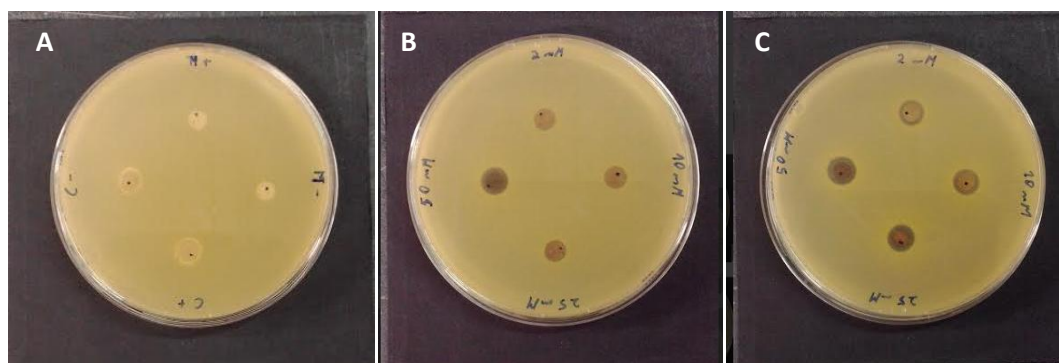


Figura 45: Testes anti-bacterianos realizados com a bactéria *Saphylococcus aureus* A) Controlos (C⁺ - Controlo Positivo Cartão; C⁻ - Controlo Negativo Cartão; M⁺ - Controlo Positivo Mesa; M⁻ - Controlo Negativo Mesa). B) Papel de Mesa com nanopartículas de prata com 2, 10, 25 e 50mM de concentração. C) Cartão com nanopartículas de prata com 2, 10, 25 e 50mM de concentração.

Nestes ensaios também nunca se obtiveram halos de inibição com os vários controlos nas cinco estirpes testadas. Desta forma, concluiu-se que os elementos constituintes do papel ou da suspensão de nitrato de potássio e citrato de sódio não apresentaram qualquer actividade antimicrobiana e que os efeitos observados resultaram da actividade das nanopartículas, neles impregnadas. Os resultados dos três ensaios efectuados para as cinco estirpes bacterianas testadas encontram-se resumidos na tabela 4.

Tabela 4: Médias dos três ensaios realizados para as cinco estirpes bacterianas com papel de mesa e cartão, variando a concentração de AgNPs.

	Papel de Mesa						Cartão					
	Ag 2mM	Ag 10mM	Ag 25mM	Ag 50mM	Controlo Positivo	Controlo Negativo	Ag 2mM	Ag 10mM	Ag 25mM	Ag 50mM	Controlo Positivo	Controlo Negativo
SA	0	0	0	7,8	0	0	7,2	7,5	7,8	8,5	0	0
MRSA	6,5	6,5	6,5	0	0	0	7	7,3	7,8	8,7	0	0
Enterococcus	0	0	0	0	0	0	0	7,7	8,2	9	0	0
E. Coli	0	0	0	8	0	0	0	0	7,2	8,3	0	0
Pseudomonas	7,7	7,8	7,7	10,3	0	0	8	8,5	8,8	10	0	0

A tabela 4 é evidente que, os papeis impregnados com as AgNPs 50mM foram aqueles que apresentaram o maior diâmetro dos halos de inibição, o que indica que envolvimento das nanopartículas na actividade anti-bacteriana detectada. No entanto, a diferença entre as várias doses não foi tão acentuada como se esperaria. Isto pode dever-se a vários factores. Um deles, está relacionado com a síntese, uma vez que como as concentrações mais altas que se utilizaram foram elevadas, após a síntese, parte da prata ficou depositada no fundo do balão, criando um espelho de prata. Assim, é provável que as concentrações reais sejam um pouco mais baixas do que as pretendidas nas amostras de 25 e 50mM. O mesmo não se verificou aquando da síntese com 2 e 10mM de nitrato de prata.

Outra razão pode dever-se ao facto do papel, aquando da pulverização, ficar saturado em quantidade de nanopartículas.

Entre o papel de mesa e o cartão, este último foi o que apresentou halos de inibição com maior diâmetro, ou seja, para a mesma concentração de nanopartículas, com o cartão verificaram-se, na maioria dos casos, actividades antibacterianas mais elevadas. Tais resultados podem dever-se ao facto de este ser o único substrato que não apresenta fibras de celulose distintas, mas sim uma superfície extremamente porosa. Assim a impregnação é mais eficiente

para este substrato de papel, em parte, também devido à sua espessura, que é superior à dos restantes substratos utilizados.

Existem três mecanismos de actuação das nanopartículas de prata contra as bactérias, tais como:

1. As nanopartículas de prata, principalmente na gama dos 1 - 10 nm, ligam-se à superfície da membrana celular e perturbam drasticamente as suas funções, tais como a permeabilidade e respiração;
2. As nanopartículas de prata têm a capacidade de penetrar dentro das bactérias causando vários danos pela possibilidade de interacção com compostos constituídos por enxofre e fósforo;
3. As nanopartículas de prata libertam iões de prata, Ag^+ , que têm uma contribuição adicional para o efeito anti-bacteriano das nanopartículas.

Dos três mecanismos referidos, o efeito observado nestas placas, poderá dever-se à libertação de iões de prata que irá promover um efeito anti-bacteriano através da atracção electrostática entre as cargas negativas da membrana celular dos microorganismos e a carga positiva das nanopartículas, promovendo a ligação dos iões Ag^+ aos grupos de proteínas funcionais, resultando numa desprotonação proteica. Os iões de Ag^+ tornam-se, assim, extremamente tóxicos para as bactérias. [27]

Após a realização destes testes anti-bacterianos e de modo a corroborar as conclusões retiradas, efectuaram-se novamente, caracterizações morfológicas, ópticas e estruturais dos papéis utilizados. Deste modo, utilizamos técnicas como SEM, XRD, FTIR e EDS, para analisar o papel de cartão e o papel de mesa, com as quatro concentrações diferentes (2, 10, 25 e 50mM). No entanto, apenas iremos analisar o cartão, visto ter sido o substrato cujos resultados foram melhores.

Deste modo, podemos perceber se um aumento da concentração implica a existência de mais nanopartículas, após a sua pulverização no papel e de que forma isso contribui para o tamanho dos halos não variar significativamente de ensaio para ensaio.

4.4.1) Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM) permite caracterizar morfológicamente a superfície dos substratos de papel onde foram depositadas as nanopartículas e as próprias nanopartículas. O objectivo é ter noção da quantidade de nanopartículas que fica depositada no cartão, à medida que a concentração aumenta, bem como o tamanho das mesmas.

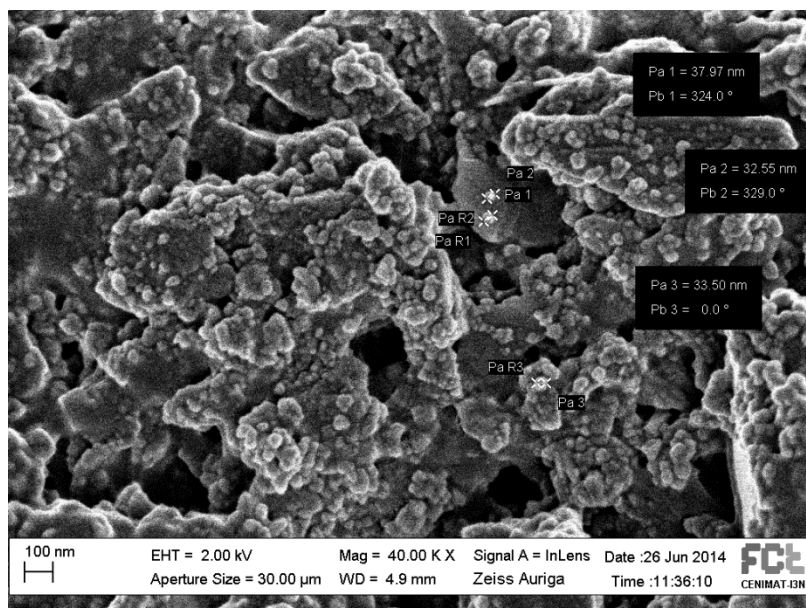


Figura 46: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 2mM de nanopartículas de prata.

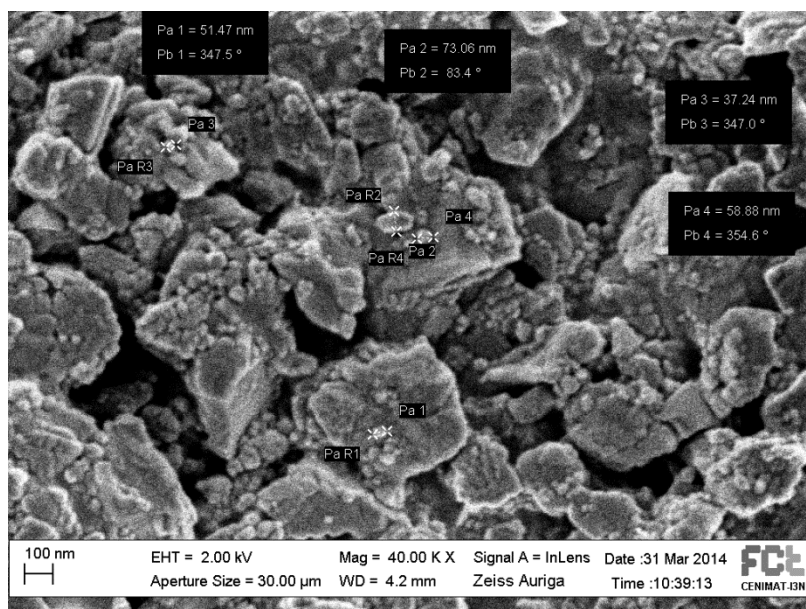


Figura 47: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 10mM de nanopartículas de prata.

Comparando a imagem de SEM das nanopartículas com 2mM de AgNO_3 com a imagem em que a concentração aumenta para 10mM, verifica-se que de uma forma geral, o tamanho das nanopartículas aumenta com o aumento da concentração.

No entanto, para 10mM existem nanopartículas de vários tamanhos, desde 37 a 73nm.

Com o aumento da concentração de 25 para 50mM, era esperado observar-se um aumento de tamanho das nanopartículas, uma vez que temos uma maior quantidade de partículas no mesmo volume. No entanto, isto não se verifica. Os tamanhos são bastante próximos um do outro, o que pode explicar o porquê de nos testes anti-bacterianos os halos

medidos com 25mM de AgNO_3 não diferem muito em tamanho dos halos medidos com 50mM de AgNO_3 .

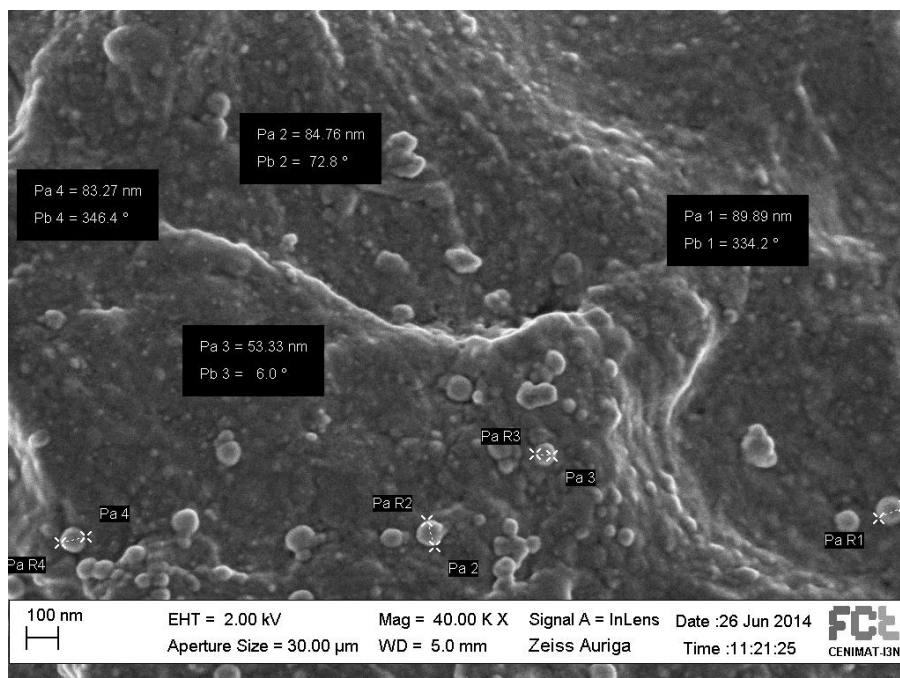


Figura 48: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 25mM de nanopartículas de prata.

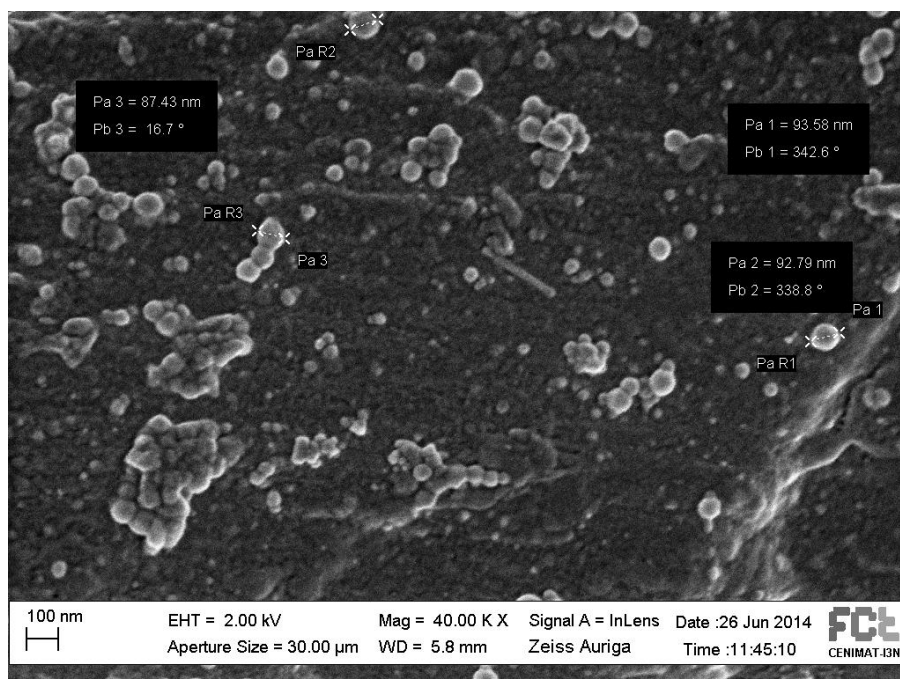


Figura 49: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 50mM de nanopartículas de prata.

Assim, quanto maior a concentração, maior é o número de partículas em solução, e na ausência de um agente estabilizador, maior é a probabilidade destas agregarem.

A sua agregação leva a uma diminuição da sua área superficial e portanto, uma diminuição da sua actividade antibacteriana.

Isto vai ao encontro dos resultados obtidos nos testes anti-bacterianos, uma vez que os halos para a concentração maior (50mM) não são muito superiores aos halos medidos para uma concentração de 2mM (diferença de 2mm).

4.4.2) Difracção de raios-X

Como já referido, a técnica de difracção de raios-X permite identificar diferenças a estrutura cristalina das nanopartículas de prata sintetizadas e calcular o tamanho da cristalite. A suspensão tinha uma concentração de 10mM e os difractogramas foram adquiridos para ângulos de 2θ entre os 10° - 80° . Os difractogramas são seguidamente apresentados (Figura 50).

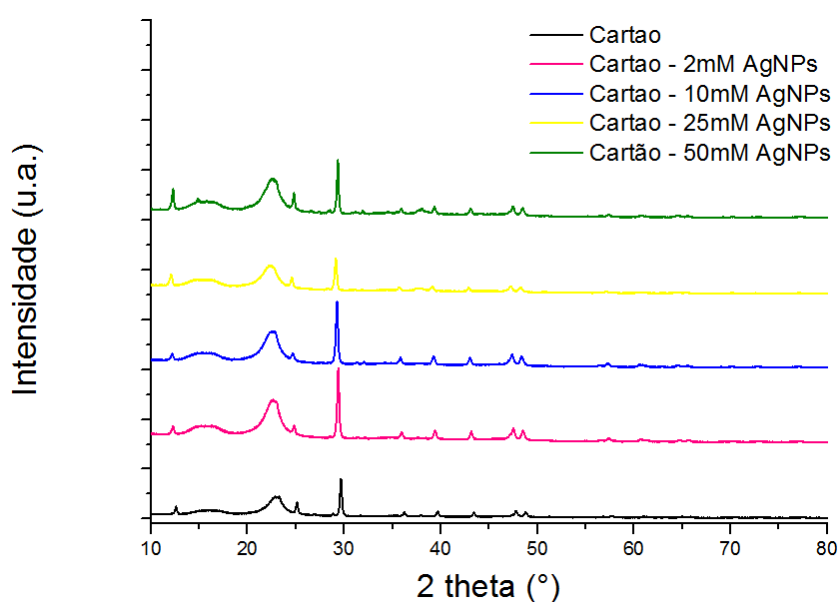


Figura 50: Difractogramas obtido pela técnica de DRX para as nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio, com diferentes concentrações, no substrato de cartão.

Pela análise da Figura 52 verifica-se que para todas as concentrações, as nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio apresentam um difractograma com um ligeiro pico aos 38° , que corresponde ao plano cristalográfico (111), e que é um dos picos característicos da estrutura cristalina da prata. Para efectuar esta identificação recorreu-se à ficha de identificação 00-004-0783 referente à prata cúbica.

Como a intensidade do pico referente ao plano cristalográfico (111), é muito diminuto, torna-se difícil obter o valor referente à distância a meia altura (FWHM), pelo que não foi possível estimar o tamanho das cristalites, para as concentrações em questão.

4.4.3) Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia do infravermelho por Transformada de Fourier consiste numa técnica que permite a rápida obtenção de informação sobre os elementos e ligações químicas que constituem uma determinada amostra.

O espectro obtido para o cartão com e sem prata, por FTIR através de ATR com cristal de diamante, está representado na Figura 51.

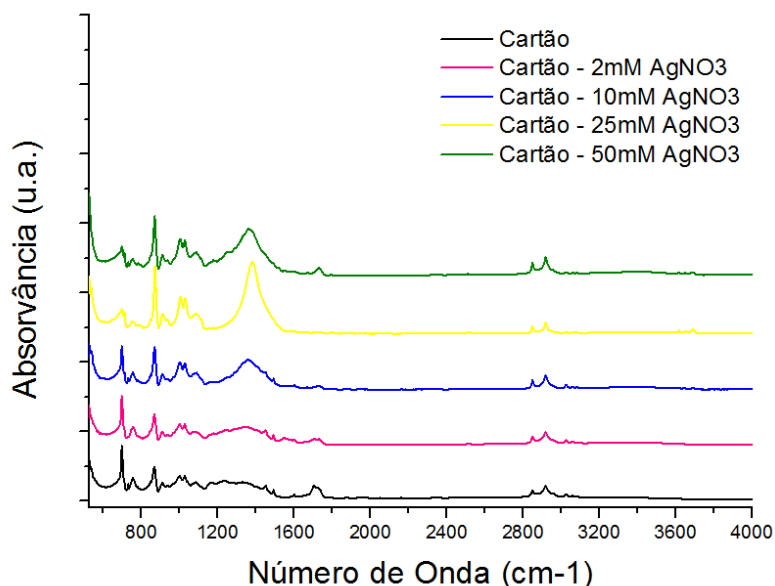


Figura 51: Espectro obtido por FTIR do cartão com e sem nanopartículas de prata.

Analisando o espectro de FTIR obtido, observa-se uma primeira região, cujo número de onda está entre 4000 e 2500 cm^{-1} , que está associada ao estiramento das ligações que envolvem o átomo de hidrogénio, como por exemplo C-H, N-H ou O-H.

A segunda região do espectro situa-se entre os 2500 e os 2000 cm^{-1} e diz respeito às ligações covalentes triplas do átomo de hidrogénio. Esta região e as duas seguintes apresentam-se por ordem de força da ligação. Assim, após as ligações triplas, encontram-se as ligações duplas, para números de onda entre 1900 e 1500 cm^{-1} .

Por último, temos a região das ligações covalentes simples (números de onda inferiores a 1500 cm^{-1}), que é denominada impressão digital, uma vez que é tão característica do composto como a impressão digital é de um determinado indivíduo.

O espectro obtido para o cartão tem algumas semelhanças do espectro da celulose [53]. Na primeira região foi detectada apenas uma pequena banda perto do número de onda 3000 cm^{-1} , respeitante ao estiramento de ligações C-H.

Na região designada impressão digital, número de onda inferior a 1500 cm^{-1} , foram encontradas diversas bandas. As bandas de 1425 e 1370 cm^{-1} são características da deformação assimétrica e simétrica dos grupos metileno CH_2 , respectivamente. Por sua vez, a banda de 1325 cm^{-1} corresponde à deformação da ligação C-OH da glucose. A banda de absorção a 1160 cm^{-1} está associada à deformação assimétrica da ligação C-O-C, e a banda a 1110 cm^{-1} é característica da vibração simétrica da ligação C-O-C. As bandas de 1060 e 1035 cm^{-1} são relativas à vibração

do anel de carbono da glucose, representando o estiramento das ligações C-O e C-H. Por fim a banda a 900 cm^{-1} corresponde à deformação da ligação C1-O-C4 do anel da glucose [53-55].

A ausência de bandas também nos dá informações referentes ao espectro obtido por FTIR. Podemos concluir que o cartão não apresenta vestígios de lenhina pela ausência de bandas nas regiões entre 1600 e 1500 cm^{-1} [53,54].

Todas as bandas aqui identificadas, dizem respeito ao espectro de IV da celulose, pelo que não há presença de nenhum aditivo na constituição deste substrato como corroborado pelo XRD.

Comparando o espectro do cartão com o espectro do cartão contendo nanopartículas de prata, não se verifica nenhuma banda neste último que não esteja presente no espectro do cartão.

No entanto, a ausência de bandas também nos permite retirar informação sobre o espectro. O facto de não existir nenhum pico estreito a $1654,23\text{ cm}^{-1}$, referente ao nitrato de prata, é coerente com o espectro típico das AgNPs, uma vez que aquando da redução do nitrato de prata, ocorre a perda do grupo nitrato. As moléculas que contêm grupos NO_2 , tais como compostos nitro, nitratos e nitraminas, geralmente exibem vibrações de alongamento assimétricas e simétricas do grupo NO_2 a 1660 - 1500 e 1390 - 1260 cm^{-1} região. A banda dos grupos carboxílicos ou carbonilo também aparecem na mesma região.

Desta forma, seria de esperar, que a banda a $1654,23\text{ cm}^{-1}$, característica da prata, sofresse um desvio para $1583,04\text{ cm}^{-1}$, o que era indicativo da formação de grupos carbonilos metálicos. Isto é devido à estabilização das AgNPs por parte do grupo $-\text{COO}-$ do citrato de sódio. [56]

4.4.4) Análise Térmica

Olhando para o termograma do cartão com e sem nanopartículas, verifica-se uma primeira perda de massa por parte dos substratos, a uma temperatura de 93°C .

Esta perda diz respeito à evaporação da água. A segunda perda verificada, diz respeito à degradação da celulose. Esta ocorre entre os 300 e os 360°C para os substratos analisados, e corresponde a uma perda de massa de $62,64\%$ para o cartão, $60,5\%$ para o cartão com 2mM de AgNPs, $59,58\%$ para o cartão com 10mM de AgNPs, $57,35\%$ para o cartão com 25mM de AgNPs e $55,42\%$ para o cartão com 50mM de AgNPs.

Quanto maior é a concentração da suspensão de prata impregnada no substrato de papel, maior é a percentagem de massa pois com a degradação do papel restam apenas as AgNPs, como se pode ver na figura 52.

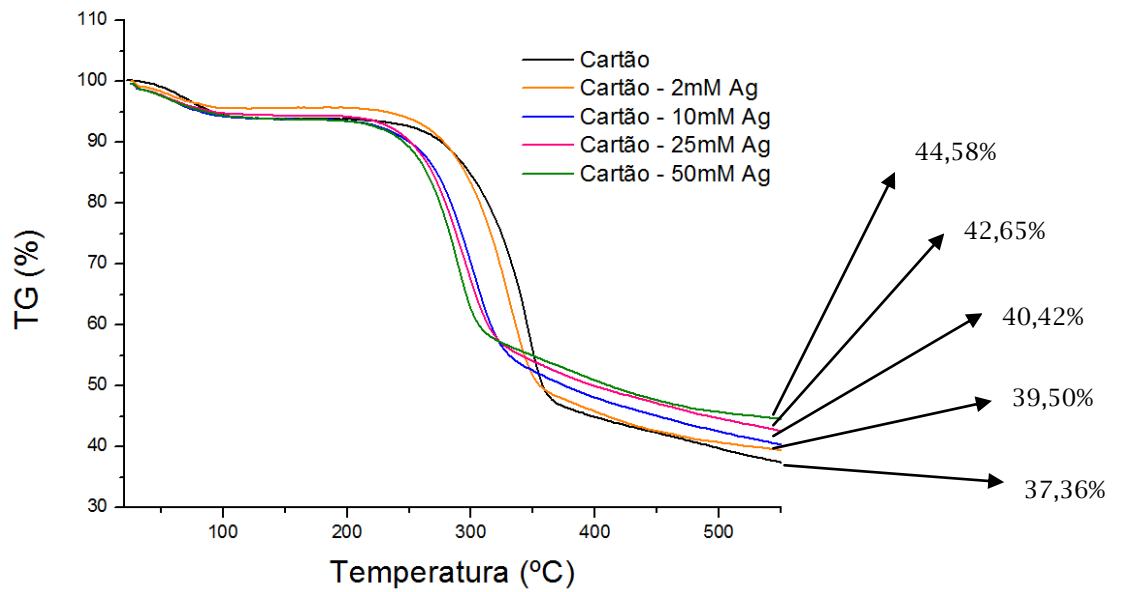


Figura 52: Análise termogravimétrica do cartão com e sem nanopartículas de prata.

Outro facto importante que se verifica ao analisar este espectro é que a degradação dos substratos impregnados se degradarem a temperaturas cada vez menores, quanto maior é a concentração de nanopartículas neles presentes. Isto acontece pois a prata é o melhor condutor de calor conhecido, pelo que quanto maior a quantidade de prata presente na amostra, maior é a condução térmica, sendo necessário menos temperatura para degradar o substrato em questão.

Conclusões/perspectivas futuras

O papel é um material comum no nosso dia-a-dia principalmente pelas suas aplicações em cromatografia e filtração.

Além de ser um material comum nos dias de hoje, este tem ainda aliado outras vantagens como o baixo custo, biodegradabilidade, elevada porosidade e flexibilidade, que fazem dele um substrato apelativo a inúmeras aplicações.

Uma delas, é a aplicação estudada nesta dissertação, nomeadamente, o uso do papel como antibacteriano, uma vez pulverizados com nanopartículas que possuem esta característica.

Desta forma, foram utilizados neste estudo, quatro substratos de papel diferentes: papel de mesa, papel de talheres, saco de refeições de take-away e cartão.

Antes de qualquer caracterização através das diversas técnicas utilizadas ao longo deste estudo, verifica-se que o cartão apresenta uma espessura superior aos restantes substratos.

Através do SEM pode-se concluir que cada papel varia entre si na morfologia das fibras. Assim, o saco de refeições de take-away apresenta fibras cilíndricas, sendo que o papel de mesa e de talheres são constituídos por fibras achatadas.

Já o cartão, não apresenta qualquer tipo de fibra distinto, mas sim, uma estrutura altamente porosa. No entanto, todos os papéis apresentam um emaranhado de fibras, morfologia irregular e formam uma estrutura porosa semelhante.

Por sua vez, o EDS realizado aos quatro substratos utilizados revelou quantidades elevadas de carbono e oxigénio como se esperaria visto tratarem-se de fibras de celulose. Também se verificou a presença de silício e alumínio, do composto kaolinite, utilizado para melhorar as propriedades do papel. Ainda foi detectado cálcio, proveniente doutro aditivo do papel, o carbonato de cálcio. A presença de estes compostos devem-se ao facto do cartão se tratar de um substrato de papel reciclado.

Recorrendo à técnica DRX, que todos os substratos apresentam quatro picos, todos eles pertencentes à estrutura cristalina da celulose do tipo I. Para além dos picos da celulose também se detectaram os picos da kaolinite, para os substratos reciclados (cartão e saco de refeições de take-away) e picos referentes ao carbonato de cálcio para todos os substratos excepto para o papel de talheres, o que corrobora os obtidos previamente por EDS.

Através desta técnica calculou-se o índice de cristalinidade para cada substrato, sendo que os substratos reciclados apresentam um valor inferior aos restantes, como era de se esperar.

Após os testes anti-bacterianos iniciais, concluiu-se que de todos os substratos, o cartão foi o que demonstrou maior actividade anti-bacteriana contra as cinco estirpes bacterianas testadas. Estudou-se o efeito da concentração de AgNPs na actividade anti-bacteriana de

substrato de cartão funcionalizado. Verificou-se que, à medida que a concentração de AgNPs aumentou, o tamanho do halo de inibição e, conseqüentemente a actividade anti-bacteriana, aumentou também. No entanto, a diferença entre 25 e 50 mM não foi tão grande como se esperaria, provavelmente porque ocorreu saturação do cartão devido à elevada concentração de nanopartículas de prata.

Concluiu-se que mecanismo de inibição biológica mais correcto, poderá dever-se à libertação de iões de prata que irá promover um efeito anti-bacteriano através da atracção electrostática entre as cargas negativas da membrana celular dos microorganismos e a carga positiva das nanopartículas, promovendo a ligação dos iões Ag^+ aos grupos de proteínas funcionais, resultando numa desprotonação proteica. Os iões de Ag^+ tornam-se, assim, extremamente tóxicos para as bactérias.

A caracterização morfológica destes substratos forneceu algumas informações importantes.

Assim, utilizando SEM verificou-se que de 25mM para 50mM, o aumento no tamanho das nanopartículas esperado não se verificou. No entanto, verificou-se a presença de agregados com o aumento de concentração, uma vez que é maior o número de partículas em solução. A sua agregação leva a uma diminuição da sua área superficial e portanto, uma diminuição da sua actividade antibacteriana. Isto explica o facto de os halos para 50mM de AgNPs não serem muito superiores aos halos para 25mM de AgNPs.

Através do DRX, é detectado um ligeiro pico aos 38° , que corresponde ao plano cristalográfico (111), e que é um dos picos característicos da estrutura cristalina da prata. No entanto a sua intensidade é muito diminuta para podermos calcular o valor do tamanho da cristalite.

Através do FTIR podemos observar que os principais componentes deste substrato são o carbono e o oxigénio. Infelizmente não se verificou nenhuma banda correspondentes as AgNPs.

Por último a análise térmica revela duas perdas de massa: a primeira referente à evaporação da água e a segunda referente à degradação da celulose. Quanto maior a concentração de AgNPs maior é a percentagem de massa residual de AgNPs que permanece no substrato.

Um estudo interessante seria testar o uso de dispersantes para optimizar a dispersão das ZnONPs. No caso do ZnO, o PMAA (polimetacrilato de amónia) pode ser usado. Também se pode recorrer a solventes orgânicos como alternativa à água. Por exemplo, no caso do óxido de tungsténio, o ideal seria um solvente não polar, como o HMDS, que irá tornar as nanopartículas solúveis e que se ligará covalentemente à superfície das NPs, protegendo-as, evitando assim a sua aglomeração.

Outros estudos, seria a esterilização dos substratos de papel impregnados através do uso do autoclave, uma vez que em alguns dos substratos usados nos estudos iniciais verificou-se a presença de esporos, que com o tratamento sob luz ultravioleta, não foi eficaz para os eliminar.

Também se poderia estudar o efeito que o corte por parte da impressora a laser terias nos substratos já pulverizados, bem como outra técnicas de pulverização e secagem dos mesmos.

Bibliografia

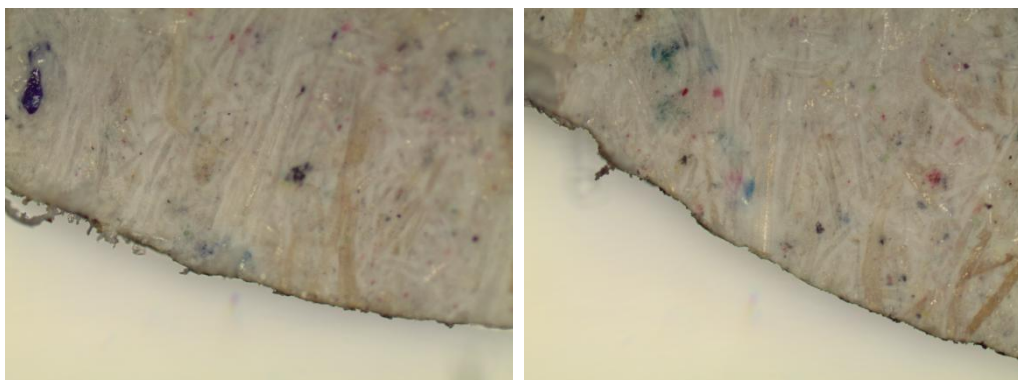
- [1] J. C. Roberts, *The Chemistry of Paper*. The Royal Society of Chemistry, 1996.
- [2] Fengel, D., Wegener, G., 'Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions', Walter de Gruyter, Berlin (1984).
- [3] Chiang, V. L., Puumala, R. J., Takenchi, H., Eckert, R. E., 'Comparison of softwood and hardwood kraft pulping', *Tappi J.* 71, 9 (1988) 173-176.
- [4] Henriksson, G., Ek, M., Gellerstedt, G. - *Wood Chemistry and Biotechnology*. Berlin: De Gruyter, Vol.1, 2009.
- [5] D. von Keressenbrock-Krosigk, *Rubinglas des ausgehenden 17. und des 18. Jahrhunderts*, Verlag Philipp von Zabern, Mainz, 2001.
- [5] J. Z. Zhang, C. Noguez, "Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures", *Plasmonics* 2008, 3, 127.
- [7] R. Indumathy, "Bifunctional Role of Thiosalicylic Acid in the Synthesis of Silver Nanoparticles," *Materials Sciences and Applications*, vol. 1, no. 5, pp. 272-278, 2010.
- [8] K.-sen Chou and C.-yuh Ren, "Synthesis of nanosized silver particles by chemical reduction method," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 64, no. 1999, pp. 241-246, 2000.
- [9] I. A. Kawabata, R. Kubo: *J. Phys. Soc. Jpn.* **21**, 1765 (1966)
- [10] U. Kreibig, M. Vollmer: *Optical Properties of Metal Clusters* (Springer, Berlin 1995)
- [11] C. Flytzanis, F. Hache, M.C. Klein, D. Ricard, P. Roussignol: In *Progress in Optics*, Vol. XXIX, ed. by E. Wold (North-Holland, Amsterdam 1991) p. 321.
- [12] D. Ricard: In *Nonlinear Optical Materials: Principles and Applications*, ed. by V. Degiorgio, C. Flytzanis (IOS Press, Amsterdam 1995) p. 289.
- [13] R.F. Haglund: In *Handbook of Optical Properties*, Vol. 2, ed. By R.E. Hummel, P. Wissmann (CRC Press, New York 1997) p. 191.
- [14] Dang, T.M.D.; T. Le, .T.T.; Fribourg-Blanc, E.; Dang, "Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method", *M.C. Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 2011, 2.
- [15] Singh, P.; Katyal, A.; Kalra, R.; Chandra, "Copper nanoparticles in an ionic liquid: an efficient catalyst for the synthesis of bis-(4-hydroxy-2-oxothiazolyl) methanes", *R. Tetrahedron Lett.* 2008, 49, 727-730.
- [16] Kim, H.-S.; Dhage, S.; Shim, D.-E.; Hahn, "Intense pulsed light sintering of copper nanoink for printed electronics", *H.T. Appl. Phys. A.* 2009, 97, 791.
- [17] Y. Lee, J. Choi, K. J. Lee, N. E. Stott and D. Kim: *Nanotech.* 19 (2008) 415-604.
- [18] Wei Hao Lai, Yen Hsun Su, Lay Gaik Teoh, Yuan Tsung Tsai and Min Hsiung Hon, "Synthesis of Tungsten Oxide Particles by Chemical Deposition Method", *Materials Transactions*, Vol. 48, No. 6 (2007) pp. 1575-1577.
- [19] De M, Ghosh P S and Rotello V M 2008 *Adv. Mater.* **20** 4225.
- [20] Lu A-H, Salabas E L and Ferdi Schuth 2007 *Angew. Chem.Int. Ed. Engl.* **46** 1222.
- [21] Ghosh Chaudhuri R and Paria S 2012 *Chem. Rev.* **112** 2373.
- [22] Sharma V K, Yngard R A and Lin Y 2009 *Adv. Colloid Sur.Interface* **145** 83.
- [23] Monteiro D R et al 2009 *Antimicrob. Agents* **34** 103.
- [24] Ahamed M, Alsalmi M S and Siddiqui M K 2010 *Clin. Chim.Acta* **411** 1841.

- [25] Quang Huy Tran, Van Quy Nguyen and Anh-Tuan Le, "Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives", *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 4 (2013) 033001.
- [26] C. Feldmann and H. Goesmann, "Nanoparticulate Functional Materials", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 1362 - 1395.
- [27] Mohammad J. Hajipour, Katharina M. Fromm, Ali Akbar Ashkarran, Dorleta Jimenez de Aberasturi, Idoia Ruiz de Larramendi, Teofilo Rojo, Vahid Serpooshan, Wolfgang J. Parak and Morteza Mahmoudi, "Antibacterial properties of Nanoparticles", *Trends in Biotechnology* October 2012, Vol. 30, No. 10.
- [28] Witte, W. (2004) "International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens". *Infect. Genet. Evol.* 4, 187-191.
- [29] von Nussbaum, F. et al. (2006) Antibacterial natural products in medicinal chemistry - exodus or revival? *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 5072-5129.
- [30] Raffi M, Mehrwan S, Bhatti TM, et al. "Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*". *Ann Microbiol.* 2010;60:75-80.
- [31] Lee C-R, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. "Strategies to Minimize Antibiotic Resistance". *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(9):4274-4305.
- [32] El Zowalaty ME. "Alarming trend of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates". *Journal of Pure and Applied Microbiology.* 2012;6(1):175-183.
- [33] Díaz-Visurraga J, Daza C, Pozo C, et al. "Study on antibacterial alginate-stabilized copper nanoparticles by FTIR and 2D-IR correlation spectroscopy". *Int J Nanomedicine.* 2012;7:3597-3612.
- [34] Clarence Suh Yah, Geoffrey Simate Simate and Sunny Esayegbemu Iyuk, "Nanoparticles toxicity and their routes of exposures", *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.25, No.2, April 2012, pp.477-491 477
- [35] D. A. Skoog - D. M. West - F. J. Holler: *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Saunders College Publishing, Fort Worth, US 1992.)
- [36] J. Kenkel: *Analytical Chemistry for Technicians* (Lewis Publishers, Boca Raton, US 1994.)
- [37] *Scanning Electron Microscopy, Applications to materials and device science* P.R.Thornton, Chapman and Hall Ltd,1968.
- [38] *Scanning Electron Microscopy, Physics of Image Formation and Microanalysis*, Ludwig Reimer.,Springer-Verlag, 1985.
- [39] C. R. Brundle, C. A. Evans, and S. Wilson, *Encyclopedia of Materials Characterization*. Greenwich: Manning Publications Co., 1992.
- [40] P. Echlin, *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2009.
- [41] Joseph Goldstein (2003). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*
- [42] B. Cullity, "Elements of X-ray Diffraction," 2001.
- [43] Clark NA, Lunacek JH, Benedek GB, A study of brownian motion using light scattering, *American Journal of Physics*, 38 (5), p575-585, (1970)
- [44] T. Hatakeyama and F. X. Quinn, *Thermal Analysis Fundamentals and Applications to Polymer Science*, Second Edi. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons, Inc.
- [45] Asta Šileikaite, Algimantas Juraitis, Igoris Prosycevas, Asta Guobiene and Judita Puiso, "Analysis of Silver Nanoparticles Produced by Chemical Reduction of Silver Salt Solution", *Materials Science*, Vol. 12, No. 4, 1320-1392, 2006

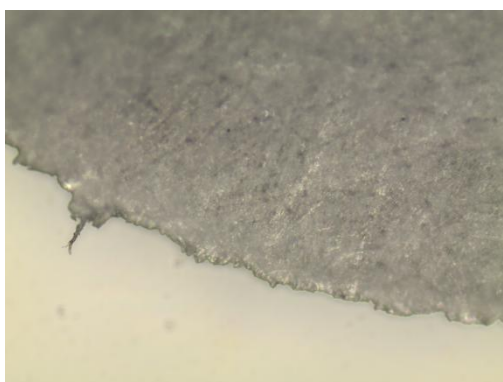
- [46] Pinto, T. J. A., Kaneko, T. M., Ohara, M.T. "Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2ed. São Paulo: Atheneu, p.7-56, 261-287, 2003.
- [47] Mohammad Reza Arefi and Saeed Rezaei-Zarchi, "Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Effect on the Compressive Strength and Setting Time of Self-Compacted Concrete Paste as Cementitious Composites", *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 4340-4350.
- [48] A. Henglein, Physicochemical properties of small metal particles in solution: microelectrode reactions, chemisorptions, composite metal particles and the atom-to-metal transition, *J. Phys. Chem.*, 97 (1993), 5457-5471.
- [49] P. Mulvaney," Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles", *Langmuir*, 12 (1996), 788-800.
- [50] Ratyakshi and R. P. Chauhan, "Colloidal Synthesis of Silver Nano Particles", *Asian Journal of Chemistry*, Vol.21, No.10 (2009), pp.113-116.
- [51] G. Carotenuto, G.P. Pepe and L. Nicolais "Preparation and characterization of nano-sized Ag/PVP composites for optical applications", *European Physical Journal B*, Vol.16, no.1, pp.11-17, 2000.
- [52] Nilofar Asim, S. Radiman and M. Ambar bin Yarmo," Preparation of WO₃ nanoparticles Using Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide Supramolecular Template", *American Journal of Applied Sciences* 6 (7): 1424-1428, 2009.
- [53] K. K. Pandey, "A Study of Chemical Structure of Soft and Hardwood and Wood Polymers by FTIR Spectroscopy," *Polymer*, vol. 71, no. May, pp. 1969-1975, 1998.
- [54] M. C. Silva, O. R. Lopes, J. L. Colodette, a. O. Porto, J. Rieumont, D. Chaussy, M. N. Belgacem, and G. G. Silva, "Characterization of three non-product materials from a bleached eucalyptus kraft pulp mill, in view of valorizing them as a source of cellulose fibres," *Industrial Crops and Products*, vol. 27, no. 3, pp. 288-295, May 2008.
- [55] A. Synytsya, "Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins," *Carbohydrate Polymers*, vol. 54, no.1, pp. 97-106, Oct. 2003.
- [56] R. Augustine, K. Rajarathinam, "Synthesis and characterization of silver nanoparticles and its immobilization on alginate coated sutures for the prevention of surgical wound infections and *in vitro* release studies", *Int.J.Nano Dim.* 2(3): 205-212, 2012.

Anexos

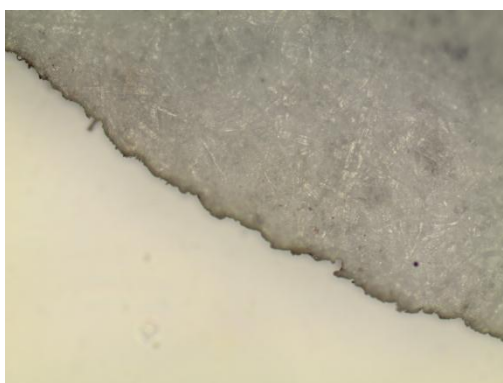
Anexo I - Influência dos parâmetros de corte da impressora a laser nos diferentes substratos de papel.



AnexoI.1: Observação microscópica do cartão. A) Parâmetros: P=40, S=100 e R=500. B) Parâmetros: P=45, S=100 e R=500.

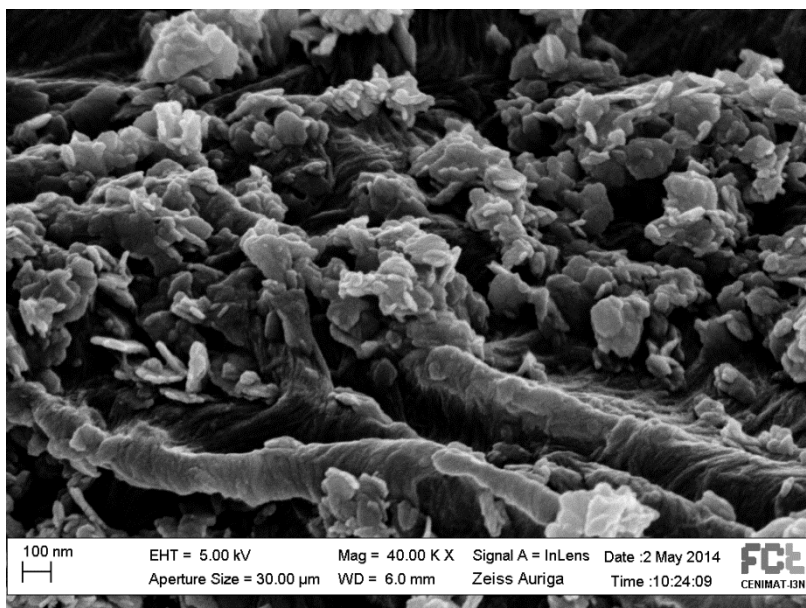


AnexoI.2: Observação microscópica do papel de talheres. Parâmetros: P=5, S=100 e R=500.

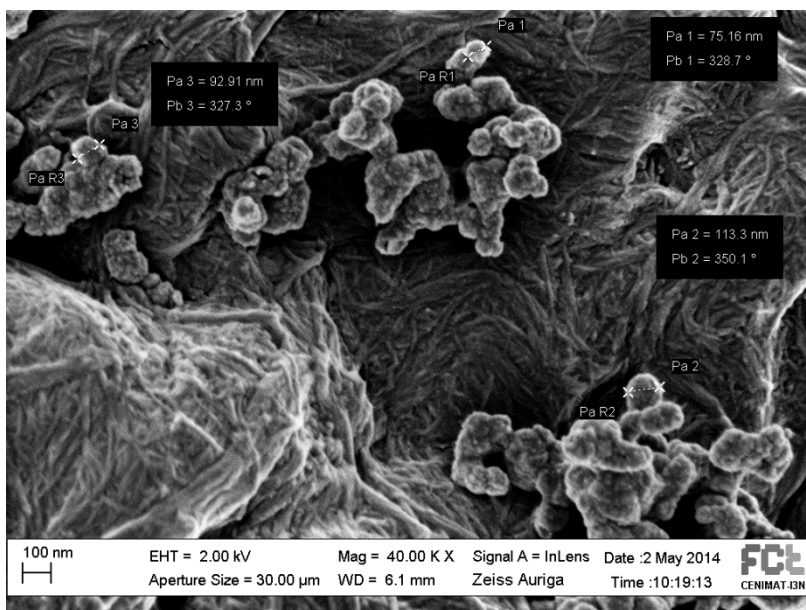


AnexoI.3: Observação microscópica do papel de mesa. Parâmetros: P=6, S=100 e R=500.

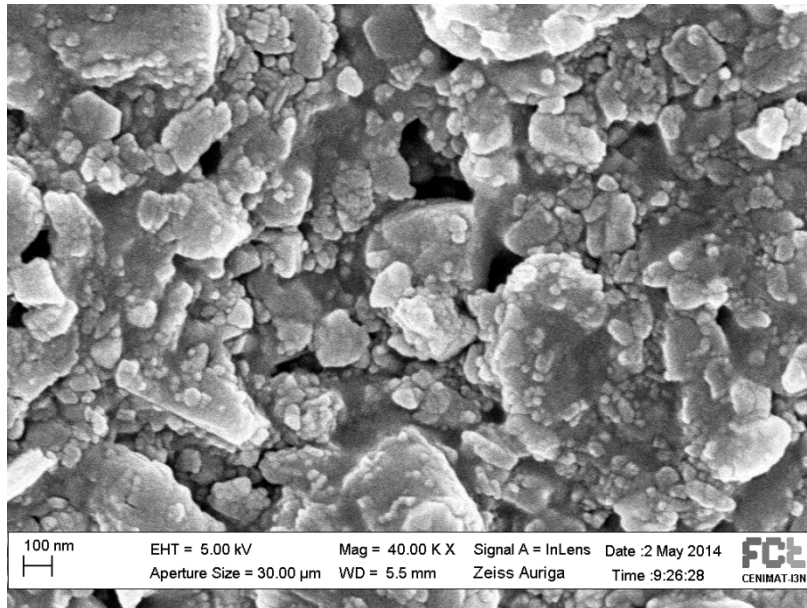
Anexo II - Imagens obtidas por SEM dos vários substratos pulverizados com as diferentes nanopartículas utilizadas.



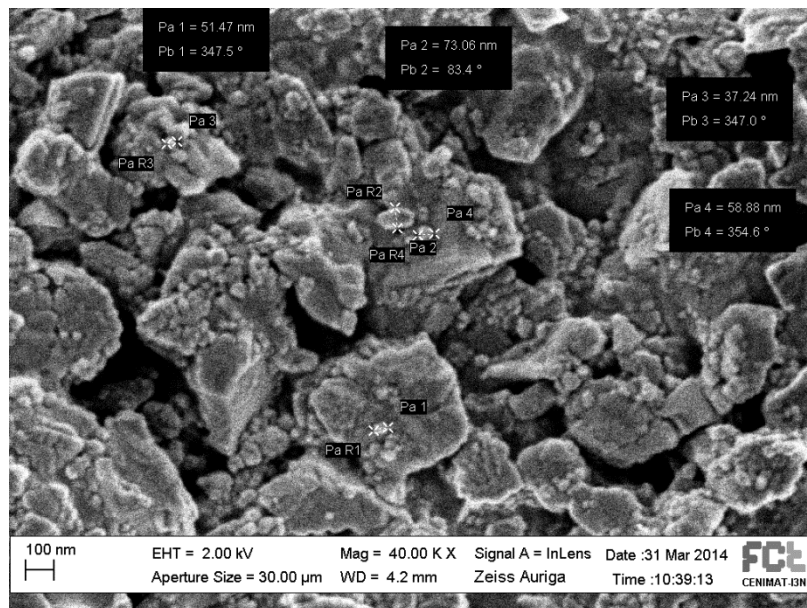
AnexoII.1: Imagens obtidas por SEM do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de óxido de zinco comerciais.



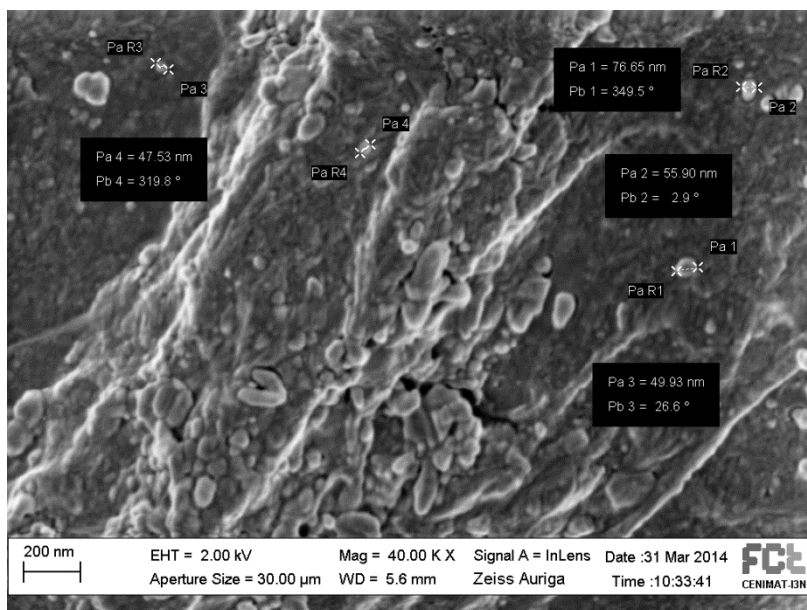
AnexoII.2: Imagens obtidas por SEM do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de cobre comerciais.



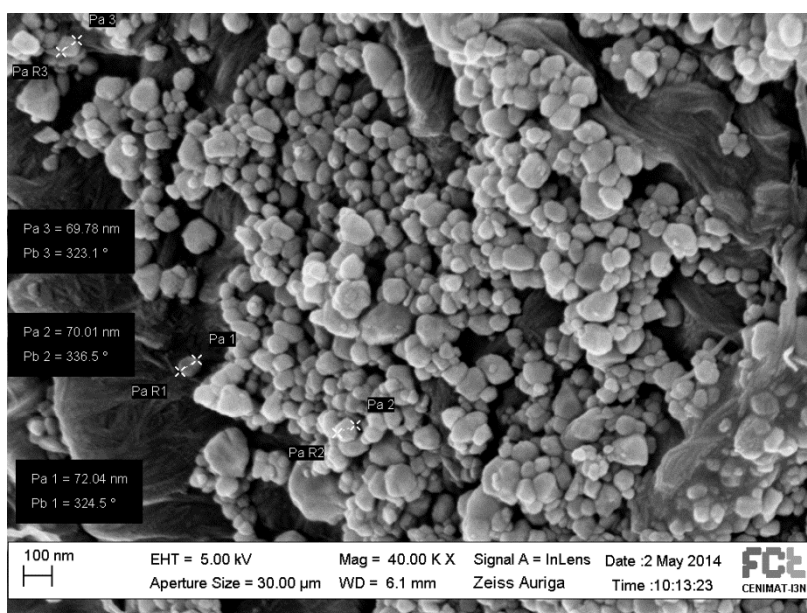
AnexoII.3: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 10mM de nanopartículas de prata antes da exposição aos raios UV.



AnexoII.4: Imagens obtidas por SEM do cartão contendo 10mM de nanopartículas de prata depois da exposição aos raios UV.

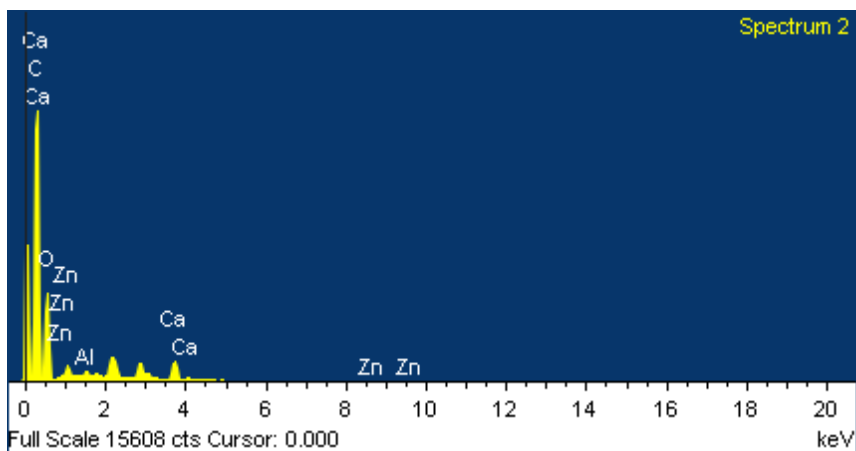


AnexoII.5: Imagens obtidas por SEM do saco de refeições de take-away contendo 10mM de nanopartículas de prata depois da exposição aos raios UV.

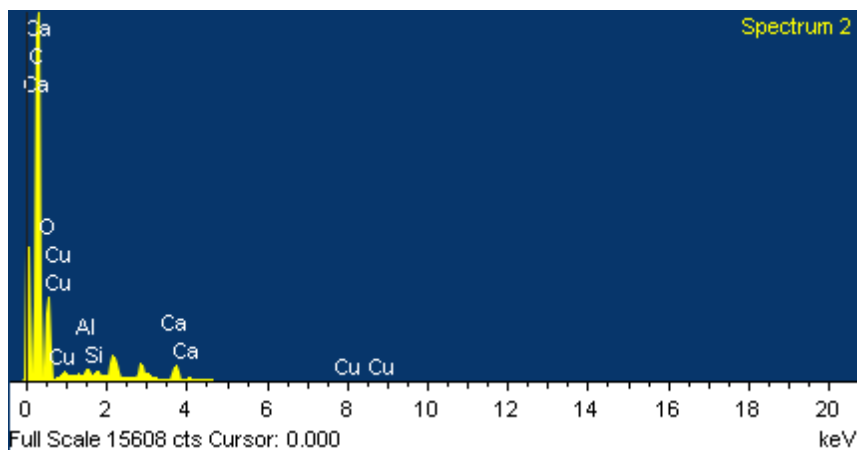


AnexoII.6: Imagens obtidas por SEM do papel de mesa contendo 10mM das nanopartículas de óxido de tungstênio comerciais.

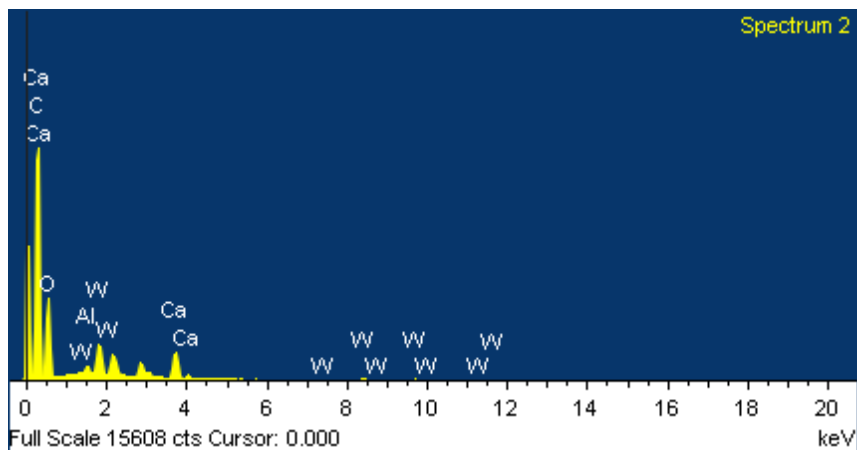
Anexo II - Imagens obtidas por EDS dos vários substratos pulverizados com as diferentes nanopartículas utilizadas.



AnexoIII.1: Espectro de EDS do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de óxido de zinco comerciais.

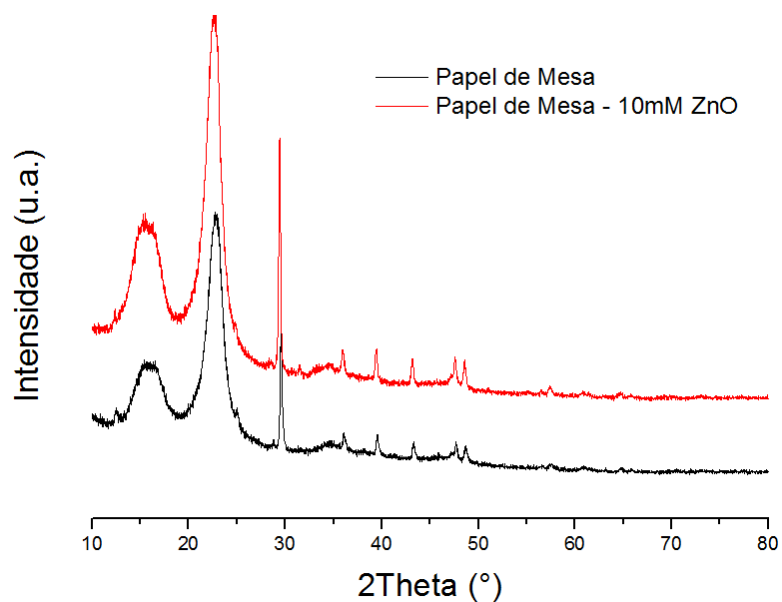


AnexoIII.2: Espectro de EDS do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de cobre comerciais.

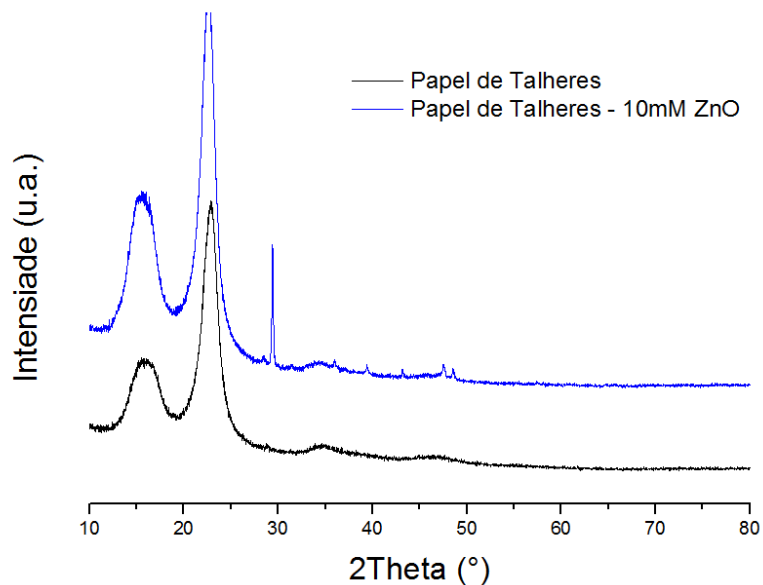


AnexoIII.3: Espectro de EDS do papel de mesa contendo 10mM de nanopartículas de óxido de tungstênio comerciais.

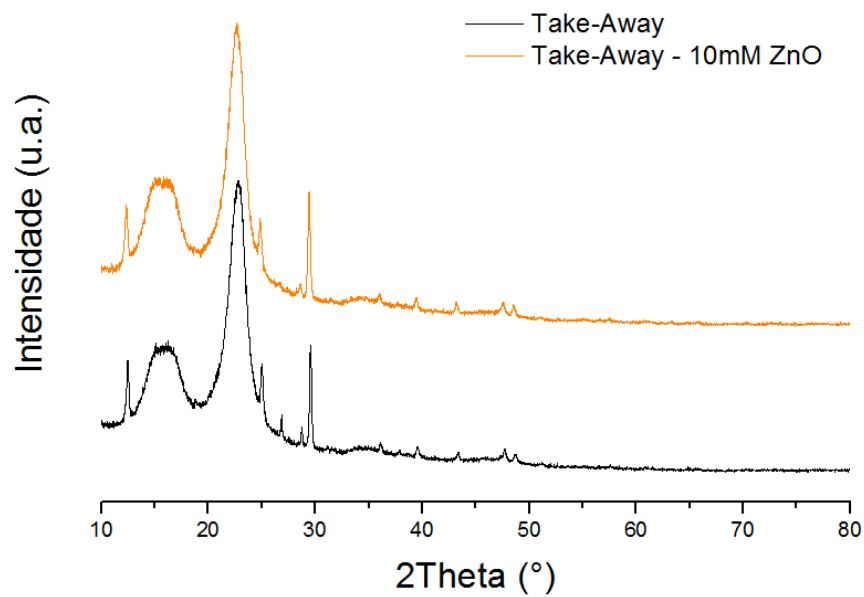
Anexo IV - Imagens obtidas por DRX dos vários substratos pulverizados com as diferentes nanopartículas utilizadas.



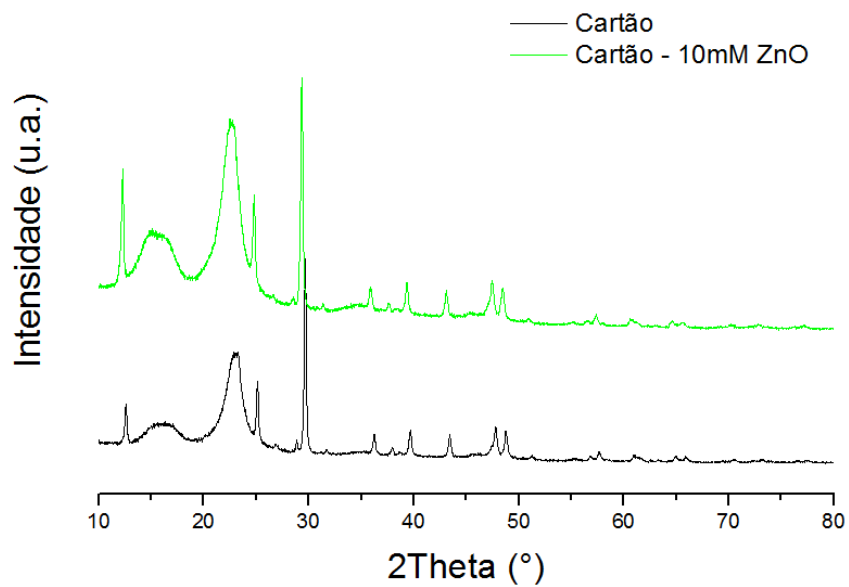
Anexo IV.1: Diffractograma obtido por Raios-X do papel de mesa com e sem nanopartículas de óxido de zinco comerciais.



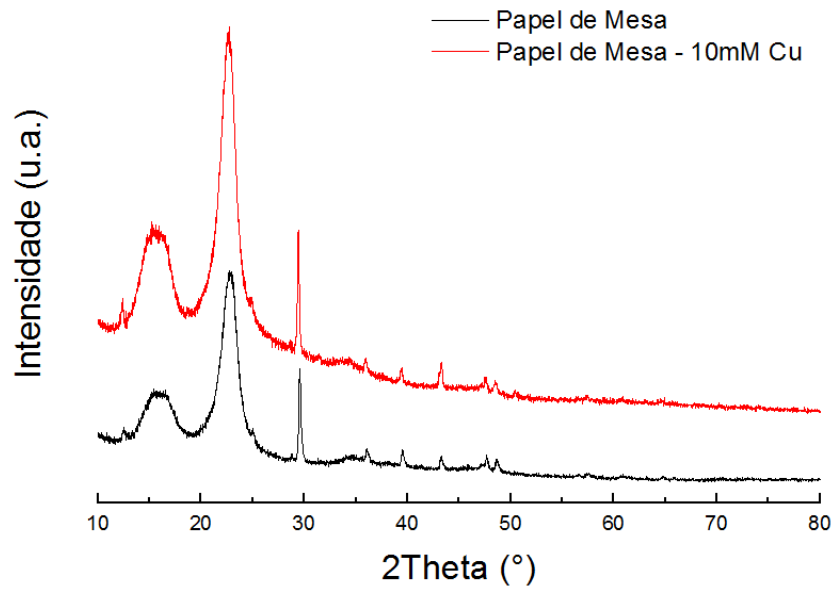
Anexo IV.2: Diffractograma obtido por Raios-X do papel de talheres com e sem nanopartículas de óxido de zinco comerciais.



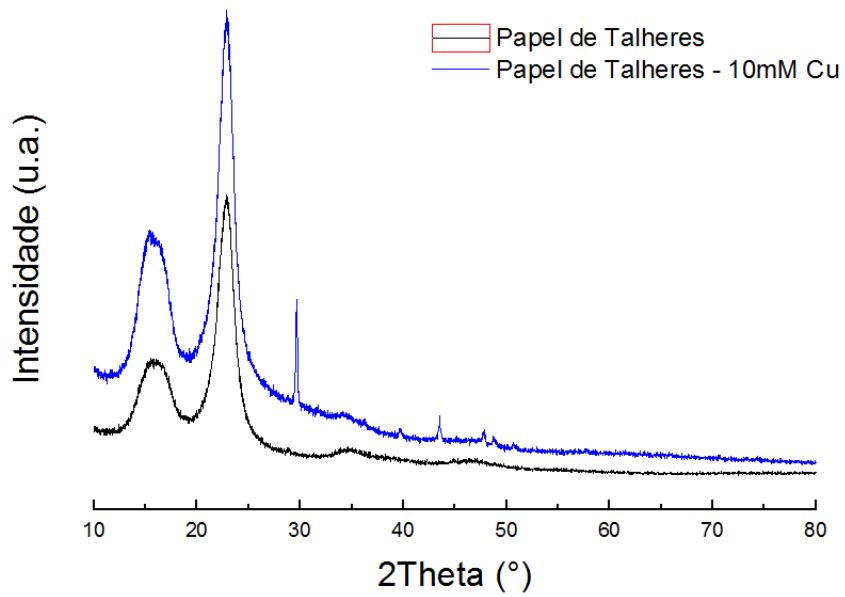
Anexo IV.3: Difractograma obtido por Raios-X do saco de refeições de take-away com e sem nanopartículas de óxido de zinco comerciais.



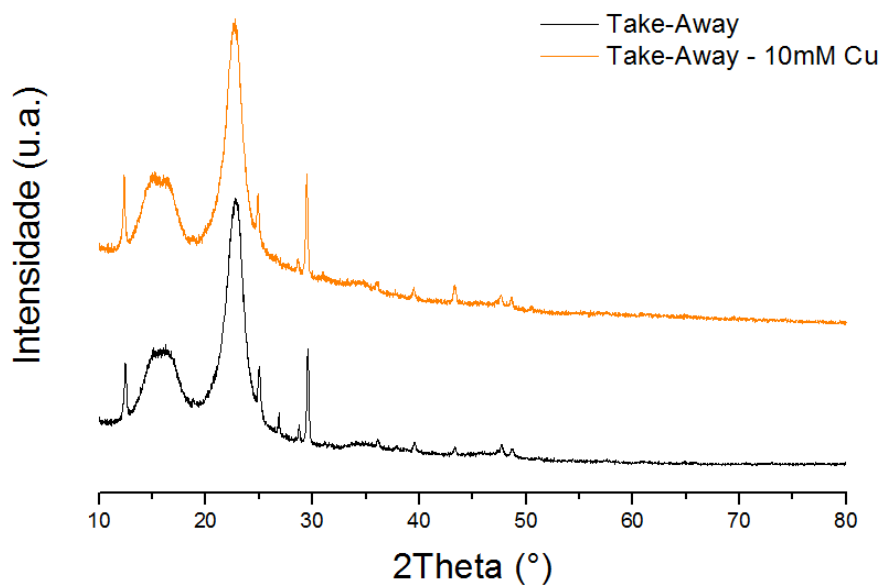
Anexo IV.4: Difractograma obtido por Raios-X do cartão com e sem nanopartículas de óxido de zinco comerciais.



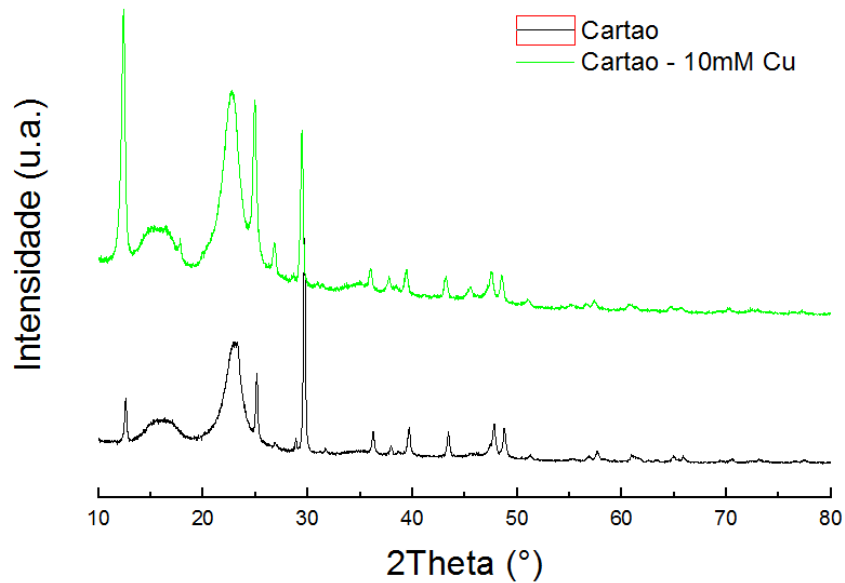
Anexo IV.5: Difractograma obtido por Raios-X do papel de mesa com e sem nanopartículas de cobre comerciais..



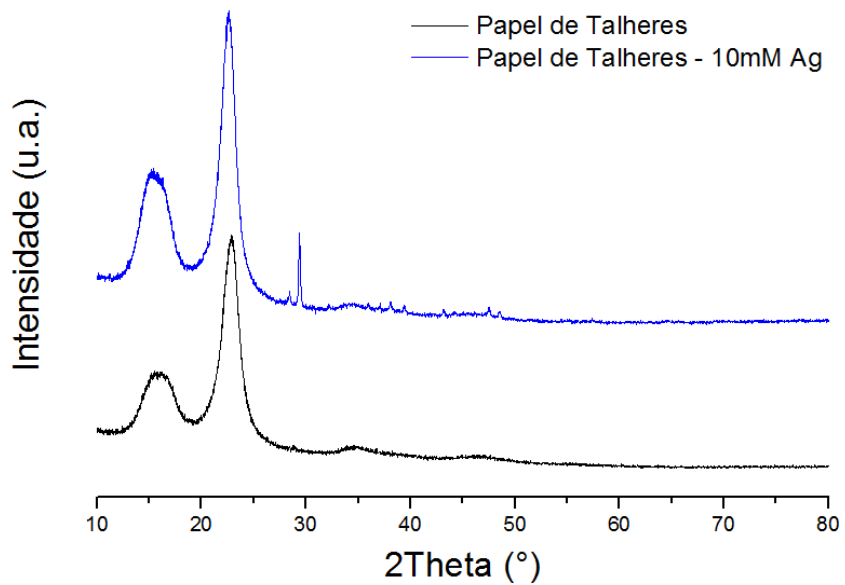
Anexo IV.6: Difractograma obtido por Raios-X do papel de talheres com e sem nanopartículas de cobre comerciais..



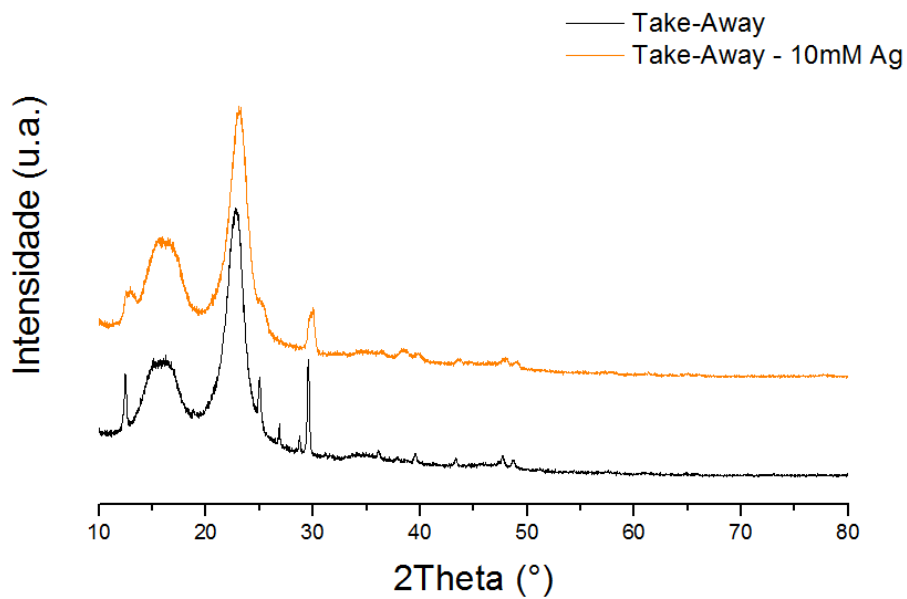
Anexo IV.7: Diffractograma obtido por Raios-X do saco de refeições de take-away com e sem nanopartículas de cobre comerciais.



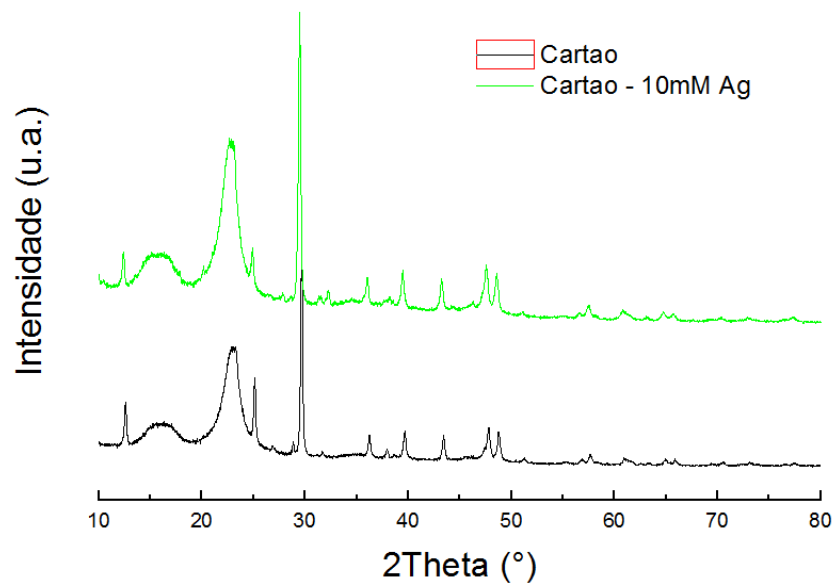
Anexo IV.8: Diffractograma obtido por Raios-X do cartão com e sem nanopartículas de cobre comerciais.



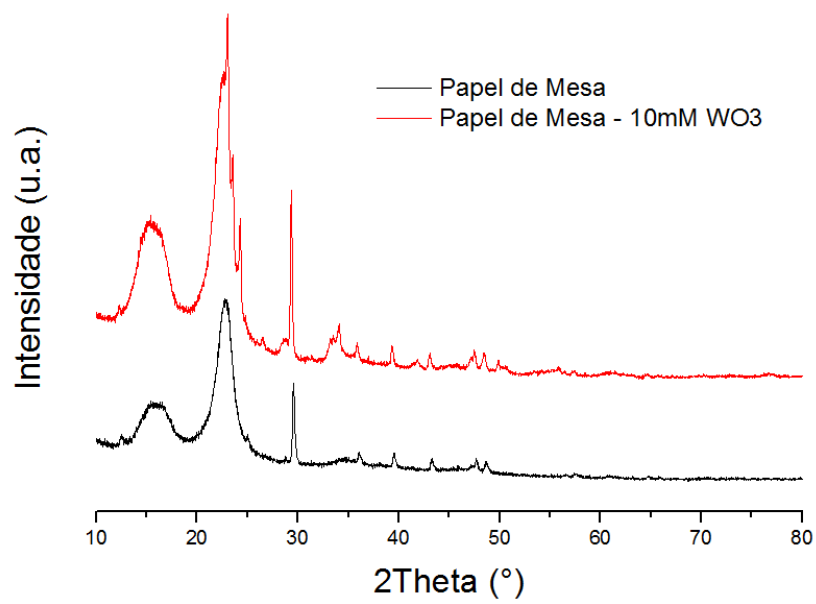
Anexo IV.9: Difractograma obtido por Raios-X do papel de talheres com e sem nanopartículas de prata.



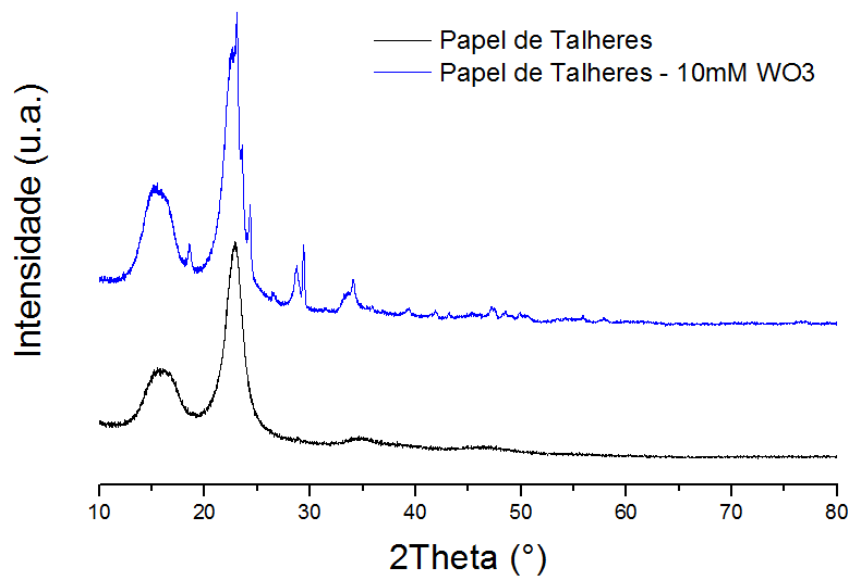
Anexo IV.10: Difractograma obtido por Raios-X do saco de refeições de take-away com e sem nanopartículas de prata.



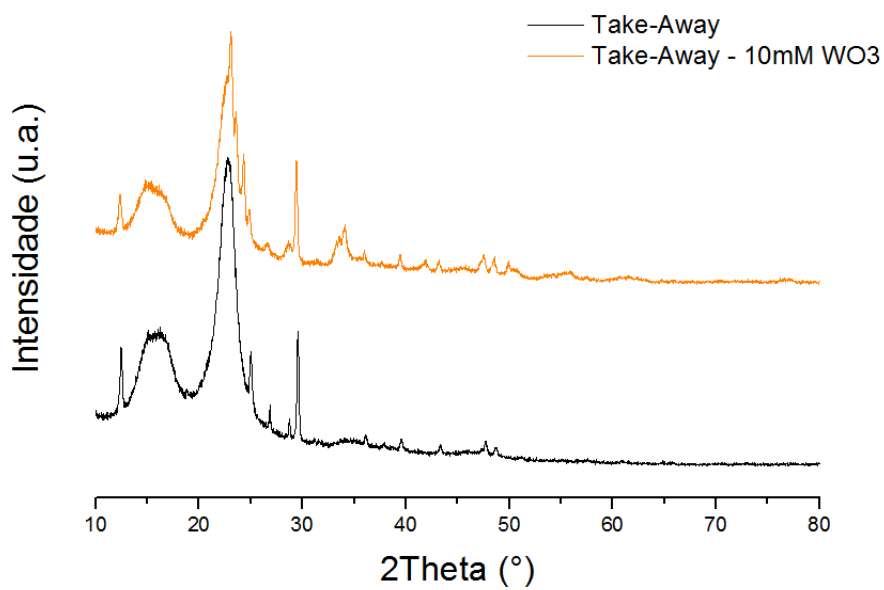
Anexo IV.11: Difractograma obtido por Raios-X do cartão com e sem nanopartículas de prata.



Anexo IV.12: Difractograma obtido por Raios-X do papel de mesa com e sem nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais.



Anexo IV.13: Diffractograma obtido por Raios-X do papel de talheres com e sem nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais.



Anexo IV.14: Diffractograma obtido por Raios-X do saco de refeições de take-away com e sem nanopartículas de óxido de tungsténio comerciais.

