



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Joana Luísa Padrão Cruz Costa e Silva

Desenvolvimento de membranas de acetato de celulose contendo nanopartículas de prata/alumínio



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Joana Luísa Padrão Cruz Costa e Silva

Desenvolvimento de membranas de acetato
de celulose contendo nanopartículas de
prata/alumínio

Dissertação de Mestrado
Ciclo de Estudos Integrados Conducentes ao
Grau de Mestre em Engenharia de Polímeros

Trabalho efetuado sob a orientação do
Doutora Ana Sofia Abreu
Professora Doutora Ana Vera Machado

DECLARAÇÃO

Nome: Joana Luísa Padrão Cruz Costa e Silva

Endereço eletrónico: joana.luisa.silva@gmail.com

Telemóvel: 916296253

Número do Cartão de Cidadão: 13362317

Título da dissertação:

Desenvolvimento de membranas de acetato de celulose contendo nanopartículas de prata/alumínio

Orientador(es):

Doutora Ana Sofia Abreu

Professora Doutora Ana Vera Machado

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado:

Mestrado Integrado em Engenharia de Polímeros

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Com a conclusão desta dissertação de Mestrado, várias foram as pessoas que me orientaram e ajudaram para que o trabalho fosse concluído. A essas pessoas gostaria de deixar algumas palavras.

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Doutora Ana Sofia Abreu pela oportunidade de realizar este trabalho, assim como pela sua orientação, disponibilidade, incentivo, paciência e simpatia. Obrigada pela ajuda nos trabalhos laboratoriais, tratamento e interpretação de resultados, mas sobretudo pelos conselhos e conversas.

À minha coorientadora, Professora Doutora Ana Vera Machado pelo apoio e orientação, assim como pela sua disponibilidade e ajuda no tratamento e interpretação de resultados.

Agradeço ainda ao Doutor Manuel Oliveira pela colaboração e ajuda na deposição das nanopartículas de alumínio, bem como a simpatia e o apoio nas discussões e interpretações de resultados.

Ao Centro de Engenharia Biológica pelo equipamento e material disponibilizado. Um especial agradecimento à Célia Cruz pela colaboração e ajuda na realização dos ensaios.

Quero também agradecer aos meus colegas de laboratório, Ana Lima, Gabriela Azevedo e Isabel Moura pelos bons momentos, simpatia e colaboração durante o trabalho de investigação.

Ao Engenheiro Maurício Malheiro não posso deixar de referir o meu reconhecimento pela ajuda prestada na realização dos ensaios e preparação de amostras.

Quero também agradecer aos meus amigos, particularmente à Joana Braz e ao Ricardo Sora pelos grandes momentos proporcionados que serviram de fuga à falta de inspiração.

Por fim, gostaria de agradecer ao Salvador e à minha tia Carla pela compreensão e apoio, assim como o auxílio prestado na reta final desta dissertação. Aos meus pais agradeço pela paciência, amor incondicional e disponibilidade permanente demonstrados durante a realização deste trabalho de investigação, assim como o incentivo para levar avante esta dissertação.

Resumo

O objetivo da presente dissertação consiste em desenvolver e avaliar o potencial de uma membrana biopolimérica de acetato de celulose (AC), contendo nanopartículas de prata (Ag-NPs) e/ou alumínio (Al-NPs) no tratamento e remediação de meios aquáticos. Para esse efeito, foram sintetizadas membranas de AC contendo Ag-NPs e/ou Al-NPs através do método de evaporação do solvente, obtendo-se Ag-NPs por redução química do nitrato de prata (AgNO_3) com o agente redutor, borohidreto de sódio (NaBH_4). As Al-NPs foram obtidas por síntese *in situ* de um precursor à base de alumínio, o isopropóxido de alumínio ($\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$) na presença de ácido clorídrico (HCl). Investigou-se ainda o efeito da estabilização das Ag-NPs através da incorporação de um surfactante, o poloxamer 407 (P407).

As membranas de AC contendo Ag-NPs com e sem a presença do P407 foram caracterizadas através de ensaios de microscopia eletrônica de varrimento (SEM), espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS), dispersão de luz dinâmica (DLS), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), espectroscopia UV-Visível, análise dinâmico-mecânica (DMA) e medição de ângulos de contacto, assim como através de estudos da atividade antibacteriana. Como o principal objetivo desta dissertação consiste no desenvolvimento de uma membrana de nanocompósito para duas possíveis aplicações no tratamento de água contaminadas, inibir/remover microrganismos e o ião fosfato, foram realizados estudos da atividade antibacteriana, assim como estudos cinéticos de adsorção de fósforo.

Da caracterização das membranas obtidas conclui-se que a incorporação de Ag-NPs na matriz de AC induziu uma melhoria das propriedades térmicas e mecânicas relativamente às de AC puro. Enquanto, a incorporação de P407 introduziu modificações superficiais na matriz de AC tornando-a mais hidrofílica. Resultados obtidos no estudo cinético de adsorção de fósforo nas membranas contendo Ag-NPs e Al-NPs confirmaram a eficiência destas membranas na remoção do fósforo. Relativamente ao carácter antibacteriano destas, este foi comprovado *in situ*, no qual se verificou o efeito bactericida nos testes realizados em águas com bactérias em suspensão.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata, nanopartículas de alumínio, poloxamer 407, membrana de nanocompósito, acetato de celulose, fósforo, atividade antibacteriana.

Abstract

The aim of this dissertation is to develop and evaluate the potential of a biopolymeric membrane of cellulose acetate (CA), containing silver nanoparticles (Ag-NPs) and/or aluminum nanoparticles (Al-NPs) for the treatment and remediation of aquatic environments. For this purpose, CA membranes containing Ag-NPs and/or Al-NPs were synthesized by solvent casting, resulting in Ag-NPs obtained by chemical reduction of silver nitrate (AgNO_3) with the reducing agent, sodium borohydride (NaBH_4). The Al-NPs were obtained by *in situ* synthesis of an aluminum-based precursor, aluminum isopropoxide ($\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$) in the presence of hydrochloric acid (HCl). The stabilization effect of Ag-NPs through the incorporation of a surfactant, poloxamer 407 (P407), was also investigated.

The CA membranes containing Ag-NPs with and without the presence of P407 were characterized by scanning electron microscopy (SEM), dispersive X-ray spectroscopy (EDS), dynamic light scattering (DLS), Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetry analysis (TGA), ultraviolet-visible absorption spectroscopy, dynamic mechanical analysis (DMA), and contact angle measurement, as well as antibacterial activity studies. Since the main objective of this dissertation is the development of a nanocomposite membrane for two possible applications for contaminated water treatment, able to inhibit/remove microorganisms and phosphate ion, antibacterial activity studies, as well as adsorption kinetics of phosphorus studies, were performed.

The characterization of the obtained membranes show that the incorporation of Ag-NPs in the CA matrix induced an improvement of the thermal and mechanical properties of the pure CA. The incorporation of P407 introduced superficial changes in the CA matrix, making the membrane more hydrophilic. Results obtained from the adsorption kinetics of phosphorous studies confirmed the phosphorous removal effectiveness of the CA membranes containing Ag-NPs and Al-NPs. *In situ* CA membranes containing Ag-NPs and Al-NPs antimicrobial behavior was proved, which revealed the bactericidal effect in the performed tests against suspended bacteria in water.

Keywords: Silver nanoparticles, aluminum nanoparticles, poloxamer 407, nanocomposite membrane, cellulose acetate, phosphorus, antibacterial activity.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Abreviaturas	xiii
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xviii
Capítulo I – Introdução	1
1. Enquadramento	3
2. Objetivos	4
3. Organização da Dissertação	5
Capítulo II – Estado da Arte	7
1. Enquadramento	9
2. Nanotecnologia	9
3. Biopolímeros, Acetato de Celulose	9
4. Nanocompósitos	10
4.1. Nanocompósitos poliméricos contendo Ag-NPs	11
4.1.1. Atividade antibacteriana	13
4.2. Nanocompósitos poliméricos contendo Al-NPs	16
5. Estratégias de síntese	18
5.1. Síntese de Ag-NPs por redução com borohidreto de sódio	19
5.2. Síntese de Ag-NPs por incorporação do poloxamer 407	21
Capítulo III – Procedimento Experimental	23
1. Materiais e reagentes	25

2. Preparação dos nanocompósitos.....	26
2.1. Síntese de Ag-NPs	26
2.2. Síntese de Ag-NPs estabilizadas com poloxamer 407	28
2.3. Síntese de Al-NPs	29
2.4. Síntese de Ag-NPs e Al-NPs	29
3. Caracterização dos nanocompósitos	30
3.1. Dispersão dinâmica de luz (DLS)	30
3.2. Espectroscopia de UV-visível	31
3.3. Medição do ângulo de contacto	32
3.4. Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR)	33
3.5. Análise Termogravimétrica (TGA)	33
3.6. Análise mecânica dinâmica (DMA)	34
3.7. Microscopia electrónica de varrimento (SEM).....	35
3.8. Atividade antibacteriana.....	35
3.9. Estudos de remoção de Fósforo.....	37
4. Designação das amostras	37
Capítulo IV – Apresentação e discussão dos resultados	41
1. Caracterização das membranas de nanocompósitos	43
1.1. Membranas de AC contendo Ag-NPs.....	43
1.1.1. Dispersão dinâmica de luz	45
1.1.2. Espectroscopia de UV-visível	48
1.1.3. Medição de ângulo de contacto	51
1.1.4. Espectroscopia de Infravermelhos	53
1.1.5. Análise Termogravimétrica	56
1.1.6. Análise dinâmica mecânica	59

1.1.7. Microscopia eletrónica de varrimento	62
1.1.8. Atividade antibacteriana	67
1.2. Membranas de AC contendo Al-NPs e Ag-NPs	69
1.2.2. Espectroscopia de Infravermelhos	70
1.2.3. Atividade antibacteriana	71
1.2.4. Estudos de remoção de fósforo	72
Capítulo V – Conclusões	75
Propostas de trabalho futuro	79
Referências Bibliográficas	81

Abreviaturas

AC	Acetato de celulose
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
Ag-NPs	Nanopartículas de prata
Al	Alumínio
Al-NPs	Nanopartículas de alumínio
Al(Pr- <i>i</i> O) ₃	Isopropóxido de alumínio
Au	Ouro
Au-NPs	Nanopartículas de ouro
DLS	Dispersão de luz dinâmica
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamide
DMA	Análise mecânica dinâmica
EDS	Espectroscopia dispersiva de raios-X
FTIR	Espectroscopia de Infravermelhos
HCl	Ácido clorídrico
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
P	Fósforo
P407	Poloxamer 407
PEO	Poli(óxido de etileno)
PPO	Poli(óxido de propileno)
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento
SEM/EDS	Microscopia eletrônica de varrimento com microanálise de raio-X
SPR	Banda plasmônica superficial

TGA	Análise termogravimétrica
T_{in}	Temperatura inicial de degradação
T_{max}	Temperatura máxima de degradação
E	Módulo mecânico dinâmico
E'	Módulo de armazenamento de energia
E''	Módulo de perda de energia
Δ	Deformação
$\tan \delta$	Fator de dissipação de energia
γ	Deformação externa
θ	Ângulos de contacto
ν	Estiramento

Índice de Figuras

Capítulo II – Estado da Arte

Figura 1 - Estrutura do acetato de celulose [14].	10
Figura 2 - Esquema representativo das possíveis interações das Ag-NPs com células bacterianas [47]......	14
Figura 3 – Imagens obtidas por TEM de bactérias (A) <i>Escherichia coli</i> e (B) <i>Staphylococcus aureus</i> , em contato com iões Ag [48].	15
Figura 4 – Mapa representativo das áreas pobres em oxigénio e, conseqüentemente privadas de boa parte da vida animal (a vermelho), áreas eutróficas (a amarelo) e áreas em recuperação (a verde) [55].	17
Figura 5 - Representação esquemático da síntese de Ag-NPs por redução com borohidreto de sódio (adaptado de [68])......	19
Figura 6 - Imagens TEM e histogramas dos tamanhos e distribuição de tamanhos das Ag-NPs preparadas com uma razão molar $\text{AgNO}_3:\text{NaBH}_4$ de: (a e b) 1:1, (c e d) 1:10 e (e e f) 1:100 [71].	20
Figura 7 - Estrutura molecular do poloxamer 407.	21
Figura 8 - Imagens de TEM e distribuições de tamanhos de Au-NPs formadas em soluções contendo poloxamer em diferentes concentrações: (A) $0,4 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, (B) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ e (C) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ [78].	22

Capítulo III – Procedimento Experimental

Figura 9 – Esquema representativo da síntese de Ag-NPs. (A) dissolução do AC em DMF, (B) redução <i>in situ</i> do AgNO_3 com NaBH_4 , (C) membrana de AC contendo Ag-NPs obtida.	27
Figura 10 – Esquema representativo da síntese de Ag-NPs, juntamente com Al-NPs. (A) dissolução do AC em DMF, (B) redução <i>in situ</i> do AgNO_3 com NaBH_4 , (C) deposição <i>in situ</i> de $\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$ e ajuste do pH com HCl, (D) membrana de AC contendo Ag-NPs e Al-NPs obtida.	30

Figura 11 – Esquema representativo das membranas obtidas para concentrações de 2 wt. % de AC..... 38

Figura 12 – Esquema representativo das membranas obtidas para concentrações de 4 wt. % de AC..... 38

Capítulo IV – Apresentação e discussão dos resultados

Figura 13 – Distribuição de tamanhos das Ag-NPs nas membranas de 2 wt. % de AC. 45

Figura 14 – Distribuição de tamanhos das Ag-NPs nas membranas de 4 wt. % de AC. 46

Figura 15 – Espectros de Absorção de UV-visível das soluções coloidais: (A) 2 wt. % AC/Ag-NPs e (B) 4 wt. % AC/Ag-NPs..... 48

Figura 16 – Espectros de Absorção de UV-visível das soluções coloidais: (C) 2 wt. % AC/Ag-NPs/P407 e (D) 4 wt. % AC/Ag-NPs/P407. 49

Figura 17 – Soluções coloidais analisadas por espectroscopia UV-Vis. 51

Figura 18 – Esquema representativo da formação do complexo P407 - Ag-NPs (adaptado [99]). 52

Figura 19 – Espectro de absorção FTIR-ATR das membranas de 2 wt. % de AC contendo: (A) 0.3 mM de AgNO₃ e P407 e (B) 1.0 mM de AgNO₃ e P407..... 54

Figura 20 – FTIR-ATR das membranas de 4 wt. % de AC contendo: (C) 0.3 mM de AgNO₃ e P407 e (D) 1.0 mM de AgNO₃ e P407. 54

Figura 21 – Curvas de TGA em aquecimento linear (10 °C/min) no intervalo 30-800 °C para membranas contendo 2 wt. % AC..... 57

Figura 22 – Curvas de TGA em aquecimento linear (10 °C/min) no intervalo 30-800 °C para membranas contendo 4 wt. % AC..... 57

Figura 23 – Gráfico do módulo em função da temperatura para as membranas de nanocompósitos de 2 wt. % de AC. 59

Figura 24 – Gráfico do módulo em função da temperatura para as membranas de nanocompósitos de 4 wt. % de AC. 60

Figura 25 – Gráfico da $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas de nanocompósitos de 2 wt. % de AC.	61
Figura 26 – Gráfico da $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas de nanocompósitos de 4 wt. % de AC.	62
Figura 27 – SEM da superfície da membrana de 2 wt. % de AC com uma focagem de 20 μm : (A) imagem dada pelos eletrões secundários (B) imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.	63
Figura 28 – SEM da superfície da membrana de 4 wt. % de AC com uma focagem de 20 μm : (C) imagem dada pelos eletrões secundários (D) imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.	63
Figura 29 – SEM da superfície da membrana de 2 wt. % AC/Ag_1.0 mM com uma focagem de 20 μm : (A) imagem dada pelos eletrões secundários (B) imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.	64
Figura 30 – SEM da superfície da membrana de 4 wt. % AC/Ag_1.0 mM com uma focagem de 20 μm : (C) imagem dada pelos eletrões secundários (D) imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.	64
Figura 31 – SEM da superfície da membrana de 2 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1) com uma focagem de 20 μm : (A) imagem dada pelos eletrões secundários (B) imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.	65
Figura 32 – SEM da superfície da membrana de 4 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1) com uma focagem de 20 μm : (C) imagem dada pelos eletrões secundários (D) imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.	65
Figura 33 – SEM da superfície da membrana (A) 2 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1) com uma focagem de 100 μm (B) 4 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1) com uma focagem de 100 μm . .	67
Figura 34 - Espectro de absorção FTIR-ATR das membranas de 4 wt. % AC contendo 1.0 mM de $\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$ e 1.0 mM de AgNO_3	70
Figura 35 – Concentração de fósforo ao longo de 24 horas em contacto com as membranas de AC/Al e AC/Ag/Al.	73

Índice de Tabelas

Capítulo III – Procedimento Experimental

Tabela 1 – Propriedades do acetato de celulose.....	25
Tabela 2 - Propriedades dos reagentes e solventes utilizados.....	26
Tabela 3 - Composição química dos nanocompósitos obtidos com poloxamer 407.	28
Tabela 4 - Composição química dos nanocompósitos obtidos com isopropóxido de alumínio (Al(Pr- iO) ₃).	30
Tabela 5 – Membranas de nanocompósitos analisadas no estudo da atividade antibacteriana. 37	
Tabela 6 - Designação das membranas obtidas.....	39

Capítulo IV – Apresentação e discussão dos resultados

Tabela 7 - Aspeto visual das membranas de nanocompósitos desenvolvidas contendo Ag-NPs. 44	
Tabela 8 - Valores do PDI e do diâmetro médio hidrodinâmico obtidos.....	47
Tabela 9 – Valores dos ângulos de contacto medidos.....	51
Tabela 10 – Valores das bandas de absorção de luz infravermelha para os respetivos grupos químicos presentes nas membranas analisadas.....	55
Tabela 11 – Estabilidade térmica e degradação das amostras obtidas a partir das curvas de TGA.	58
Tabela 12 – Comparação dos valores do módulo obtidos nos ensaios de DMA.	60
Tabela 13 – Análise química elementar obtida por EDS das membranas contendo Ag-NPs revestidas com poloxamer 407.	66
Tabela 14 – Resultados da atividade antibacteriana das membranas de nanocompósitos de Ag- NPs com e sem a presença de P407.	68
Tabela 15 - Aspeto visual das membranas desenvolvidas contendo Ag-NPs e Al-NPs.....	69
Tabela 16 – Resultados da atividade antibacteriana das membranas de nanocompósitos de Ag- NPs com e sem a presença de Al-NPs.	71

Tabela 18 - Concentração de fósforo final após 24 horas em contacto com uma solução de P de 1.0 mg/L 74

Capítulo I – Introdução

1. Enquadramento

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito da unidade curricular *Dissertação em Engenharia de Polímeros* do plano de estudos do Mestrado Integrado em Engenharia de Polímeros.

Nos últimos anos, tem-se assistido a uma diminuição considerável da qualidade da água, limitando assim a acessibilidade de água potável, principalmente nos países em desenvolvimento [1].

De acordo com o relatório da *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde – WHO), estima-se que cerca de metade da população dos países em desenvolvimento (1,1 bilhão de pessoas) apresentam problemas de saúde relacionados com a falta de acesso a água própria para beber ou devido à presença de microrganismos em águas contaminadas [2-4].

Embora a natureza de contaminação de águas possa variar, esta é tipicamente devida ao saneamento inadequado, crescimento excessivo de algas relacionado com o aumento da concentração de fósforo e nitrogénio no meio aquático provocada pelo uso intensivo de fertilizantes em explorações agrícolas, assim como a exploração animal intensiva, metais pesados, salinidade causada pela irrigação generalizada e ineficiente, e altas cargas de sedimentos resultantes da erosão dos solos a montante [5].

Dada a importância do acesso a água potável, tanto pela população dos países em desenvolvimento, como pela população dos países desenvolvidos, e tendo em conta as preocupações sobre a viabilidade das práticas atuais em atender as crescentes procura de todos os usuários de água, existe uma clara necessidade para o desenvolvimento de novas tecnologias e materiais inovadores em que os desafios associados ao fornecimento de água potável segura possam ser abordados [5].

Atualmente, os processos de separação por membranas poliméricas contendo nanopartículas inorgânicas com dimensões na ordem dos nanómetros, têm-se revelado como um caminho de investigação promissor e inovativo, capazes de fornecer soluções eficazes e duradouras para um melhor abastecimento de água com uma qualidade adequada para atender as necessidades humanas, ambientais e industriais [6]. O interesse nestas membranas poliméricas orgânica-inorgânica, deve-se ao facto das nanopartículas inorgânicas incorporadas exibirem uma melhoria notável nas propriedades e desempenho da membrana polimérica, devido à elevada razão de aspeto e de superfície-volume, assim como grande reatividade apresentada

pelas mesmas. O que contribui para um desenvolvimento mais eficaz, durável e de menor custo global do que as opções convencionais para a remoção de contaminantes da água, quer *in situ* quer em sistemas de purificação de água [1, 5].

Na presente dissertação foram preparadas e avaliadas experimentalmente as potencialidades e eficiência de membranas de acetato de celulose (AC) contendo nanopartículas de prata (Ag-NPs) e de alumínio (Al-NPs). A escolha destas nanopartículas, principalmente das Ag-NPs, deveu-se às suas propriedades óticas específicas e à possível aplicabilidade dos nanocompósitos contendo estas cargas como agentes antibacterianos. Por outro lado, a escolha das Al-NPs deveu-se ao efeito conhecido destas na remoção de ião fosfato de águas eutróficas.

2. Objetivos

O objetivo da presente dissertação consiste no desenvolvimento de uma membrana polimérica contendo Ag-NPs e Al-NPs, para a remediação de meios aquáticos contaminados com microrganismos, podendo ainda ser utilizado para a remoção de águas contaminadas com o ião fosfato. Para este efeito, o acetato de celulose é usado como matriz polimérica uma vez que possui na sua cadeia polimérica, grupos hidroxilos que lhe conferem grande reatividade, enquanto, o nitrato de prata e o isopropóxido de alumínio são os precursores metálicos utilizados para promover a formação de Ag-NPs e Al-NPs, respetivamente.

Com este trabalho de investigação, pretende-se ainda avaliar o efeito da estabilização das Ag-NPs através da incorporação do poloxamer 407, nas propriedades óticas, mecânicas, térmicas, assim como no estudo das propriedades antibacterianas das membranas AC contendo Ag-NPs.

Para atingir com sucesso os objetivos traçados torna-se, necessário adotar uma estratégia de trabalho, que se pode traduzir na seguinte sequência de ações:

- 1) Desenvolvimento de membranas de AC contendo Ag-NPs obtidas *in situ* por redução química do nitrato de prata com o agente redutor, borohidreto de sódio, com e sem a incorporação de poloxamer 407, de modo a avaliar o efeito do surfactante na estabilização das Ag-NPs.
- 2) Caracterização das membranas de nanocompósitos obtidos e estabelecimento da relação entre as propriedades finais das membranas contendo Ag-NPs, com as membranas contendo Ag-NPs estabilizadas pelo poloxamer 407 a diferentes concentrações, contudo sempre a uma proporção 1:1 (AgNO₃/P407).

- 3) Desenvolvimento de membranas de AC contendo Ag-NPs, juntamente com Al-NPs obtidas por síntese *in situ* de um precursor à base de alumínio, o isopropóxido de alumínio numa solução de acetato de celulose, sendo esta solução posteriormente processada em forma de membrana por evaporação do solvente.
- 4) Estudo da influência de diferentes concentrações de Al-NPs na remoção do ião fosfato de uma solução contendo fósforo.
- 5) Correlação entre as propriedades antibacterianas das membranas desenvolvidas contendo Ag-NPs e as propriedades antibacterianas das membranas desenvolvidas contendo Ag-NPs/Al-NPs.

3. Organização da Dissertação

Esta dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos, orientados no sentido de apresentar o trabalho desenvolvido ao longo desta investigação. No **Capítulo 1** apresenta-se uma breve introdução ao trabalho de investigação, assim como os objetivos gerais da dissertação, e o modo como esta foi organizada. O **Capítulo 2** constitui uma breve revisão bibliográfica feita durante toda a duração do trabalho, acerca de nanocompósitos poliméricos contendo nanopartículas metálicas, nomeadamente as Ag-NPs e Al-NPs. Por fim, faz-se uma breve alusão às estratégias de obtenção dos nanocompósitos contendo Ag-NPs, incidindo-se na importância do uso de surfactante e enfatizando as suas potencialidades na estabilização das Ag-NPs, dando-se especial ênfase ao poloxamer 407. No **Capítulo 3**, apresentam-se os materiais e métodos usados durante a execução do trabalho de investigação. No **Capítulo 4** apresentam-se os resultados obtidos da caracterização efetuada aos nanocompósitos de AC contendo Ag-NPs com e sem a presença do poloxamer 407 em termos da sua atividade antibacteriana, morfologia, composição química, assim como, as suas características superficiais e térmicas. Na parte final deste capítulo, apresentam-se e discutem-se os resultados relativos ao estudo da remoção de fósforo, assim como as propriedades antibacterianas das membranas de nanocompósitos de AC contendo Al-NPs, juntamente com as Ag-NPs previamente sintetizadas e caracterizadas. No **Capítulo 5** faz-se uma síntese das principais conclusões do trabalho efetuado, e apresentam-se algumas ideias e sugestões para trabalho futuro, de modo a possibilitar a continuidade do trabalho desenvolvido nesta dissertação.

Capítulo II – Estado da Arte

1. Enquadramento

Neste capítulo são abordados os conceitos teóricos que serviram de base para a execução deste trabalho. Como tal, começa-se por fazer uma breve revisão bibliográfica sobre a estrutura do acetato de celulose, matriz utilizada para execução deste trabalho. Referem-se, ainda, os estudos realizados com nanocompósitos de AC contendo Ag-NPs, assim como a influência do tamanho e forma das Ag-NPs nas bactérias. Faz-se, também, um levantamento bibliográfico dos métodos conhecidos capazes de remover o ião fosfato, dando-se especial atenção aos nanocompósitos com base em precursores de alumínio. Por fim, faz-se uma breve alusão às estratégias de obtenção dos nanocompósitos contendo Ag-NPs, incidindo-se na importância do uso de surfactante e enfatizando as suas potencialidades na estabilização das Ag-NPs, dando-se especial ênfase ao poloxamer 407, surfactante utilizado neste trabalho de investigação.

2. Nanotecnologia

A Nanotecnologia é uma área emergente da nanociência, que envolve a produção, a manipulação e a aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas, através do controlo da sua forma e tamanho à escala nanométrica. Isto é, esta tecnologia proporciona a capacidade de sintetizar estruturas numa escala nanométrica, definidas normalmente como estruturas contendo componentes e/ou características estruturais com pelo menos uma dimensão no intervalo de 1 a 100 nm, com controlo preciso de tamanho e composição, dando-lhes assim a possibilidade de organizar estruturas maiores com propriedades e funções únicas [7, 8]. De entre os muitos nanomateriais promissores destacam-se as nanopartículas metálicas, devido à elevada razão de aspeto e de superfície-volume, e grande reatividade apresentada por estas [5].

3. Biopolímeros, Acetato de Celulose

Nos últimos anos tem-se assistido a um interesse renovado na utilização de biopolímeros, polímeros obtidos de fontes renováveis, em novas aplicações devido a dois fatores, primeiro a maior preocupação ambiental existente hoje em dia e segundo, a escassez dos recursos fósseis e consequente aumento do preço destes materiais [9].

De entre os polímeros obtidos a partir de fontes renováveis, a celulose é o polímero mais abundante na natureza, assim como o componente mais importante da parede celular das plantas, sendo por isso considerado uma matéria-prima quase inesgotável [9, 10].

O acetato de celulose (AC), representado na Figura 1, é um dos derivados da celulose, obtido através da reação de acetilação da celulose, e possui propriedades únicas das quais se destacam superfície hidrofílica, alta funcionalidade, baixo custo e possibilidade de modificação química [11-13]. Posto isto, é possível notar a versatilidade dos materiais compostos por AC.

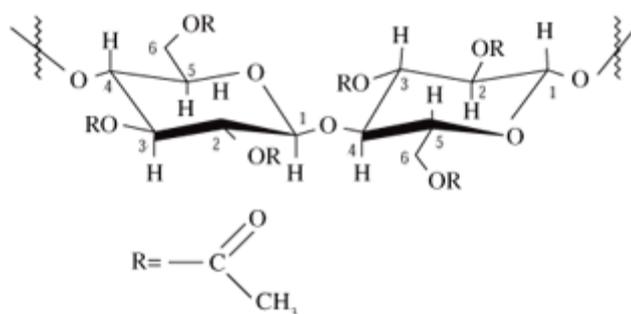


Figura 1 - Estrutura do acetato de celulose [14].

Devido às suas características, o AC tem vindo a ser utilizado numa vasta gama de aplicações em diversas áreas como a indústria têxtil, alimentar, eletrónica, bem como em aplicações biomédicas e de filtração sob a forma de membranas [15, 16].

No entanto, o AC também apresenta algumas propriedades desfavoráveis, como a pobre resistência ao cloro, baixa resistência mecânica e o facto de só poder ser usado numa gama limitada de temperatura (menor de 30° C) [17, 18]. Deste modo, a incorporação de nanopartículas inorgânicas veio proporcionar uma alternativa para desenvolver novos nanocompósitos, tendo como objetivo o melhoramento do desempenho dos materiais obtidos.

4. Nanocompósitos

Os nanocompósitos poliméricos são materiais constituídos por uma matriz polimérica orgânica à qual se juntam cargas inorgânicas com dimensões nanométricas (1 a 100 nm) [19]. Esta combinação tem como objetivo promover o desempenho das propriedades já existentes e proporcionar novas propriedades a estes materiais nanocompósitos, uma vez que a combinação a nível molecular de uma estrutura orgânica com outra inorgânica permite a formação de um nanocompósito com propriedades específicas, que não são possíveis de obter com outros tipos de

materiais, tais como os materiais resultantes de misturas físicas, nos quais as propriedades resultam da soma de cada componente em particular e não na criação de novas capacidades como resultado da reação química entre dois ou mais componentes [20-22].

Desta forma, a incorporação de nanopartículas inorgânicas na ordem dos 1 a 100 nm numa matriz de polímero orgânico, melhoram as propriedades e desempenho do nanocompósito, tanto a nível mecânico como térmico, devido às razões de aspeto e de superfície-volume muito elevadas apresentada pelas nanopartículas inorgânicas, que permitem uma elevada interface entre a matriz e a carga [23, 24].

Nestes materiais, geralmente, a fase inorgânica confere propriedades características (ópticas, eletrónicas, magnéticas, mecânicas) que podem ser facilmente moduladas, enquanto a fase orgânica irá controlar a reatividade e estabilidade das nanopartículas proporcionando várias interfaces possíveis [23].

Dependendo da natureza da interface e, por conseguinte, da natureza da interação da ligação química entre as espécies orgânicas e inorgânicas, estes materiais híbridos podem ser divididos em duas classes distintas [20, 24]:

- Classe I: nestes materiais, as interações químicas entre os componentes são relativamente fracas, do tipo *Van der Waals*, ligações de hidrogénio ou eletrostáticas [24].
- Classe II: nestes materiais, os componentes orgânicos e inorgânicos estabelecem ligações covalentes puras ou covalentes parcialmente iónicas [24].

A fronteira entre estas duas classes é no entanto ténue, surgindo materiais que apresentam características comuns a ambas [23].

Nesta dissertação foram investigadas dois tipos de nanopartículas metálicas como cargas em nanocompósitos, as Ag-NPs e as Al-NPs. Conforme referido anteriormente, a escolha destas nanopartículas, principalmente das Ag-NPs, deveu-se às suas propriedades ópticas específicas e à possível aplicabilidade dos nanocompósitos contendo estas cargas como agentes antibacterianos. Por outro lado, a escolha das Al-NPs deveu-se ao efeito conhecido destas na remoção de ião fosfato de águas eutróficas.

4.1. Nanocompósitos poliméricos contendo Ag-NPs

Durante séculos, a prata tem sido conhecida devido às suas propriedades antibacterianas, principalmente na área da saúde. Em 1884, o uso de soluções diluídas de sais de prata no

tratamento de infecções oculares em recém-nascidos era uma prática bastante comum [25], assim como no tratamento de feridas e queimaduras de soldados durante a primeira Guerra Mundial [26].

Por comparação com todos os agentes antibacterianos conhecidos, a prata é provavelmente o agente antibacteriano mais utilizado, uma vez que exibe uma forte toxicidade para uma ampla gama de microrganismos, e simultaneamente uma baixa toxicidade para os humanos [27, 28].

A prata exibe uma ação oligodinâmica, isto é, em concentrações baixas afeta a atividade de organismos vivos podendo, dependendo da concentração, estimular, inibir, ou mesmo destruir o organismo. Apresenta assim, a capacidade de inibição do crescimento de bactérias, efeito bacteriostático, e/ou destruição das bactérias, efeito bactericida [29, 30].

A prata, tanto na forma iônica (Ag^+) como metálica (Ag^0), apresentam uma citotoxicidade forte para uma ampla gama de microrganismos. No entanto, quando a prata metálica é exposta a ambientes aquosos, são produzidos e libertados íons de prata que vão exercer atividade antibacteriana. Desta forma, o mecanismo de ação antibacteriano da prata metálica tem sido considerado idêntico ao da prata iônica [31, 32].

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, tem-se verificado um interesse significativo em nanomateriais, principalmente nas Ag-NPs devido às razões de aspeto e de superfície-volume muito elevadas apresentada por estas nanopartículas, que permitem uma maior incorporação de nanopartículas no interior da bactéria promovendo a sua eficácia de uma forma controlada [3, 23, 24].

Uma importante aplicação de nanocompósitos poliméricos contendo Ag-NPs consiste no desenvolvimento de filmes para embalagens alimentares com propriedades antibacterianas. Estes filmes requerem polímeros biocompatíveis com propriedades específicas, ou seja, filmes à base de biopolímeros que atuem como barreiras contra a humidade, oxigénio, sabor, aroma, melhorando a qualidade dos alimentos, assim como tempo de vida dos produtos alimentares [33]. Varsha *et al.* [34] obtiveram filmes de AC contendo Ag-NPs, através da redução do AgNO_3 com o DMF. De acordo com este estudo, o filme AC/Ag apresentou um efeito bacteriostático, ou seja, inibiu o crescimento das bactérias num meio com nutrientes, mostrando assim, o potencial destes filmes como embalagens alimentares. Sabendo que uma das principais funções dos filmes é diminuir a transferência de humidade entre a atmosfera e os alimentos, num mesmo estudo verificou-se que a natureza hidrofóbica do AC exibia uma forte barreira contra a permeação de

vapor de água, corroborando assim a sua possível aplicação em materiais para embalagens alimentares [34].

Uma outra aplicação de nanocompósitos poliméricos contendo Ag-NPs consiste no desenvolvimento de membranas antibacterianas para tratamento e remediação de água. Faria *et al.* [35] e Moraes *et al.* [36] investigaram e desenvolveram membranas poliméricas porosas antibacterianas a partir de AC e Ag-NPs suportadas em óxido de grafeno. Segundo estes estudos, após um contato por um período de duas horas das membranas com as soluções aquosas contendo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, foi verificada uma inibição de 100% para ambas as bactérias, demonstrando assim o excelente potencial destas membranas para a redução de bactérias de soluções aquosas. O mesmo foi verificado por Madaeni *et al.* [37] para as bactérias *Actinobacteria* e *Spirochetes*, por filtração de águas residuais contendo estas bactérias através de uma membrana de AC com Ag-NPs incorporadas. Este estudo, também revelou o efeito bactericida apresentado pelas membranas AC/Ag, tendo-se verificado a eliminação total das bactérias das amostras de águas residuais filtradas.

Neste contexto, a associação de Ag-NPs a biopolímeros, como o AC representa uma abordagem estimulante para o desenvolvimento de novos materiais nanocompósitos com uma elevada diversidade de aplicações, nomeadamente em materiais onde as propriedades antibacterianas são cruciais.

4.1.1. Atividade antibacteriana

Apesar de as propriedades antibacterianas da prata serem bastante conhecidas há séculos, só recentemente é que se começaram a compreender os mecanismos pelos quais a prata é capaz de inibir o crescimento bacteriano. A maioria dos estudos sugere que as Ag-NPs são capazes de se fixarem na superfície das membranas celulares das bactérias, penetrando-as e conseqüentemente, perturbando a permeabilidade e as funções respiratórias dos microrganismos (Figura 2). Existe assim, a formação de cavidades na superfície das membranas e, conseqüente, acumulação das nanopartículas na superfície da mesma [38-40].

A formação de radicais livres pelas nanopartículas de prata pode ser considerado outro dos mecanismos capaz de provocar a morte celular das bactérias [41]. Os estudos de espectroscopia de ressonância do eletrão reportados por Danilczuk *et al.* [42] sugerem a formação de radicais livres pelas Ag-NPs após contacto com as bactérias, sendo estes capazes de danificar a membrana celular, tornando-a porosa e conseqüentemente levando à morte do microrganismo.

Outro dos mecanismos sugeridos consiste na libertação de iões de prata pelas nanopartículas, sendo estes capazes de interagir com os grupos tiol (-SH) de várias enzimas inativando-as. Os iões de prata formam ligações estáveis S-Ag que inibem várias funções respiratórias dos microrganismos, e conseqüentemente danificando a membrana celular [43]. Alguns estudos referem ainda, a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), que são produzidas, possivelmente através da inibição das funções respiratórias pelos iões de prata podendo atacar a membrana celular levando à sua rutura ou, mesmo causando danos no ADN [38, 44].

Os danos verificados nas paredes celulares podem ser causados pela interação das Ag-NPs com os compostos da parede celular contendo enxofre e fósforo, uma vez que a prata apresenta uma elevada afinidade com estes compostos [45, 46], levando assim, à morte celular. Por outro lado, o ADN também é constituído na sua maioria por enxofre e fósforo, o que significa que as interações das Ag-NPs com estes compostos do ADN acabam por evitar a replicação do ADN, levando à morte do microrganismo [47].

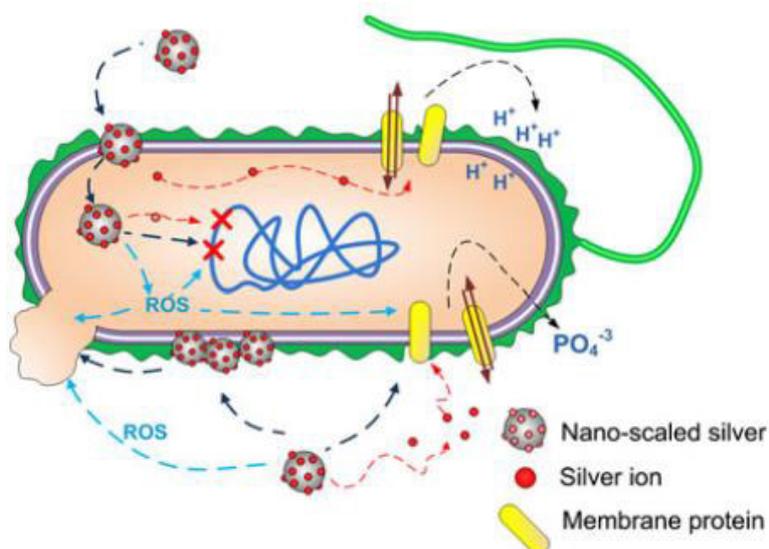


Figura 2 - Esquema representativo das possíveis interações das Ag-NPs com células bacterianas [47].

As bactérias, em relação à composição da parede celular, podem ser divididas em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. Esta divisão é baseada na estrutura da sua parede celular e resulta da resposta das bactérias à técnica de Gram. De acordo com este teste as bactérias Gram-positivas mantêm a cor violeta do corante enquanto as Gram-negativas apresentam uma alteração da cor para rosa ou vermelho [29].

Feng *et al.* [48] realizaram um estudo de modo a observar os efeitos dos iões de prata sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, nomeadamente sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Segundo este estudo, as bactérias que foram expostas a uma concentração de 10 µg/mL AgNO₃ durante 4 a 12 horas, apresentaram uma parede celular danificada, sendo possível observar-se na Figura 3, grânulos densos de eletrões no exterior e interior da célula. De acordo com a análise química por raios-X efetuada a estes grânulos foi possível verificar que estes continham prata e enxofre na sua composição química, suportando assim a ideia de que a prata inativa proteínas ligando-se a compostos contendo enxofre [48]. Neste estudo, observou-se também que a *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa, apresentava mais danos estruturais do que a *Staphylococcus aureus*, uma bactéria gram-positiva. Esta diferença deve-se principalmente à composição da parede celular, ou seja, as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular, formada por uma camada de peptidoglicano, mais espessa do que a camada de peptidoglicano apresentada pelas bactérias Gram-negativas [29, 43, 49].

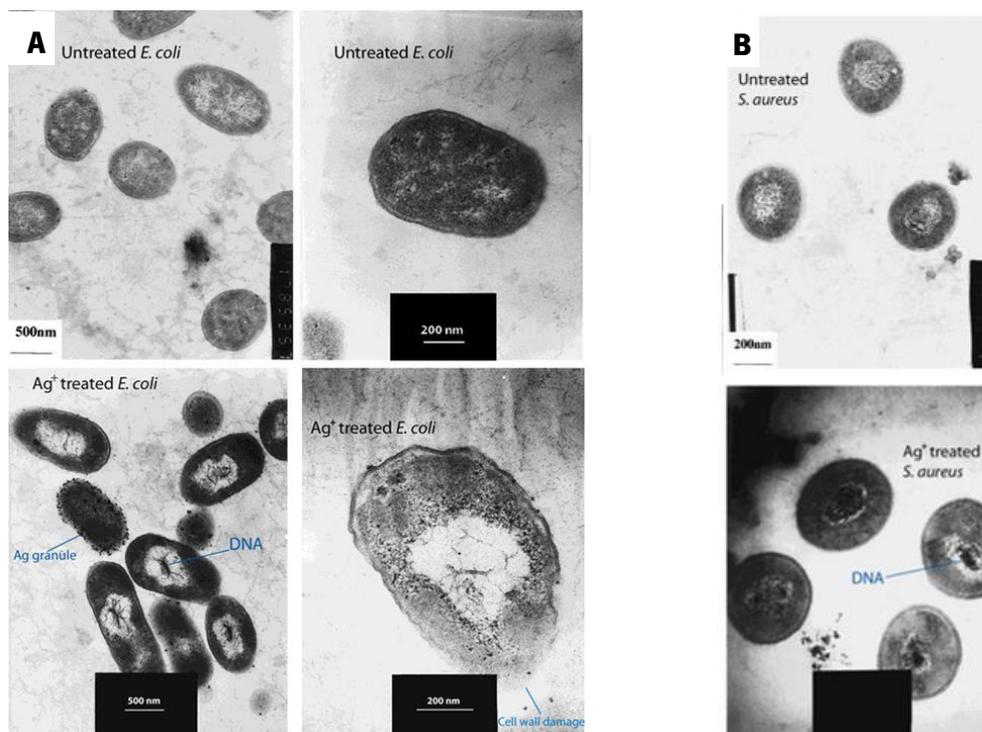


Figura 3 – Imagens obtidas por TEM de bactérias (A) *Escherichia coli* e (B) *Staphylococcus aureus*, em contato com iões Ag [48].

Outro fator determinante na atividade antibacteriana das Ag-NPs é o tamanho e forma apresentados por estas, uma vez que a "ligação" das Ag-NPs às bactérias depende da área

superficial disponível para a interação [46]. Martinez-Castanon *et al.* [50] reportaram que as Ag-NPs com tamanho mais reduzido (7 nm) apresentaram uma maior eficiência do que as Ag-NPs com um tamanho maior (89 nm), em relação às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, tendo-se observado, ainda, uma maior resistência da bactéria *Staphylococcus aureus* às Ag-NPs. Este aumento da atividade antibacteriana deve-se ao fato de as Ag-NPs com tamanhos mais reduzidos apresentarem uma maior razão entre área superficial disponível e volume, assim como uma maior facilidade de penetração da membrana celular em relação às Ag-NPs com tamanhos maiores [29, 50].

Além da dimensão, a forma das Ag-NPs também desempenha um papel importante na atividade antibacteriana. Pal *et al.* [51] sintetizaram diferentes formas de Ag-NPs, esféricas, triangulares e com um formato de bastonetes, e verificaram as propriedades antibacterianas destas nanopartículas em relação à *Escherichia coli*. De acordo com este estudo, verificou-se que as Ag-NPs que apresentaram uma maior atividade antibacteriana foram as com uma forma triangular, seguido das Ag-NPs esféricas e por último as Ag-NPs com um formato de bastonetes. Esta ordem de atividade antibacteriana apresentada pelas Ag-NPs pode ser explicada pelas faces orientadas segundo diferentes planos apresentados pelas nanopartículas, verificando-se um plano mais ativo nas Ag-NPs triangulares, ou seja, mais átomos disponíveis para a interação [51].

4.2. Nanocompósitos poliméricos contendo Ag-NPs

Nos últimos anos tem-se assistido a um aumento da concentração de fósforo no meio aquático devido ao uso intensivo de fertilizantes em explorações agrícolas, assim como a exploração animal intensiva, aliadas a um crescimento da população e atividades inerentes [22]. Segundo Diaz *et al.* [52] este excesso de fósforo é a causa mais comum de eutrofização dos meios aquáticos, resultando num aumento excessivo de algas, também denominado de *algal bloom*, responsável pela coloração azul-esverdeada, vermelha ou acastanhada da água (consoante as espécies de algas favorecidas pela situação) [53]. Como resultado, cria-se uma camada espessa de algas que impossibilitam a entrada de luz na água e impedem a realização da fotossíntese pelos organismos presentes nas camadas mais profundas, o que ocasiona a morte das algas, originando um aumento da concentração de bactérias decompositoras, assim como o aumento do consumo de oxigênio por estes organismos. Este processo de decomposição das algas em razão das atividades das bactérias, consome o oxigênio, o qual reduz a concentração de oxigênio

dissolvido, criando deste modo um estado de hipoxia, o que gera a morte dos peixes e outros organismos aeróbicos [52, 54].

Um estudo à escala global feito pelo *World Resources Institute* (Instituto de Recursos Naturais – WRI) e o Instituto Virgínia de Ciência Marinha (VIMS) identificou 762 áreas costeiras com sinais de eutrofização e/ou com baixa quantidade de oxigénio (hipoxia). Entre estes, 228 locais marinhos apresentaram sinais de eutrofização, incluindo crescimento excessivo de algas, enquanto 479 locais apresentaram sintomas de hipoxia, sendo estes locais denominados de "zonas mortas" devido à enorme quantidade de peixes mortos verificados (Figura 4) [55].

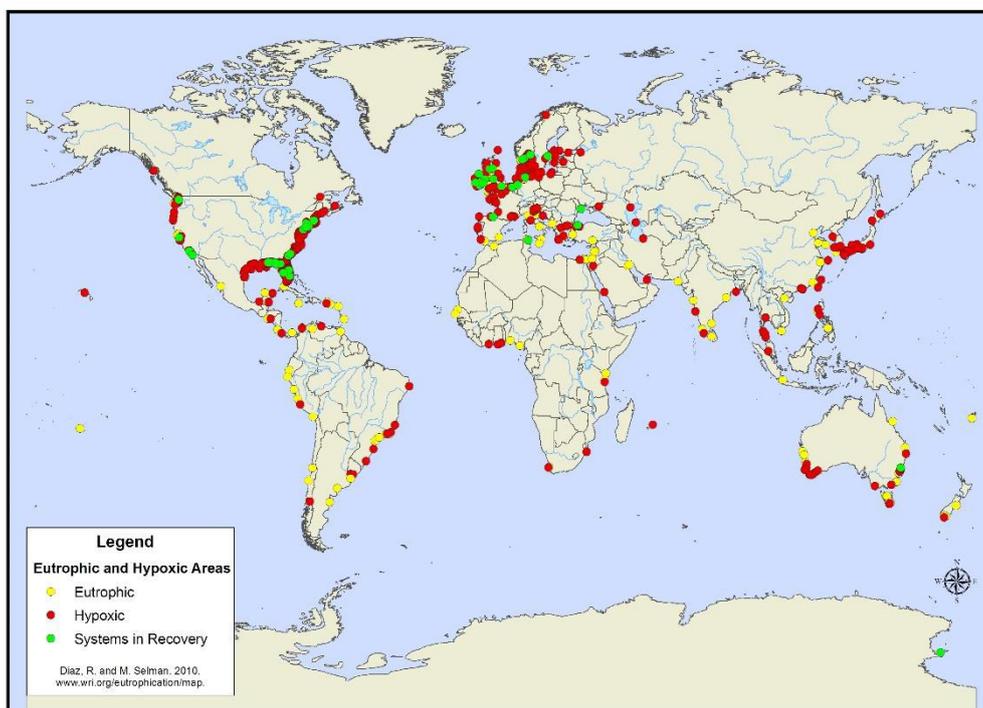


Figura 4 – Mapa representativo das áreas pobres em oxigénio e, conseqüentemente privadas de boa parte da vida animal (a vermelho), áreas eutróficas (a amarelo) e áreas em recuperação (a verde) [55].

Em resposta à necessidade crescente para reduzir a eutrofização e os efeitos negativos associados a esta, vários processos têm vindo a ser usados para remover o excesso de iões fosfato de águas eutróficas. A precipitação química com compostos de alumínio é um dos métodos mais usados [56]. Conover *et al.* [57] patenteou o uso de hidróxido sulfato de alumínio para a remoção de partículas sólidas suspensas e precipitação do ião fosfato em lagos. No entanto, o uso do hidróxido sulfato de alumínio apresenta alguns inconvenientes, isto é, a aplicação deste, tende a diminuir o pH de todo o lago, verificando-se para valores de pH inferiores a 5.5 e superiores a 8.0, a solubilização do ião alumínio, com a conseqüente libertação do ião fosfato para o meio aquático.

Contudo, através da adição contínua de uma concentração de hidróxido sulfato de alumínio é possível manter um pH da água superior a 6.0, impedindo assim, a solubilização do íon alumínio. De modo a combater estas desvantagens apresentadas, Oliveira *et al.* [58] desenvolveram um novo nanocompósito híbrido contendo Al-NPs através do processo sol-gel, capaz de remover 90 % de fósforo em intervalos de pH entre 2.0 a 6.5. A utilização deste material caracteriza-se por não introduzir contaminantes na água nem provocar variações significativas de pH, podendo ser reutilizado sucessivamente [58].

Este método é muito vantajoso na medida em que o nanocompósito híbrido pode ser aplicado *in situ*, por colocação de uma barreira reativa permeável no leito do meio aquático sob a forma de filme ou bloco polimérico, o qual é atravessado pela água contaminada com o íon fosfato, sendo este removido na superfície do material. Também pode ter uma aplicação *ex situ*, neste caso é necessário bombear a água a tratar, fazê-la passar por um filtro contendo o nanocompósito híbrido e finalmente devolvê-la ao meio aquático [22, 58].

5. Estratégias de síntese

Atualmente, a investigação na área da nanotecnologia encontra-se focada na síntese controlada de nanopartículas com diferentes tamanhos, formas e composição química para aplicações com benefício humano.

As metodologias existentes para a preparação de nanopartículas são baseadas em dois tipos de processos:

- Físicos, também conhecidos como *top down*, manipulam o material em escala macro através de processos físicos, quebrando as partículas até estas atingirem uma escala nanométrica [59, 60]. Nestes métodos destacam-se a ablação laser e a técnica de pulverização catódica (sputtering), utilizados para obter nanopartículas metálicas depositadas em substratos ou incorporados em matrizes sólidas [61-64].
- Químicos, também conhecidos como *bottom up*, são baseados em reações químicas e precursores moleculares ou atômicos para a obtenção das nanopartículas desejadas. São métodos mais simples e eficazes, em que é possível um maior controlo sobre os processos [59, 60]. Nestes métodos destaca-se a redução química de um sal de prata, usualmente o AgNO_3 , em solução, na presença de um agente redutor que conduz à nucleação e ao conseqüentemente crescimento das nanopartículas. Por vezes, é utilizado juntamente com

um agente estabilizante capaz de impedir a agregação das nanopartículas formadas, permitindo assim o controlo do tamanho e forma das mesmas [65, 66].

Embora ambos os métodos possam ser usados para obter nanopartículas metálicas, nesta dissertação a preparação de nanocompósitos orgânicos-inorgânicos será baseada nos processos químicos, mais especificamente na síntese *in situ* das Ag-NPs por redução com borohidreto de sódio na presença de um agente estabilizante. A síntese *in situ* das nanopartículas é um método direto e simples, tendo vindo a ganhar um papel de destaque, pois é uma forma conveniente de estudar e compreender, em escala laboratorial, a interação entre o polímero e as nanopartículas inorgânicas [67].

5.1. Síntese de Ag-NPs por redução com borohidreto de sódio

Um dos métodos mais frequentemente usados na síntese *in situ* de Ag-NPs consiste na incorporação de agentes redutores externos, nomeadamente o borohidreto de sódio (NaBH_4). Neste procedimento, a redução química dos sais metálicos baseia-se na redução do ião Ag^+ com o borohidreto de sódio formando átomos de prata (Ag^0) que crescem por deposição de novos núcleos de Ag à superfície dos já existentes, formando aglomerados oligoméricos dando assim origem a Ag-NPs (Figura 5) [7].

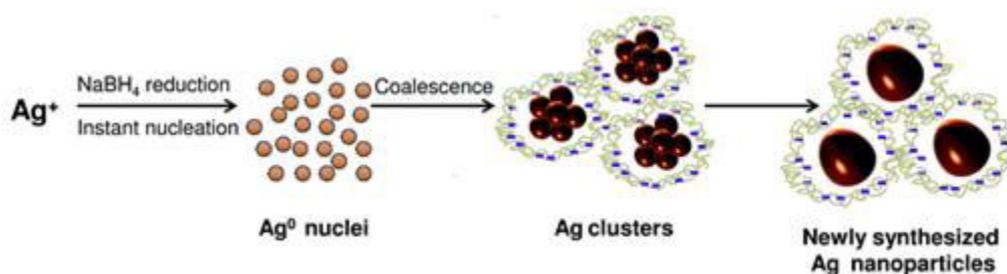


Figura 5 - Representação esquemático da síntese de Ag-NPs por redução com borohidreto de sódio (adaptado de [68]).

Normalmente, esta reação é acompanhada por uma mudança de cor da solução coloidal, sendo esta amarela com uma banda de absorção intensa nos comprimentos de onda entre 380 nm a 400 nm, atribuídas à oscilação coletiva dos eletrões das nanopartículas em ressonância com a onda de luz. Esta banda é denominada por banda plasmónica superficial (SPR) [69].

A redução das nanopartículas inorgânicas com o borohidreto de sódio, considerado um forte agente redutor, desempenha um papel fundamental na estabilização das Ag-NPs em crescimento

devido à dupla camada eletrostática repulsiva criada pelos iões de borohidreto adsorvidos à superfície das nanopartículas dando origem a uma superfície carregada negativamente e impedindo assim a agregação das Ag-NPs. A estabilidade das Ag-NPs é assim atribuída ao efeito conjunto de interações *Van der Waals* e interações eletrostáticas. [70].

O borohidreto de sódio tem sido usado na preparação de diversos nanocompósitos AC/Ag-NPs podendo a distribuição de tamanhos das Ag-NPs ser ajustada através da razão molar entre a concentração de borohidreto e a concentração de sais de Ag(I). Thawatchai *et al.* [71] reportaram uma diminuição no tamanho e distribuição de tamanhos das Ag-NPs com o aumento da razão molar do NaBH₄ em relação à concentração de AgNO₃ (Figura 6).

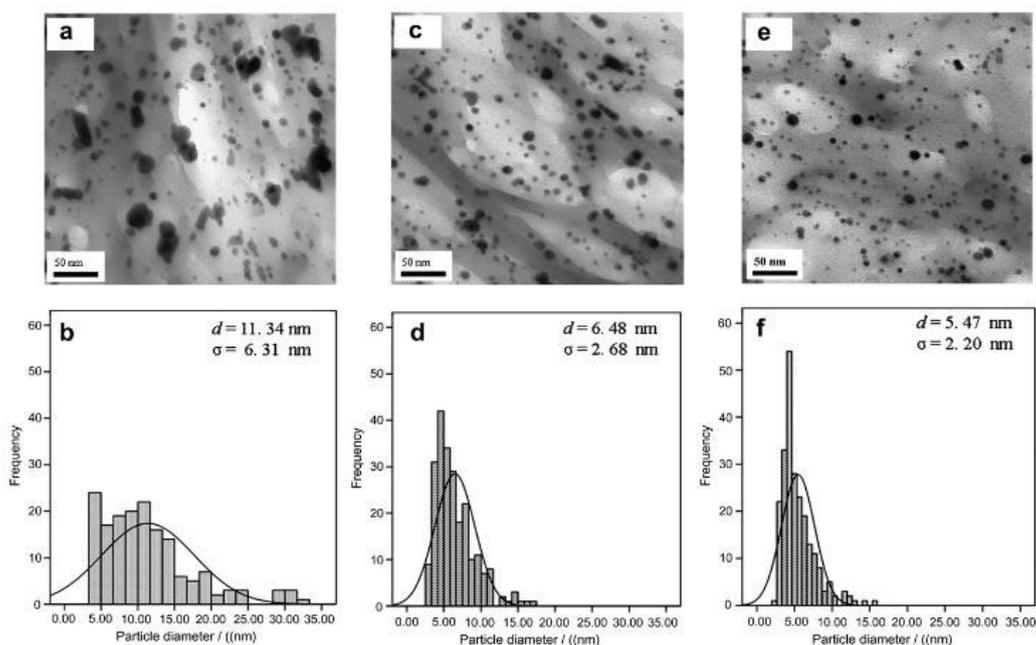


Figura 6 - Imagens TEM e histogramas dos tamanhos e distribuição de tamanhos das Ag-NPs preparadas com uma razão molar AgNO₃:NaBH₄ de: **(a e b)** 1:1, **(c e d)** 1:10 e **(e e f)** 1:100 [71].

A síntese de nanopartículas segundo este método apresenta algumas vantagens, tais como, a facilidade de síntese em condições ambientais uma vez que envolvem poucos passos, elevada estabilidade térmica das nanopartículas, melhor controlo da quantidade de material inorgânico nos nanocompósitos finais, assim como um controlo eficiente do tamanho e forma das Ag-NPs obtidas nos nanocompósitos finais.

5.2. Síntese de Ag-NPs por incorporação do poloxamer 407

Na síntese de nanopartículas metálicas, estas não são termodinamicamente estáveis e continuam a crescer. Portanto, é necessário conter o crescimento das nanopartículas inorgânicas durante a reação de modo a produzir nanopartículas estáveis. Uma forma para conter este crescimento contínuo das nanopartículas metálicas consiste na incorporação de surfactantes poliméricos. As moléculas orgânicas do surfactante ligadas à superfície das nanopartículas fornecem uma barreira energética, contrariando desta forma as forças de *Van der Waals* entre as nanopartículas, mantendo assim a dispersão das nanopartículas estável [7, 72].

As nanopartículas inorgânicas, nomeadamente as Ag-NPs, podem ser sintetizadas em solução utilizando surfactantes como o poloxamer 407, para controlar o crescimento das nanopartículas e estabilizar a sua superfície. O poloxamer 407 (P407), também conhecido como pluronic F127 é um tensoativo polimérico, não- iónico, com uma conformação em bloco, do tipo A – B – A, em que A corresponde ao óxido de polietileno (PEO), que consiste numa cadeia de carácter hidrofílico e B corresponde ao óxido de polipropileno (PPO), que consiste numa cadeia de carácter hidrofóbico (Figura 7) [73, 74].

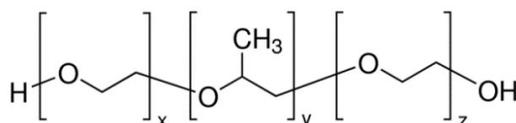


Figura 7 - Estrutura molecular do poloxamer 407.

Durante a síntese das nanopartículas metálicas, estas são estabilizadas pelo impedimento estereoquímico proporcionado pelas moléculas de poloxamer 407 adsorvidas na superfície das Ag-NPs dando origem a nanopartículas com uma arquitetura núcleo-coroa (camada de material orgânico que reveste um núcleo de uma nanopartículas inorgânica) mais estáveis em meio hidrofílico [75]. De acordo com os resultados obtidos por Sakai *et al.* [76] e Angelescu *et al.* [72] o poloxamer 407 permite controlar a forma e o tamanho das Ag-NPs, obtendo-se maiores tamanhos de nanopartículas metálicas para uma maior concentração de poloxamer 407. Segundo estes estudos o poloxamer 407 é usado como estabilizador e controlador das formas e tamanhos das Ag-NPs, mas também é referido como agente redutor. Wang *et al.* [77] reportaram que o bloco hidrofílico PEO é capaz de reduzir lentamente o ião Ag(I) em Ag-NPs à temperatura ambiente, através da oxidação dos grupos EO. Na Figura 8 apresenta-se o efeito que a variação de

concentração poloxamer apresenta no tamanho das nanopartículas de ouro (Au), sendo possível também verificar o efeito deste na forma apresentada pelas nanopartículas, uma vez que se verifica uma nanopartícula com um formato de bastonete.

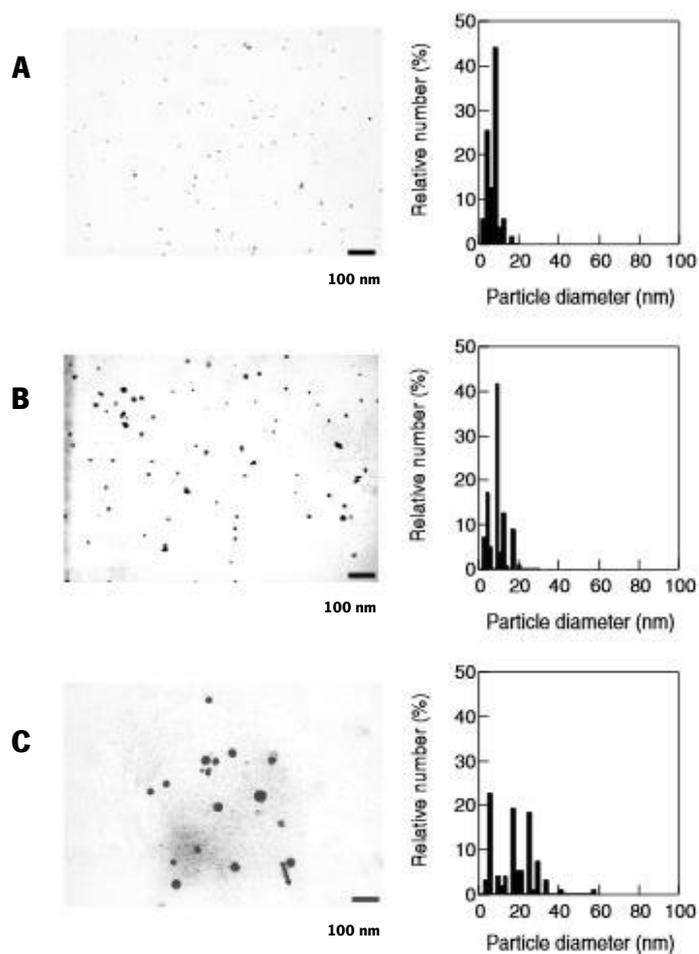


Figura 8 - Imagens de TEM e distribuições de tamanhos de Au-NPs formadas em soluções contendo poloxamer em diferentes concentrações: **(A)** $0,4 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, **(B)** $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ e **(C)** $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ [78].

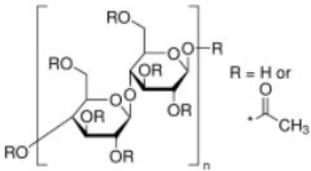
Capítulo III – Procedimiento Experimental

Neste capítulo são descritas as metodologias adotadas na preparação dos nanocompósitos de AC contendo nanopartículas metálicas, nomeadamente as Ag-NPs e Al-NPs, bem como os métodos analíticos e respetivos instrumentos usados na caracterização das mesmas. Apresentam-se, ainda, os materiais usados para a execução do trabalho experimental.

1. Materiais e reagentes

Na elaboração do presente trabalho foi utilizado o acetato de celulose (AC) fornecido pela Sigma-Aldrich (impureza $\leq 3\%$ água) sem nenhum tratamento adicional. Na Tabela 1 estão descritos algumas das propriedades do AC.

Tabela 1 – Propriedades do acetato de celulose.

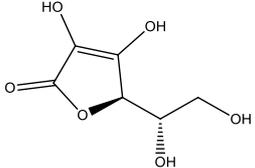
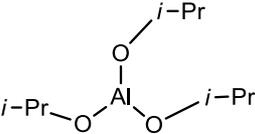
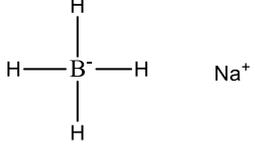
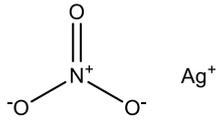
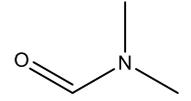
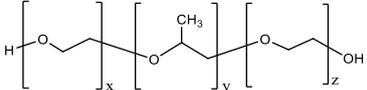
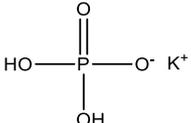
Propriedades				
M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	Densidade (g/mL)	DS	Estrutura
200 000	50 000	1,3	2.45 (3.00)	

DS: Grau de substituição

Em relação aos solventes e reagentes químicos utilizados no decorrer deste trabalho, estes foram adquiridos a várias empresas e usados sem nenhuma purificação prévia. Algumas das características dos reagentes utilizados encontram-se na Tabela 2.

A maioria dos reagentes e solventes usados foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, nomeadamente, o alumínio isopropóxido (pureza $\geq 98\%$), o nitrato de prata (pureza $\geq 99\%$) e o ácido clorídrico (pureza 37%). Enquanto, o ácido ascórbico (pureza $\geq 99\%$) juntamente com o potássio dihidrogenofosfato (pureza $\geq 99\%$) foram fornecidos pela Panreac e o *N,N*-dimetilformamida (DMF, pureza $\geq 99,99\%$) e o borohidreto de sódio (pureza $\geq 98\%$) pela Fischer Chemical e pela Acros Organics, respetivamente.

Tabela 2 - Propriedades dos reagentes e solventes utilizados.

Nome	Peso molecular	Fórmula Molecular	Estrutura
Ácido ascórbico	176,13 g/mol	C ₆ H ₈ O ₆	
Ácido Clorídrico	36,46 g/mol	HCl	H—Cl
Isopropóxido de alumínio (III)	204,24 g/mol	Al(Pr- <i>i</i> O) ₃	
Borohidreto de sódio	37,83 g/mol	NaBH ₄	
Nitrato de prata(I)	169,9 g/mol	AgNO ₃	
<i>N,N</i> -dimetilformamida	73,09 g/mol	C ₃ H ₇ NO	
Poloxamer 407	9840 a 14 600 g/mol	(C ₃ H ₆ O.C ₂ H ₄ O) _n	
Dihidrogenofosfato de potássio	136,09 g/mol	KH ₂ PO ₄	

2. Preparação dos nanocompósitos

2.1. Síntese de Ag-NPs

Neste trabalho foram preparados vários nanocompósitos por incorporação de Ag-NPs em substratos celulósicos, nomeadamente o AC. Uma vez que a morfologia e tamanho das Ag-NPs dependem consideravelmente do método utilizado na sua preparação, neste trabalho, para a síntese dos nanocompósitos foi usado o método de redução química no qual foi baseado na redução de sais de Ag(I) com borohidreto de sódio. Neste método, utiliza-se o nitrato de prata

(AgNO₃) como precursor e o borohidreto de sódio (NaBH₄) como agente redutor. Considera-se a seguinte estequiometria para a reação:



Em relação à síntese de Ag-NPs, esta pode ser sumariada da seguinte forma: 0,3 mM e 1 mM de AgNO₃ foram adicionados numa solução de 50 mL de DMF contendo 1 g e 2 g de AC (2 wt. % e 4 wt. %), respetivamente, sob agitação a uma temperatura de 23 °C. De seguida foi adicionado 0.3 mM e 1.0 mM de borohidreto de sódio (NaBH₄) na proporção de 1:1 (precursor/redutor) em volume. Após a adição do borohidreto de sódio na solução verificou-se que esta apresentava uma cor amarela, confirmando assim a formação de Ag-NPs. As soluções foram em seguida transferidas para placas de *petri* e colocadas numa estufa a uma temperatura de 60 °C durante 36h. Para que se possa perceber melhor a reação descrita é apresentado um esquema representativo da mesma na Figura 9.

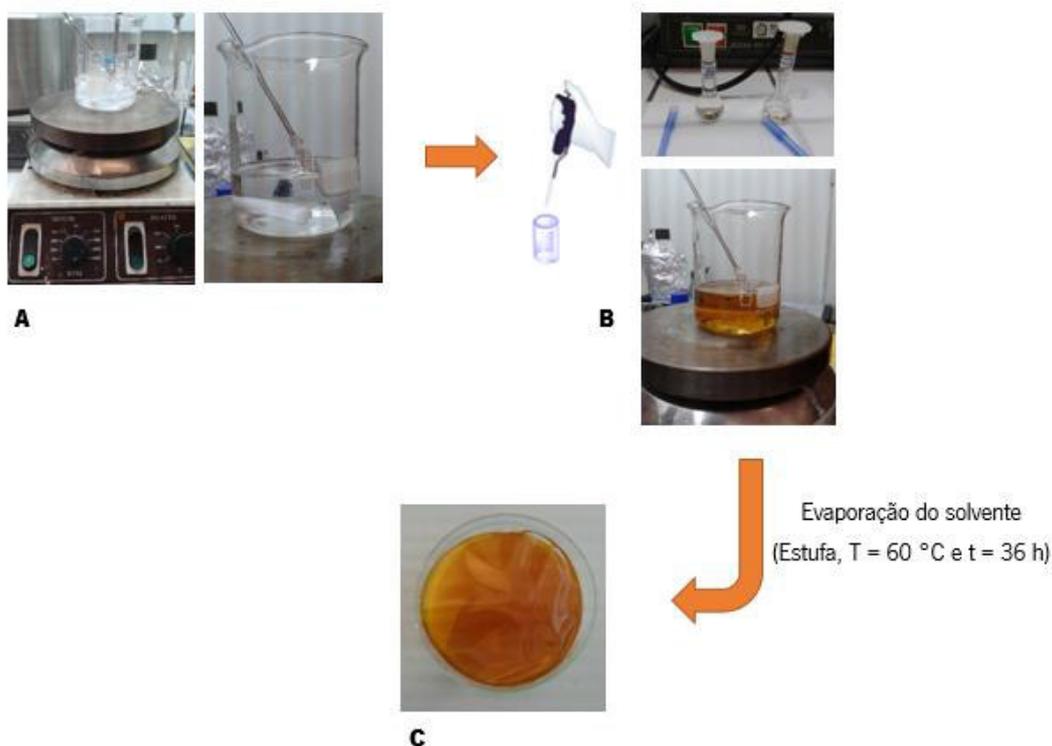


Figura 9 – Esquema representativo da síntese de Ag-NPs. (A) dissolução do AC em DMF, (B) redução *in situ* do AgNO₃ com NaBH₄, (C) membrana de AC contendo Ag-NPs obtida.

2.2. Síntese de Ag-NPs estabilizadas com poloxamer 407

Um dos maiores obstáculos às aplicações práticas das Ag-NPs deve-se, principalmente ao fato de estas serem muito sensíveis a mudanças de pH, força iônica do meio e presença de outros materiais orgânicos, o que dificulta a capacidade de modificação da sua superfície e faz com que tenha elevada tendência para agregar [79]. Posto isto, uma estratégia possível para evitar este efeito passa pela modificação superficial das Ag-NPs com o poloxamer 407 de modo a impedir a sua aglomeração.

Neste trabalho procedeu-se então ao revestimento das Ag-NPs com o poloxamer 407 de modo a evitar a coalescência das nanopartículas. Para este fim, as Ag-NPs foram estabilizadas com P407 e sintetizadas por redução de sais de nitrato de prata com o borohidreto de sódio. Deste modo, nesta síntese, 0.022 g e 0.073 g de P407 foram adicionados na solução AC/DMF (conforme o ponto 2.1) contendo 0.3 mM e 1.0 mM AgNO_3 , respetivamente, na proporção 1:1 (precursor/estabilizante) em massa/volume. Após a adição de 0.3 mM e 1.0 mM de borohidreto de sódio (NaBH_4) na proporção de 1:1:1 (precursor/estabilizante/reductor) na solução verificou-se que esta apresentava uma cor acastanhada, confirmando assim a formação de Ag-NPs. As soluções foram de seguida transferidas para placas de *petri* e colocadas em uma estufa a uma temperatura de 60 °C durante 36h.

A Tabela 3 apresenta a informação sobre a composição química dos nanocompósitos preparados com o poloxamer 407.

Tabela 3 - Composição química dos nanocompósitos obtidos com poloxamer 407.

AC	Composição química			Tempo de evaporação do solvente (h)
	AgNO_3 (mM)	NaBH_4 (mM)	P407 (g)	
2 wt. % (1 g AC/50 mL DMF)	0.3	0.3	0.022	36
	1.0	1.0	0.073	36
4 wt. % (2g AC/50 mL DMF)	0.3	0.3	0.022	36
	1.0	1.0	0.073	36

2.3. Síntese de Al-NPs

A síntese das Al-NPs foi realizada de acordo com o método aplicado por Oliveira *et al.* [80]. Neste método utiliza-se o isopropóxido de alumínio ($\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$), como precursor para formar as Al-NPs.

Na síntese de Al-NPs, 1.0 mM e 30 mM de isopropóxido de alumínio ($\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$) foram adicionados a uma solução de 50 mL de DMF contendo 2 g de AC (4 wt. %), sob agitação a uma temperatura de 23 °C. De seguida foi adicionado 2.0 mM e 60 mM de ácido clorídrico (HCl) na proporção 1:2 ($\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3/\text{HCl}$) na solução, como catalisador. O pH da solução após a adição do HCl foi de 6.0. As soluções foram em seguida transferidas para placas de *petri* e colocadas numa estufa a uma temperatura de 60 °C durante 36h.

2.4. Síntese de Ag-NPs e Al-NPs

Na síntese de Ag-NPs e Al-NPs, 1.0 mM e 30 mM de AgNO_3 foram adicionados numa solução de 50 mL de DMF contendo 2g de AC (4 wt. %), sob agitação a uma temperatura de 23 °C. De seguida, foi adicionado NaBH_4 na proporção de 1:1 ($\text{AgNO}_3/\text{NaBH}_4$) em volume. Após a adição do borohidreto de sódio na solução, verificou-se que esta apresentava uma cor amarela, confirmando assim a formação de Ag-NPs. Após a confirmação da formação de Ag-NPs, foram incorporados 1.0 mM e 30 mM de isopropóxido de alumínio ($\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$) na proporção 1:1 e 1:30 ($\text{AgNO}_3/\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$) em volume, seguido da adição de 2.0 mM e 60 mM de HCl respetivamente, na proporção 1:2 ($\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3/\text{HCl}$) em volume. O pH da solução após a adição do HCl foi de 6.0. As soluções foram de seguida transferidas para placas de *petri* e colocadas numa estufa a uma temperatura de 60 °C durante 36h. Para que se possa perceber melhor a reação descrita é apresentado um esquema representativo da mesma na Figura 10.

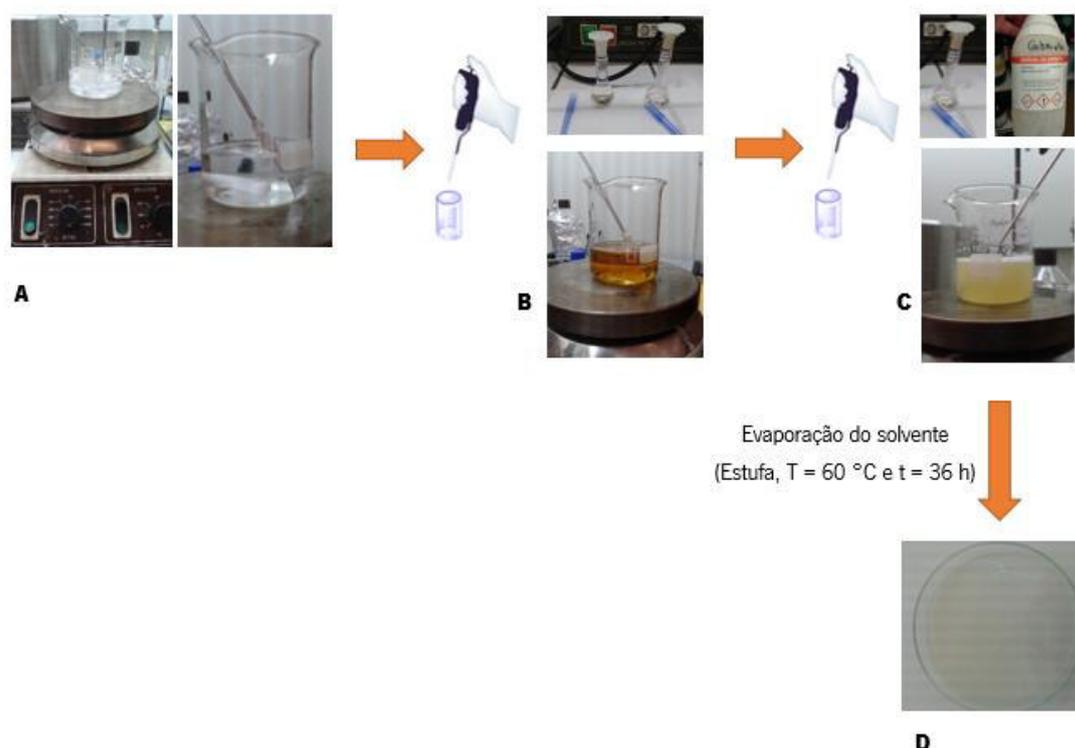


Figura 10 – Esquema representativo da síntese de Ag-NPs, juntamente com Al-NPs. **(A)** dissolução do AC em DMF, **(B)** redução *in situ* do AgNO₃ com NaBH₄, **(C)** deposição *in situ* de Al(Pr-*i*O)₃ e ajuste do pH com HCl, **(D)** membrana de AC contendo Ag-NPs e Al-NPs obtida.

A Tabela 4 apresenta a informação sobre a composição química dos nanocompósitos preparados com o isopropóxido de alumínio.

Tabela 4 - Composição química dos nanocompósitos obtidos com isopropóxido de alumínio (Al(Pr-*i*O)₃).

AC	Composição química				Tempo de evaporação do solvente (h)
	AgNO ₃ (mM)	NaBH ₄ (mM)	Al(Pr- <i>i</i> O) ₃ (mM)	HCl (mM)	
	-	-	1.0	2.0	36
4 wt. %	1.0	1.0	1.0	2.0	36
(2 g AC/50 mL DMF)	-	-	30	60	36
	1.0	1.0	30	60	36

3. Caracterização dos nanocompósitos

3.1. Dispersão dinâmica de luz (DLS)

A Dispersão dinâmica de luz (DLS) é a técnica mais versátil e usada para determinar *in situ* os tamanhos, distribuição de tamanhos e, em alguns casos, a forma das nanopartículas em solução [81, 82].

O DLS mede a flutuação da intensidade da luz dispersa causada pelo movimento das partículas (movimento Browniano), de modo a obter a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das mesmas. A importância do movimento Browniano em DLS deve-se ao facto de partículas pequenas se moverem mais rapidamente do que partículas maiores. Desta forma, as partículas de maiores dimensões dispersam mais a luz incidente, e as partículas de menores dimensões espalham menos a radiação [83].

A relação entre o tamanho da partícula e a velocidade a que esta se move é definida pela equação Stokes-Einstein,

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

sendo k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura, η a viscosidade do meio e r o raio da partícula [81, 83].

O equipamento utilizado neste trabalho foi o Malvern Zetasizer NS, fabricado pela Malvern Instruments. Este equipamento permite medir o valor médio do raio hidrodinâmico e distribuição de tamanhos, tal como o índice de polidispersividade das Ag-NPs. Estas medidas foram realizadas imediatamente após o processo de síntese das Ag-NPs, onde 800 μL da solução foi transferida para uma *cuvette* de quartzo e analisada usando um laser He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) e um ângulo de deteção de 173° . Para cada amostra foram realizadas, pelo menos, 3 medições. O *software* usado para o tratamento dos dados foi o Zetasizer 7.03, da Malvern Instruments Ltd.

Através desta técnica, foram analisadas as soluções com diferentes concentrações de AC (2 wt. % e 4 wt. %), contendo diferentes concentrações de AgNO_3 (0.3 mM e 1.0 mM), com e sem a presença de Poloxamer 407, numa proporção de 1:1 (AgNO_3 /P407) em volume/massa.

3.2. Espectroscopia de UV-visível

A espectroscopia UV-vis utiliza a luz na faixa de energias do visível (400 – 800 nm), ultravioleta (300 – 400 nm) onde as moléculas sofrem transições eletrónicas moleculares. Através desta técnica é possível estudar a absorção de luz UV-vis das soluções coloidais em função do comprimento de onda.

Esta técnica espectroscópica foi utilizada com o intuito de verificar a formação de Ag-NPs em soluções coloidais, uma vez que estas apresentam, frequentemente, bandas de absorção na região do ultravioleta-visível que correspondem a oscilações coletivas dos elétrons das nanopartículas em ressonância com a onda eletromagnética da luz, ocorrendo nestas condições, a absorção de radiação. Estas bandas designadas por bandas plasmónicas superficiais (SPR). Esta absorção depende fortemente do tamanho da partícula, meio dielétrico e dos compostos circundantes [84]. As Ag-NPs esféricas, com aproximadamente um diâmetro médio hidrodinâmico entre 25 - 50 nm, normalmente exibem uma banda SPR que ocorre na região do visível entre 390 e 420 nm [46]. No entanto, dependendo do seu tamanho, estas Ag-NPs podem aparecer na região de comprimentos de onda entre 490-550 nm [85]. É de referir que, para partículas não esféricas, podem ocorrer duas ou mais bandas SPR [51].

O equipamento utilizado foi o espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC de feixe duplo, o que permite fazer a diferença entre a solução e a solução de controlo (solução de AC) operando a uma resolução de 1 nm na gama de comprimentos de onda 190-800 nm. Para as leituras foram utilizadas *cuvettes* de quartzo de 3 mL.

Com esta técnica, foram analisadas as soluções com diferentes concentrações de AC (2 wt. % e 4 wt. %), contendo diferentes concentrações de AgNO_3 (0.3 mM e 1.0 mM), com e sem a presença de Poloxamer 407, numa proporção de 1:1 (AgNO_3 /P407) em volume/massa.

3.3. Medição do ângulo de contacto

Para determinar o carácter hidrofílico/hidrofóbico das membranas, foram medidos os ângulos de contacto formados na superfície das mesmas por um líquido de referência polar, a água.

O método utilizado foi o da gota séssil usando o equipamento OCA 15 PLUS, DATAPHYSICS. As medições foram realizadas à temperatura de 23 °C e, em cada substrato celulósico foram efetuadas, pelo menos, seis medições. Cinco segundos foi o intervalo de tempo usado entre cada medição.

Através desta técnica, foram analisadas as membranas com diferentes concentrações de AC (2 wt. % e 4 wt. %), contendo diferentes concentrações de AgNO_3 (0.3 mM e 1.0 mM), com e sem a presença de Poloxamer 407, numa proporção de 1:1 (AgNO_3 /P407) em volume/massa.

3.4. Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR)

O FTIR mede as transições entre estados vibracionais das moléculas, que são induzidos através da irradiação da amostra com luz emitida na região do infravermelho. A maioria dos compostos químicos apresenta um espectro com picos bem definidos a determinadas frequências, que correspondem a frequências vibracionais de grupos funcionais específicos ou de determinados tipos de ligações [86].

As técnicas de espectroscopia de infravermelhos podem ser divididas em:

- Espectroscopia de reflexão interna – Reflexão atenuada total (ATR);
- Espectroscopia de reflexão externa – Reflexão especular;
- Combinação entre espectroscopia de reflexão interna e externa – Reflexão difusa (DRIFT).

Neste trabalho o equipamento utilizado foi o Jasco FT/IR 4100 com o dispositivo ATR. O FTIR-ATR foi o método mais apropriado na análise das membranas, uma vez que estas apresentavam uma determinada espessura e opacidade, não sendo possível a visualização dos picos no FTIR sem o acoplamento do dispositivo ATR. O ensaio de FTIR-ATR foi iniciado com um teste em branco de modo a obter-se a linha de base. Após o ensaio, obteve-se um espectro da percentagem de transmitância em função do comprimento de onda, no qual se observaram picos de intensidade em determinados comprimentos de onda, que correspondem a ligações químicas específicas presentes na estrutura do material. Este ensaio foi realizado num intervalo de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , com uma média de 64 varreduras e uma resolução de 8.0 cm^{-1} .

Através desta técnica, foram analisadas as membranas com diferentes concentrações de AC (2 wt. % e 4 wt. %), contendo diferentes concentrações de AgNO_3 (0.3 mM e 1.0 mM), com e sem a presença de Poloxamer 407, numa proporção de 1:1 (AgNO_3 /P407) em volume/massa.

3.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é uma técnica de análise térmica que permite o estudo da variação da massa de uma substância associada a um processo de transição ou degradação térmica, em função da temperatura ou do tempo, quando esta é submetida a um programa controlado, sob uma atmosfera adequada (inerte ou reativa) [87].

Neste trabalho foi usado um equipamento de TGA, modelo Q500, fabricado por TA Instruments.

A análise de TGA foi realizada na caracterização das membranas de AC e nas membranas de AC reforçadas com 1.0 mM de AgNO₃ com e sem a presença de Poloxamer 407, na proporção 1:1 (AgNO₃/P407) em volume/massa. O ensaio foi realizado num varrimento em temperatura de 30 °C até 800 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera inerte (N₂). Nestas condições, foi possível averiguar, em função da curva obtida, qual seria a perda de massa destas membranas em função do aumento controlado da temperatura.

Esta análise termogravimétrica possibilitou a obtenção de informação sobre as características de uma determinada substância, nomeadamente acerca da resistência térmica do material inorgânico, uma vez que a sequência de reações físico-químicas que ocorrem durante o aquecimento depende fortemente da composição química da substância e da sua estrutura molecular [87].

3.6. Análise mecânica dinâmica (DMA)

O DMA permite o estudo da dependência da temperatura nas propriedades viscoelásticas dos materiais quando estes são sujeitos à aplicação de uma força sinusoidal e a um programa de temperaturas controlado [88].

Os polímeros são materiais que exibem comportamentos viscoelásticos, ou seja, possuem características elásticas e viscosas. Com esta técnica é possível determinar o módulo mecânico dinâmico (E) que é definido pela relação entre o módulo elástico (E'), que está geralmente relacionado com a rigidez do material e o módulo viscoso (E''), que está geralmente relacionado com a componente viscosa, componente imaginária, do material [89]. A razão entre a parte imaginária e a parte real é definida como $\tan \delta$, tangente de perda ou fator de dissipação.

$$E = E' + iE'' \quad (3)$$

$$E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta \quad (4)$$

$$E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \delta \quad (5)$$

$$(\tan \delta) = \frac{E''}{E'} \quad (6)$$

O equipamento utilizado neste trabalho foi o DMA Triton Technology. Este equipamento permite a realização de ensaios em modo tração e modo flexão. Os ensaios efetuados neste trabalho foram realizados em modo flexão, a uma frequência de 1 Hz, num intervalo de

temperatura de 30 a 130 °C a uma velocidade de 2 °C/min. O equipamento foi calibrado de acordo com o procedimento padrão e os ensaios foram realizados em amostras retangulares com dimensões 3 x 30 mm numa direção longitudinal. As membranas testadas foram as membranas de AC e as membranas de AC reforçadas com 1.0 mM de AgNO₃ com e sem a presença de Poloxamer 407, na proporção 1:1 (AgNO₃/P407). Neste equipamento foram introduzidas as dimensões das membranas a testar e em função desses valores foi aplicada a tensão sinusoidal.

3.7. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

O SEM é uma técnica de caracterização superficial que permite a observação e caracterização morfológica de materiais heterogêneos, orgânicos e inorgânicos, numa escala nanométrica (nm) ou micrométrica (μm). O SEM consiste em fazer incidir um feixe localizado de elétrons de elevada energia, acelerados por aplicação de uma diferença de potencial, numa amostra. A interação entre o feixe de elétrons com os átomos que constituem a amostra, gera sinais, que são convertidos em mudanças de intensidade ponto por ponto, que leva à produção da imagem com informação sobre a topografia da mesma, incluindo microestrutura, composição, estrutura cristalina e orientação dos materiais que a compõem [90, 91].

A esta técnica pode-se adaptar um sistema integrado de microanálise por raios-X (EDS – Espectroscopia dispersiva de raios-X), que permite identificar e quantificar os elementos presentes na superfície da amostra, através da deteção dos raios-X característicos emitidos pela amostra, resultantes da interação dos elétrons primários com a superfície [92, 93].

A conjugação das técnicas SEM/EDS permite obter imagens tridimensionais da amostra, e mapas de composição dos elementos à superfície.

Esta análise morfológica foi efetuada às membranas de AC e às membranas reforçadas com 1.0 mM de AgNO₃ com e sem a presença de Poloxamer 407, na proporção 1:1 (AgNO₃/P407). As membranas foram revestidas em ouro, na área a analisar, com o propósito de tornar condutora a superfície das amostras, permitindo a sua análise por SEM, no equipamento NanoSEM-FEI Nova 200.

3.8. Atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana, foram postas em contacto 3 g de membranas a testar com 300 mL de uma suspensão líquida, contendo bactérias sob uma velocidade de

agitação de 100 rpm e a uma temperatura de 23 °C, durante 72 horas. A concentração bacteriana (CFU.mL⁻¹) da suspensão líquida foi determinada pelo Laboratório de Análises Técnicas – Hilário Lima, segundo a metodologia ISO 6222:1999, que consiste na enumeração de microrganismos cultiváveis, por contagem das colónias formadas em um meio de cultura nutriente de agar, após incubação aeróbia a 22 °C e 37 °C.

Os resultados obtidos foram expressos em termos de eficiência antibacteriana determinada a partir da equação 7.

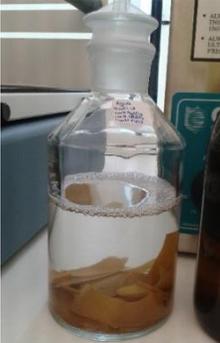
$$Eficiência\ antibacteriana = \frac{[CFU]_{inicial} - [CFU]_{final}}{[CFU]_{final}} \times 100 \quad (7)$$

As contagens de colónias são úteis para a avaliação do estado da água e dos processos de tratamento utilizados. O principal interesse desta contagem, reside na possibilidade de se poder detetar alterações em relação ao histórico, baseando-se num controlo frequente e a longo prazo. Caso se verifique um aumento repentino na concentração bacteriana, isto pode significar que existe um foco de poluição [94].

As membranas analisadas neste estudo, foram as membranas com uma concentração de 4 wt. % de AC reforçadas com 1.0 mM de AgNO₃ com e sem a presença de poloxamer 407, numa proporção 1:1 (AgNO₃/P407), assim como as membranas de 4 wt. % de AC contendo 1.0 mM de AgNO₃ e Al(Pr-*i*O)₃, numa proporção 1:1 (AgNO₃/ Al(Pr-*i*O)₃). A suspensão líquida de bactérias com e sem a incorporação de membranas de 4 wt. % de AC, foram utilizadas como amostras de controlo.

Na Tabela 5 apresentam-se as membranas estudadas neste método, tal como o método de contacto aplicado.

Tabela 5 – Membranas de nanocompósitos analisadas no estudo da atividade antibacteriana.

Membranas analisadas no estudo da atividade antibacteriana		
4 wt. % AC_AgNO ₃	4 wt. % AC_AgNO ₃ /P407	4 wt. % AC_AgNO ₃ /Al(Pr- <i>i</i> O) ₃
1.0 mM	1.0 mM (1:1)	1.0 mM (1:1)
		

3.9. Estudos de remoção de Fósforo

Neste estudo, 0.25 g de membranas a testar contendo Al(Pr-*i*O)₃ foram postas em contacto com 25 mL de uma solução contendo 1.0 mg/L de fósforo. Estes ensaios foram feitos em triplicado sob uma velocidade de agitação de 100 rpm e a uma temperatura de 23 °C durante 24 horas, usando o dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) como fonte de fosfato.

A concentração de fósforo foi medida no início e no final de cada ensaio pelo método colorimétrico de ácido ascórbico usando o espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC (Método 4500P-E, Eaton *et al.* [95]) com o objetivo de desenvolver um complexo colorido. A absorvância foi medida no comprimento de onda a 882 nm, utilizando como amostra de controlo a solução de fósforo em contacto com as membranas de AC. Este é um método colorimétrico que relaciona a intensidade da cor com a concentração de fósforo.

As membranas analisadas neste estudo foram as membranas com uma concentração de 4 wt. % de AC contendo diferentes concentrações de Al(Pr-*i*O)₃ com e sem a presença de AgNO₃, numa proporção de 1:1 e 30:1 (Al(Pr-*i*O)₃/ AgNO₃).

4. Designação das amostras

Ao longo deste trabalho foram sintetizadas e estudadas diferentes membranas. A Figura 11 e Figura 12 resumem todas as sínteses abordadas e que irão ser posteriormente caracterizadas neste trabalho de investigação.

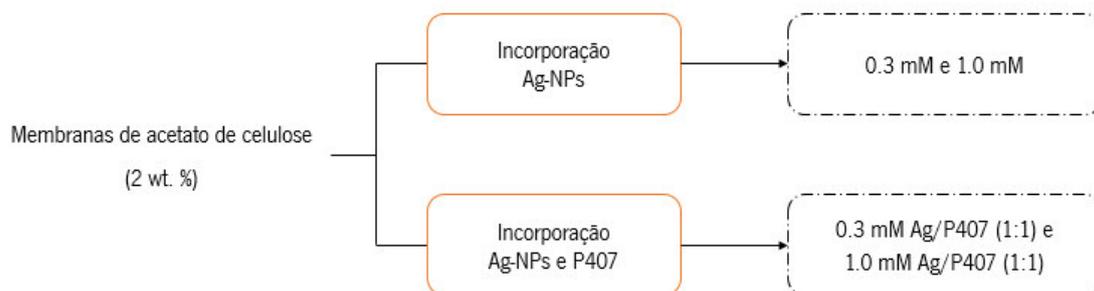


Figura 11 – Esquema representativo das membranas obtidas para concentrações de 2 wt. % de AC.

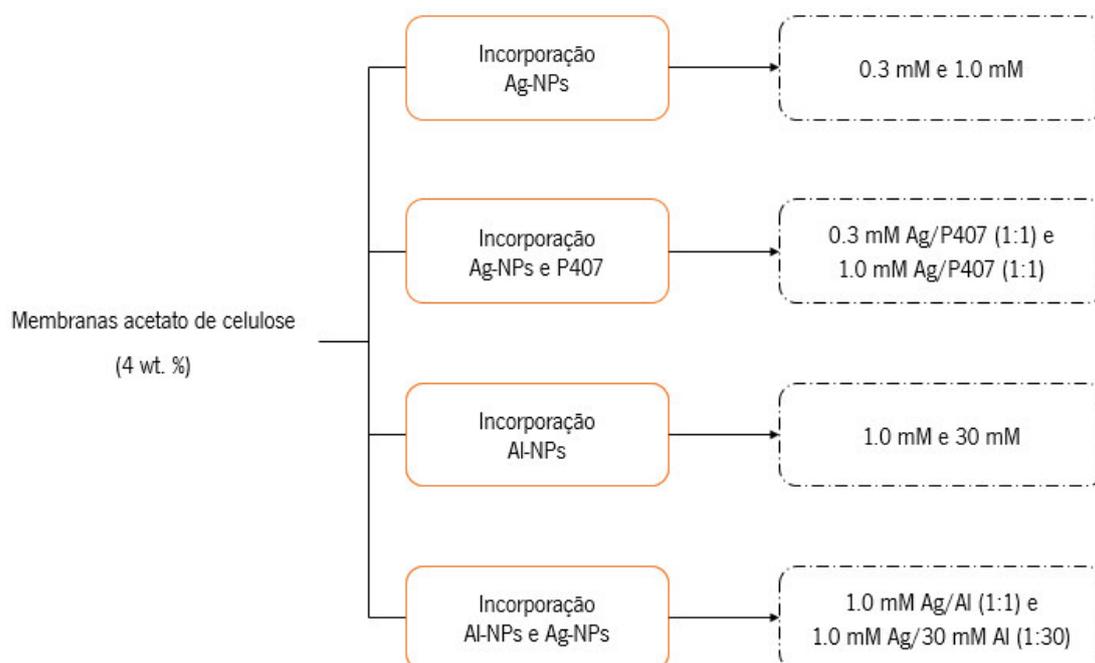


Figura 12 – Esquema representativo das membranas obtidas para concentrações de 4 wt. % de AC.

As membranas sintetizadas foram designadas tendo em conta o tipo de material e a quantidade de nanopartículas metálicas utilizadas. Durante este trabalho, foram utilizados diferentes concentrações de substrato celulósico contendo três componentes diferentes, nitrato de prata, isopropóxido de alumínio e poloxamer 407. Na Tabela 6 encontra-se a designação dada às membranas investigadas. Após a quantidade de matriz utilizada é adicionado o nome da mesma, seguido do nome e quantidade das cargas incorporadas.

Tabela 6 - Designação das membranas obtidas.

Designação	Descrição
2 wt. % AC	Matriz de acetato de celulose com uma consistência de 2 wt. %
2 wt. % AC/Ag_0.3 mM	Nanocompósito de AC (2 wt. %) contendo 0.3 mM de AgNO ₃
2 wt. % AC/Ag_1.0 mM	Nanocompósito de AC (2 wt. %) contendo 1.0 mM de AgNO ₃
2 wt. % AC/Ag/P407_0.3 mM (1:1)	Nanocompósito de AC (2 wt. %) contendo 0.3 mM de AgNO ₃ e 0.3 mM de poloxamer 407, numa proporção de 1:1 (v/m)
2 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	Nanocompósito de AC (2 wt. %) contendo 1.0 mM de AgNO ₃ e 1.0 mM de poloxamer 407, numa proporção de 1:1 (v/m)
4 wt. % AC	Matriz de acetato de celulose com uma consistência de 4 wt. %
4 wt. % AC/Ag_0.3 mM	Nanocompósito de AC (4 wt. %) contendo 0.3 mM de AgNO ₃
4 wt. % AC/Ag_1.0 mM	Nanocompósito de AC (4 wt. %) contendo 1.0 mM de AgNO ₃
4 wt. % AC/Ag/P407_0.3 mM (1:1)	Nanocompósito de AC (4 wt. %) contendo 0.3 mM de AgNO ₃ e 0.3 mM de poloxamer 407, numa proporção de 1:1 (v/m)
4 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	Nanocompósito de AC (4 wt. %) contendo 1.0 mM de AgNO ₃ e 1.0 mM de poloxamer 407, numa proporção de 1:1 (v/m)
4 wt. % AC/Al_1.0 mM	Nanocompósito de AC (4 wt. %) contendo 1.0 mM de Al(Pr- <i>i</i> O) ₃
4 wt. % AC/Al_30 mM	Nanocompósito de AC (4 wt. %) contendo 30 mM de Al(Pr- <i>i</i> O) ₃
4 wt. % AC/Ag/Al_1.0 mM (1:1)	Nanocompósito de AC (4 wt. %) contendo 1.0 mM AgNO ₃ e 1.0 mM de Al(Pr- <i>i</i> O) ₃ , numa proporção 1:1 (v/v)
4 wt. % AC/Ag/Al_1:30 mM	Nanocompósito de AC (4 wt. %) contendo 1.0 mM AgNO ₃ e 30 mM de Al(Pr- <i>i</i> O) ₃ , numa proporção 1:30 (v/v)

Capítulo IV – Apresentação e discussão dos resultados

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nesta dissertação. Os resultados estão subdivididos em 2 secções principais. Na primeira secção, são apresentados os resultados da caracterização efetuada às membranas de nanocompósitos de AC contendo Ag-NPs com e sem a presença do surfactante (poloxamer 407). Estes nanocompósitos, foram obtidos *in situ* por redução do nitrato de prata (AgNO_3) com borohidreto de sódio (NaBH_4) numa solução de acetato de celulose, sendo os materiais finais obtidos na forma de membranas. As membranas de nanocompósitos foram caracterizados morfológicamente, superficialmente e termicamente, assim como em termos da sua atividade antibacteriana, sendo discutido o efeito da incorporação do poloxamer 407, teor de AgNO_3 e respetivo tamanho das Ag-NPs na matriz de AC. Na segunda secção, são apresentados os resultados relativos ao estudo da remoção de fósforo e atividade antibacteriana das membranas de AC contendo Ag-NPs em conjunto com as Al-NPs.

1. Caracterização das membranas de nanocompósitos

1.1. Membranas de AC contendo Ag-NPs

A redução *in situ* de sais de nitrato de prata com borohidreto de sódio em soluções de AC deu origem a membranas, não só com propriedades físicas e químicas diferentes, como também com um aspeto característico, nomeadamente no que respeita à cor e opacidade.

Tabela 7 - Aspeto visual das membranas de nanocompósitos desenvolvidas contendo Ag-NPs.

Membranas		
2 wt. % AC		
2 wt. % AC	2 wt. % AC/Ag_0.3 mM	2 wt. % AC/Ag/P407_0.3 mM (1:1)
		
	2 wt. % AC/Ag_1.0 mM	2 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)
		
4 wt. % AC		
4 wt. % AC	4 wt. % AC/Ag_0.3 mM	4 wt. % AC/Ag/P407_0.3 mM (1:1)
		
	4 wt. % AC/Ag_1.0 mM	4 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)
		

Na Tabela 7 verifica-se que a incorporação de Ag-NPs na matriz de AC dá origem a membranas macroscopicamente homogéneas, transparentes, e com uma cor variável, em função da concentração de AgNO_3 , isto é, com o aumento da concentração de AgNO_3 observa-se uma alteração da cor de amarelo para laranja.

No caso das membranas obtidas por redução *in situ* do AgNO_3 na presença do poloxamer 407, que assume o papel de estabilizador das nanopartículas, verifica-se que as mesmas exibem uma superfície mais opaca com uma cor mais escura (acastanhado).

Esta diferença de cores observada indica que existe a formação de diferentes tamanhos e/ou formas de Ag-NPs. Para analisar esta hipótese, fez-se a análise por DLS das soluções coloidais.

1.1.1. Dispersão dinâmica de luz

A técnica de DLS foi utilizada para medir o diâmetro médio hidrodinâmico das Ag-NPs sintetizadas, em soluções coloidais, tendo em vista a aplicabilidade destas nanopartículas no estudo da atividade antibacteriana. Klemenčič *et al.* [96] reportaram que a atividade antibacteriana das membranas diminui com o aumento do tamanho das Ag-NPs, devendo-se este facto à lenta libertação de iões de Ag(I) da superfície dos aglomerados. Desta forma, sabendo que o tamanho das Ag-NPs tem uma influência determinante no estudo antibacteriano, procedeu-se então à análise do seu tamanho e respetiva distribuição de tamanhos.

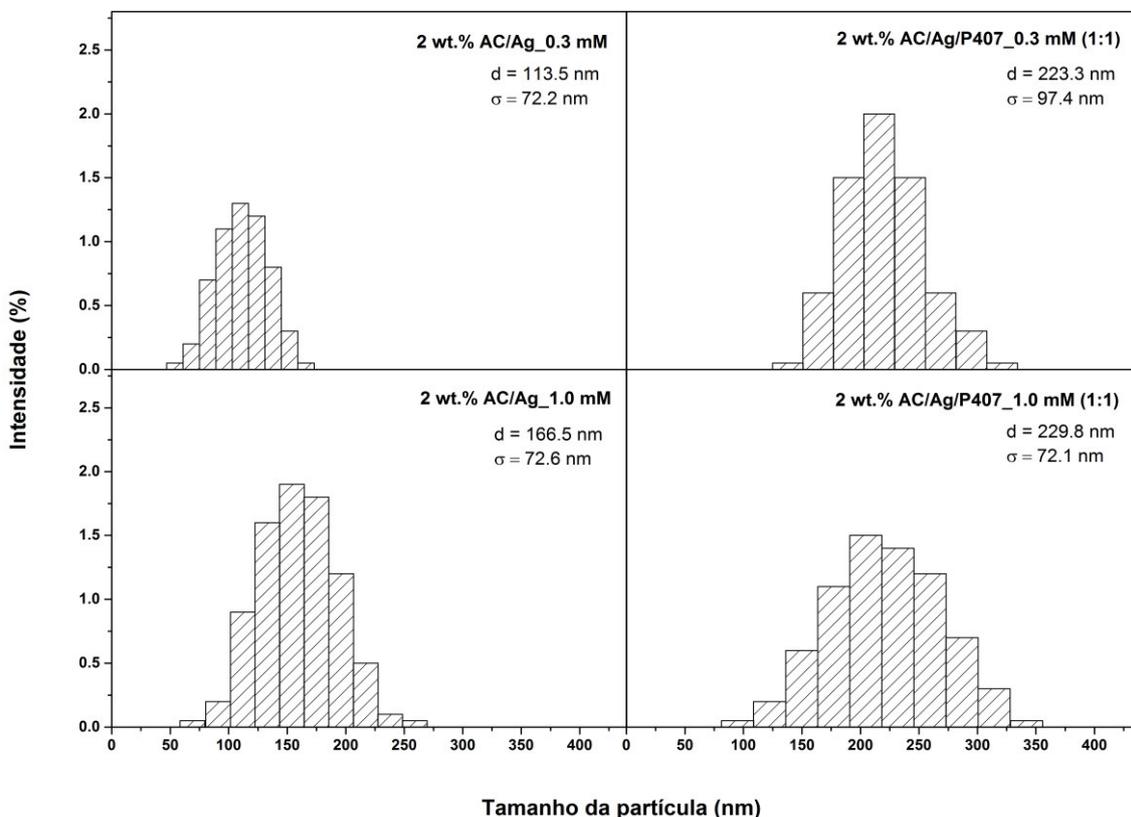


Figura 13 – Distribuição de tamanhos das Ag-NPs nas membranas de 2 wt. % de AC.

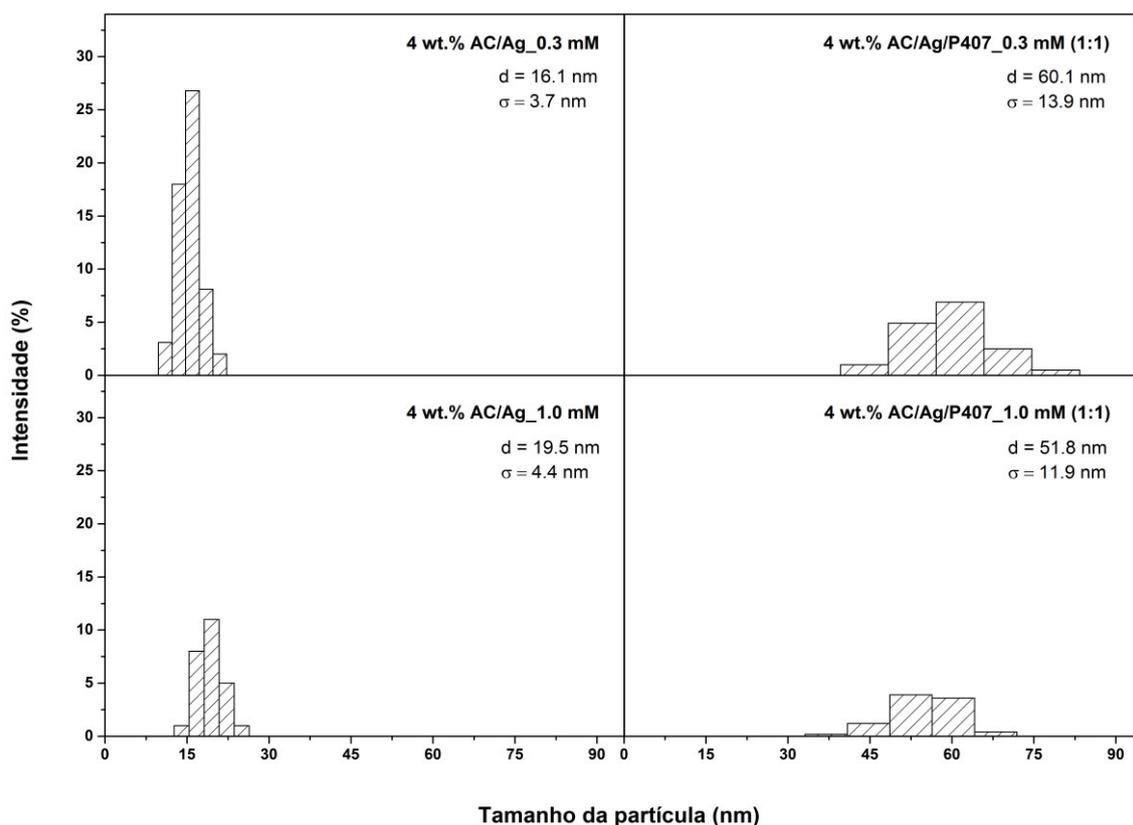


Figura 14 – Distribuição de tamanhos das Ag-NPs nas membranas de 4 wt. % de AC.

Na Figura 13 e Figura 14, verifica-se que é nas soluções coloidais de 4 wt. % de AC que existe o menor tamanho e menor distribuição de tamanhos das Ag-NPs formadas. Sendo ainda possível verificar-se que para as soluções coloidais de 4 wt. % de AC incorporadas com 0.3 mM de AgNO_3 são obtidos os menores valores de diâmetro médio hidrodinâmico observado (16.1 ± 3.7 nm).

No caso das soluções coloidais de 2 wt. % de AC, verifica-se que estas são as que apresentam maiores tamanhos e maiores distribuição de tamanhos, uma vez que o valor do diâmetro médio hidrodinâmico das Ag-NPs obtido é superior a 100 nm. Contudo, para as soluções coloidais com uma maior concentração de AC (4 wt. %), verifica-se que o valor do diâmetro médio hidrodinâmico das Ag-NPs é inferior a 100 nm. Desta forma, verifica-se que com o aumento da concentração de AC, a capacidade de redução das Ag-NPs formadas aumenta devido à presença de um maior número de grupos hidroxilo (-OH) existentes no AC capazes de prenderem os iões Ag(I) por meio de interações ião-dipolo [97]. Existe assim, um impedimento da aglomeração das Ag-NPs devido ao aumento da distância entre as Ag-NPs e consequentemente diminuição das interações dipolo-dipolo entre partículas.

Relativamente à variação da concentração de AgNO₃ nas soluções coloidais, é visível em ambas as figuras um aumento do diâmetro médio hidrodinâmico com o aumento da concentração de AgNO₃, indicativo de uma aglomeração das Ag-NPs. Esta diferença de tamanhos pode ser explicada tendo em conta o mecanismo de crescimento por nucleação das Ag-NPs, isto é, a partir de determinada fase o crescimento das nanopartículas, dá-se através de um processo conhecido como *Ostwald ripening*, em que as nanopartículas maiores continuam a crescer à custa das mais pequenas, levando ao crescimento não uniforme das Ag-NPs.

No caso das soluções coloidais contendo Ag-NPs estabilizadas com poloxamer 407, visualiza-se um aumento significativo do diâmetro médio hidrodinâmico das Ag-NPs presente em ambas as soluções coloidais com diferentes concentrações de AC, que confirmam a aglomeração das mesmas. Para além disso, os tamanhos e distribuição de tamanhos das Ag-NPs estabilizadas com P407 observados é bem superior aos das soluções coloidais contendo Ag-NPs sem a presença de poloxamer 407. O facto do poloxamer 407 ter influenciado a aglomeração das Ag-NPs, pode ser devido à fraca ligação hidrofóbica, ou seja, fraca adsorção das cadeias de PPO na superfície das Ag-NPs, promovendo assim a agregação das mesmas [98]. No entanto, prevê-se que um aumento da concentração de P407 melhore a estabilização das Ag-NPs, pela formação de ligações hidrofóbicas mais fortes pelos complexos Ag-NPs – P407.

Tabela 8 - Valores do PDI e do diâmetro médio hidrodinâmico obtidos.

	Membranas	Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	PDI
2 wt. % AC	AC/Ag_0.3 mM	113.5 ± 72.2	0.450 ± 0.006
	AC/Ag/P407_0.3 mM (1:1)	223.3 ± 97.4	0.524 ± 0.002
	AC/Ag_1.0 mM	166.5 ± 72.6	0.506 ± 0.048
	AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	229.8 ± 72.1	0.573 ± 0.026
4 wt. % AC	AC/Ag_0.3 mM	16.1 ± 3.7	0.270 ± 0.033
	AC/Ag/P407_0.3 mM (1:1)	60.1 ± 13.9	0.544 ± 0.005
	AC/Ag_1.0 mM	19.5 ± 4.4	0.220 ± 0.035
	AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	51.8 ± 11.9	0.326 ± 0.045

O índice de polidispersividade (PDI) indica a distribuição média do tamanho das Ag-NPs, podendo este variar entre valores de 0 a 1, sendo 0 indicativo de uma solução monodispersa e 1

indicativo de uma solução polidispersa. Na Tabela 8, verifica-se que as soluções coloidais com um valor de PDI inferior ou igual a 0.4 (valor de PDI aceitável para nanopartículas), são as soluções com uma maior concentração de AC (4 wt. %). Desta forma, estas soluções coloidais são consideradas relativamente monodispersas.

No entanto, por comparação dos valores de PDI obtidos, verifica-se que a solução coloidal de 4 wt. % de AC contendo 1.0 mM de AgNO_3 com e sem a presença de poloxamer 407, é a que se apresenta mais monodispersa, ou seja, mais homogênea e com uma menor taxa de aglomeração das Ag-NPs. Desta forma, alguns dos valores elevados de PDI obtidos principalmente para as membranas de 2 wt. % de AC sugerem uma aglomeração das Ag-NPs.

1.1.2. Espectroscopia de UV-visível

A formação de Ag-NPs nas soluções coloidais foi comprovada através dos espectros de UV-Vis, com o intuito de obter informação relativa ao tamanho e forma das mesmas. A interação da luz com os elétrons das Ag-NPs leva a um fenómeno físico conhecido como ressonância de plasmão de superfície (SPR), o que resulta em picos de absorção ótica na região do UV-Vis.

Na Figura 15 e Figura 16, apresenta-se os espectros de absorção das soluções coloidais de AC contendo Ag-NPs com e sem a presença de poloxamer 407, obtidos na região de comprimentos de onda compreendidos entre 300 e 800 nm.

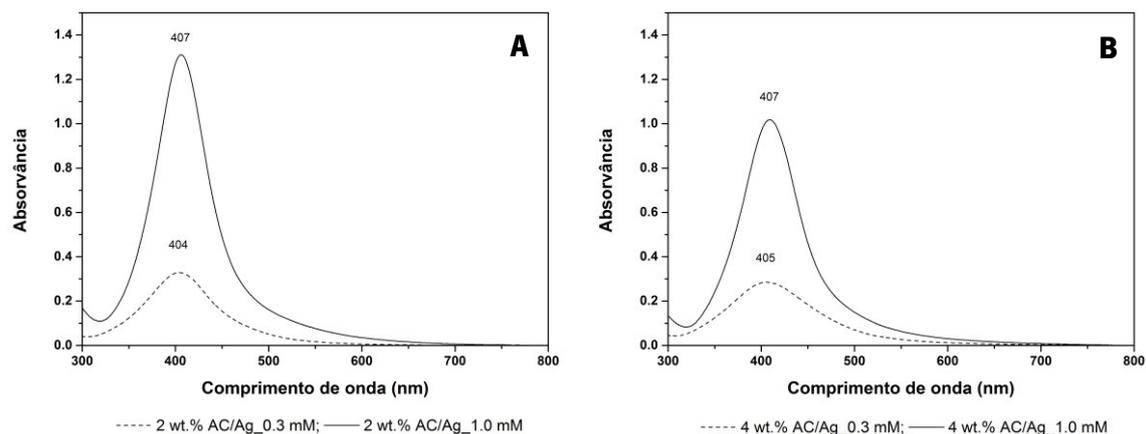


Figura 15 – Espectros de Absorção de UV-visível das soluções coloidais: (A) 2 wt. % AC/Ag-NPs e (B) 4 wt. % AC/Ag-NPs.

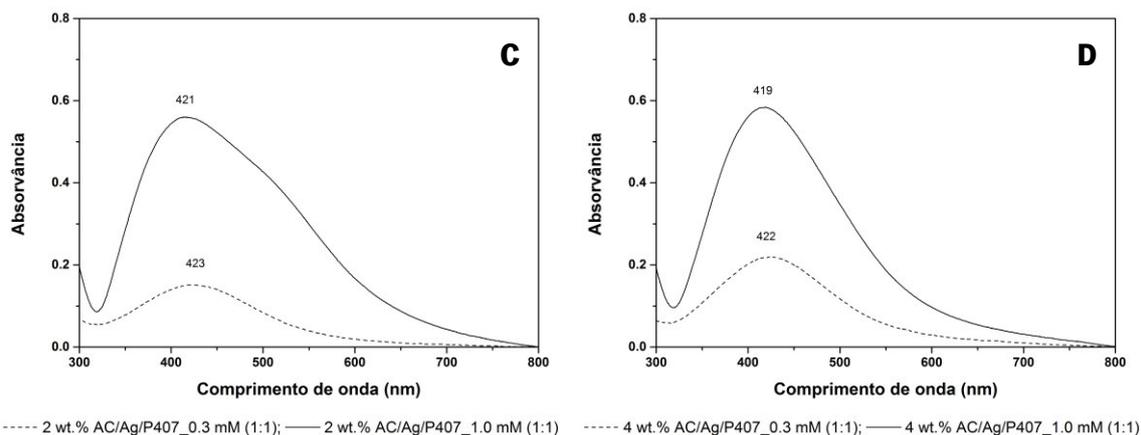


Figura 16 – Espectros de Absorção de UV-visível das soluções coloidais: **(C)** 2 wt. % AC/Ag-NPs/P407 e **(D)** 4 wt. % AC/Ag-NPs/P407.

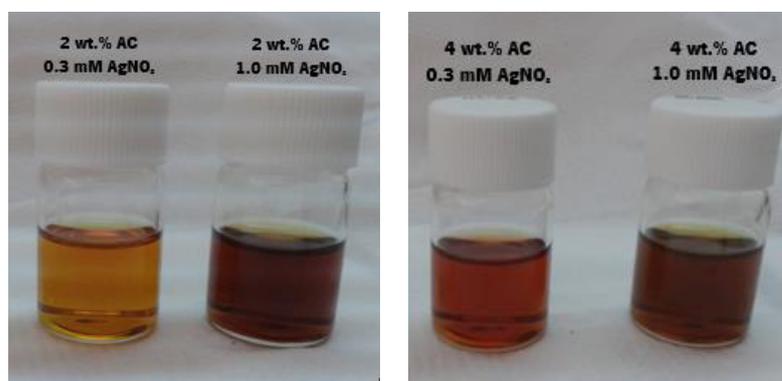
A partir da análise das bandas de absorção das soluções coloidais, verifica-se a presença de uma banda de absorção no comprimento de onda entre 350 a 500 nm, para cada uma das soluções, correspondente à banda de absorção típica das Ag-NPs (SPR). Corroborando assim, a formação das Ag-NPs nas soluções coloidais obtidas por redução *in situ* do AgNO_3 com o NaBH_4 . Resultados similares também foram obtidos por Jeong *et al.* [69] onde verificaram a mesma banda SPR das Ag-NPs na mesma gama de comprimentos de onda.

Por comparação de ambas as figuras, verifica-se que é nas soluções coloidais contendo 1.0 mM de AgNO_3 que existe um maior valor de absorção, sendo este mais acentuado nas soluções coloidais de AC contendo Ag-NPs sem a presença de poloxamer 407. Este aumento da intensidade da absorção, com o consequente aumento da concentração AgNO_3 , pode ser indicativo de um aumento do número de iões de Ag(I) que foram convertidos em Ag-NPs [99]. Por sua vez, nas soluções coloidais contendo 1.0 mM AgNO_3 sem a presença de poloxamer 407 observa-se um pequeno desvio da banda de absorção máxima para maiores comprimentos de onda (desvio para o vermelho), em relação às soluções coloidais contendo 0.3 mM AgNO_3 . Este efeito pode ser atribuído à aglomeração e/ou diversidade de morfologias das Ag-NPs, a mudanças das propriedades dielétricas do meio circundante na matriz polimérica, uma vez que a banda de absorção típica das Ag-NPs (SPR) depende fortemente da densidade de elétrões dentro da nanopartícula, e/ou ao acoplamento plasmónico devido às Ag-NPs se encontrarem mais próximas entre si [79, 100, 101]. De acordo com os dados obtidos por DLS, é visível um aumento do diâmetro médio hidrodinâmico das Ag-NPs para uma maior concentração de AgNO_3 . Portanto, o desvio da banda SPR observada é possivelmente devido ao aumento do tamanho das Ag-NPs.

Geralmente os dados obtidos pelo UV-Vis são indicativos não só de um aumento de tamanho como também de diversidade de forma. Segundo a teoria de Mie, para Ag-NPs esféricas apenas uma banda SPR é expectável nos espectros de absorção enquanto para Ag-NPs não esféricas, duas ou mais bandas SPR podem ocorrer [51]. Estes resultados mostram que apenas uma banda é visível nos espectros de absorção, o que poderá significar que as Ag-NPs presentes na solução coloidal são esféricas.

No que concerne à estabilização das Ag-NPs com poloxamer 407, pode-se verificar na Figura 16 que a incorporação do poloxamer 407 nas soluções coloidais provoca um alongamento das bandas características, assim como um desvio dos picos das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda (desvio para o vermelho), quando comparadas com os espectros das soluções coloidais de AC contendo Ag-NPs na Figura 15. Estas observações efetuadas indicam a possível formação de aglomerados de Ag-NPs, o que vai ao encontro dos resultados obtidos na Figura 14 e Figura 13 (DLS), onde é confirmada a aglomeração das Ag-NPs com a incorporação do poloxamer 407.

Uma vez que os tamanhos das Ag-NPs influenciam a posição da banda SPR, e consequentemente, o comprimento de onda, as soluções coloidais com diferentes tamanhos de Ag-NPs irão apresentar diferentes cores [69]. Na Figura 17 verifica-se que a solução coloidal final apresenta a cor amarela após a redução do AgNO_3 com NaBH_4 na matriz de AC. No entanto, com a incorporação do poloxamer 407, observa-se uma alteração da cor, mais precisamente uma alteração da cor amarela para acastanhada. Conforme referido anteriormente, com a incorporação do poloxamer 407, verifica-se um deslocamento da banda SPR para comprimentos de onda maiores o que significa que esta alteração de cor observada nas soluções coloidais, deve-se à formação de Ag-NPs mais aglomeradas.



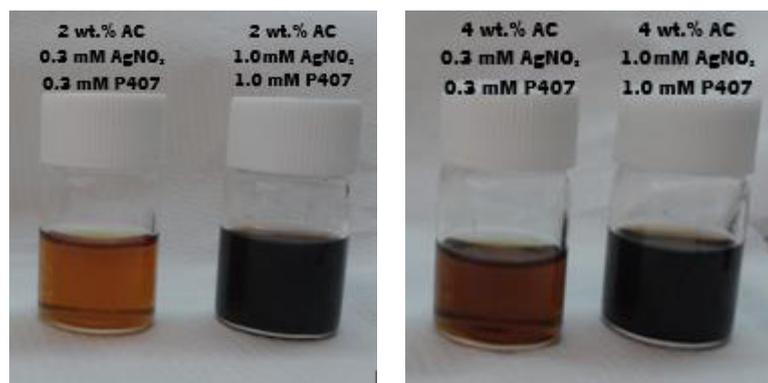


Figura 17 – Soluções coloidais analisadas por espectroscopia UV-Vis.

1.1.3. Medição de ângulo de contacto

O carácter hidrofílico/hidrofóbico das membranas foi avaliado através da medição dos ângulos de contacto formados na superfície das mesmas por um líquido de referência polar, a água. O intuito deste processo consiste, portanto, em determinar qualitativamente as alterações da hidrofilicidade das membranas.

De acordo com Vogler *et al.* [102] um ângulo de contacto, formado pela água, menor que 65° corresponde a uma superfície com carácter hidrofílico. Sendo considerada uma superfície hidrofóbica a que possui um ângulo de contacto com a água superior a 65° .

Na Tabela 9 apresenta-se os resultados obtidos das análises dos ângulos de contacto das membranas desenvolvidas.

Tabela 9 – Valores dos ângulos de contacto medidos.

Membranas		θ ($^\circ$)
2 wt. % AC	AC	57.9 ± 3.8
	AC/Ag_0.3 mM	58.7 ± 2.3
	AC/Ag/P407_0.3 mM (1:1)	37.2 ± 2.7
	AC/Ag_1.0 mM	60.2 ± 0.9
	AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	32.4 ± 5.3
4 wt. % AC	AC	58.4 ± 2.4
	AC/Ag_0.3 mM	58.6 ± 2.3
	AC/Ag/P407_0.3 mM (1:1)	40.8 ± 1.3
	AC/Ag_1.0 mM	58.6 ± 0.7
	AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	27.8 ± 2.6

Segundo a Tabela 9, verifica-se que as membranas de AC são hidrofílicas, uma vez que possuem um ângulo de contacto inferior a 65° , não apresentando nenhuma alteração significativa da hidrofilicidade dependente do aumento da concentração de polímero, uma vez que os valores obtidos para as diferentes concentrações de AC (2 wt. % e 4 wt. %) são bastante próximos. O mesmo se verifica para as membranas contendo diferentes concentrações de AgNO_3 (0.3 e 1.0 mM), podendo-se assim concluir que a incorporação de Ag-NPs nas membranas não influencia significativamente os valores dos ângulos de contacto obtidos para as diferentes concentrações de AC.

Relativamente à adição do poloxamer 407 nas membranas, verifica-se que com a introdução do surfactante, existe uma diminuição bastante acentuada do ângulo de contacto medido. Esta diminuição, como já foi referido, é indicativa de um aumento da hidrofilicidade das membranas, uma vez que os ângulos obtidos são inferiores a 65° . Apesar do mecanismo de interação entre as Ag-NPs com o surfactante não ser ainda completamente percebido, estudos realizados por Angelescu *et al.* [72] e Kvittek *et al.* [75] revelam que para se ter obtido membranas com carácter hidrofílico, o possível mecanismo se deve à adsorção das cadeias de PPO do poloxamer 407, que possuem um carácter hidrofóbico, nas superfícies das Ag-NPs, formando uma camada externa com as cadeias de PEO, que possuem um carácter hidrofílico. Estas são as cadeias que ficam em contacto com o meio aquoso, enquanto as cadeias de carácter hidrofóbico se protegem associando-se entre si e dando origem geralmente a uma conformação esférica ou elíptica. Para que se possa perceber melhor a interação descrita, é apresentado um esquema representativo da mesma na Figura 18.

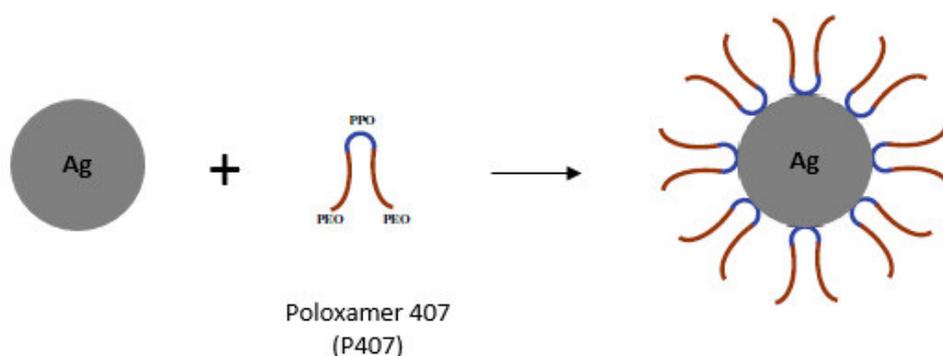


Figura 18 – Esquema representativo da formação do complexo P407 - Ag-NPs (adaptado [99]).

Equiparando os valores dos ângulos de contacto medidos, verifica-se que a membrana com 4 wt. % de AC para uma maior concentração de P407, ou seja, contendo 1.0 mM de poloxamer

407, é a membrana que possui um carácter mais hidrofílico ($\theta = 27.8 \pm 2.6^\circ$) permitindo assim concluir que a incorporação de P407 nas membranas de AC contendo Ag-NPs modifica/altera a morfologia das mesmas e melhora o efeito de hidroflicidade.

1.1.4. Espectroscopia de Infravermelhos

Para caracterizar a estrutura química superficial das várias membranas obtidas ao longo deste trabalho, realizou-se uma análise por FTIR-ATR (Figura 19 e Figura 20).

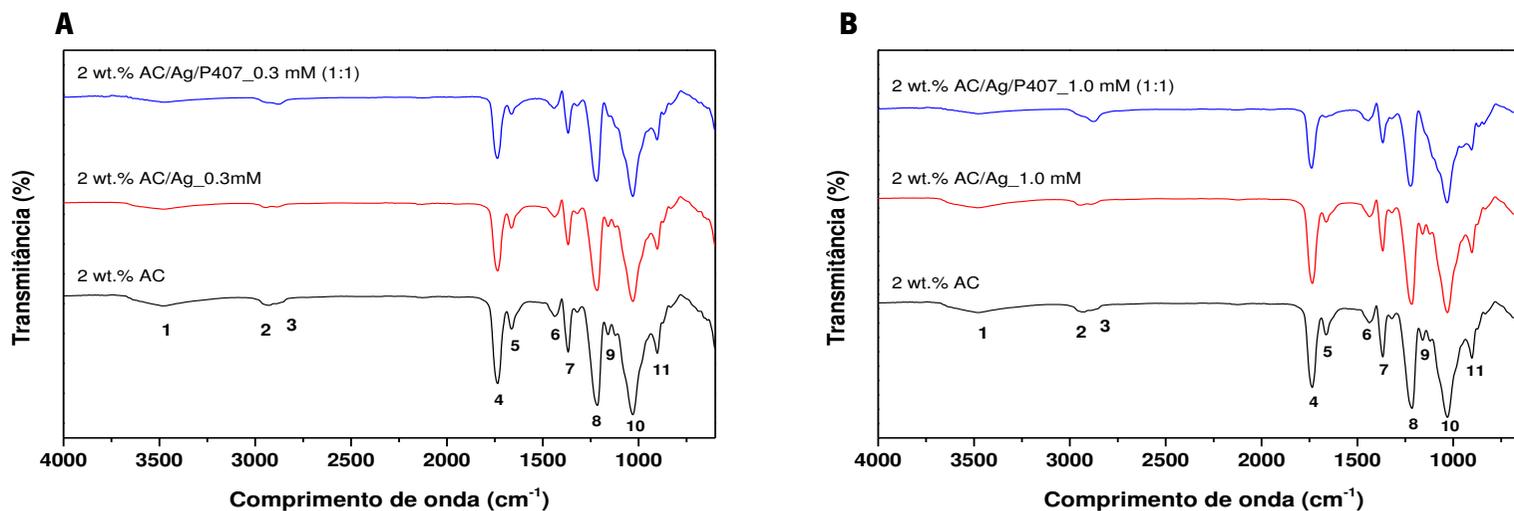


Figura 19 – Espectro de absorção FTIR-ATR das membranas de 2 wt. % de AC contendo: (A) 0.3 mM de AgNO₃ e P407 e (B) 1.0 mM de AgNO₃ e P407.

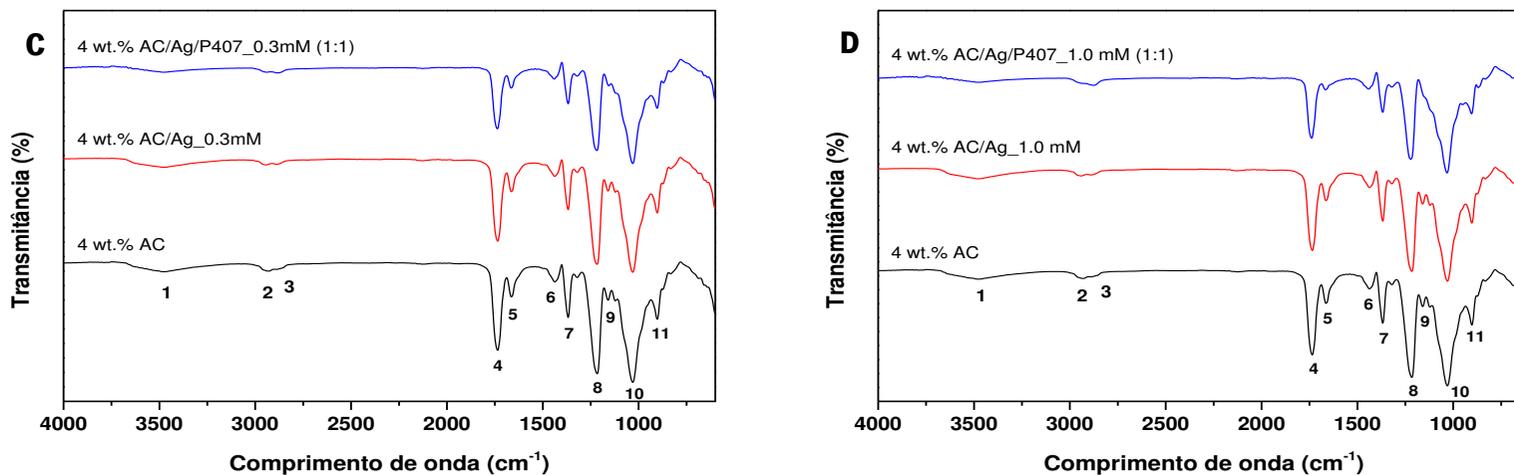


Figura 20 – FTIR-ATR das membranas de 4 wt. % de AC contendo: (C) 0.3 mM de AgNO₃ e P407 e (D) 1.0 mM de AgNO₃ e P407.

É possível verificar através dos espectros representados na Figura 19 e na Figura 20, que as membranas desenvolvidas apresentam bandas de absorção de luz infravermelha nos comprimentos de onda a 3473 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento da ligação O-H.

As bandas de absorção de luz infravermelha nos comprimentos de onda a 2930 cm^{-1} e nos comprimentos de onda a 1734 cm^{-1} , estes estão relacionados com o estiramento assimétrico do CH_3 e com o estiramento do grupo carbonilo do éster [$\nu(\text{C}=\text{O})$], respetivamente. A banda de absorção de luz infravermelha no comprimento de onda a 1734 cm^{-1} , é uma banda característica do grupo carbonilo do éster que pode ser usada para distinguir o AC de outros polímeros celulósicos (Tabela 10) [11].

Tabela 10 – Valores das bandas de absorção de luz infravermelha para os respetivos grupos químicos presentes nas membranas analisadas.

Posição da banda (cm^{-1})	Grupos Químicos
1: 3473	ν O-H
2: 2930	ν C-H (CH_3)
3: 2876	ν C-H (CH_2)
4: 1734	ν (C=O) carbonilo
5: 1662	C-OH
6: 1438	δ (CH_2)
7: 1367	δ (CH_3)
8: 1221	C-O
9: 1160	ν assimétrico (C-O-C)
10: 1031	ν (C-O-C)
11: 904	γ C-H

ν : estiramento

δ : deformação

γ : deformação externa

Por comparação dos diferentes espectros obtidos, verifica-se que a incorporação de Ag-NPs na membrana AC não provoca qualquer alteração, ou seja, desvios ou alongamentos das bandas características. No entanto, verifica-se uma redução da intensidade das mesmas, principalmente no comprimento de onda a 3473 cm^{-1} , que correspondem a ligações O-H, indicando assim, uma

possível participação destes grupos na redução dos íons Ag(I) e conseqüente formação de Ag-NPs [103, 104].

Relativamente às membranas contendo Ag-NPs revestidas com poloxamer 407, verifica-se o desaparecimento do pico de absorção de radiação infravermelha no comprimento de onda a 1160 cm^{-1} , referente ao estiramento assimétrico C–O–C. Corroborando assim a interação das Ag-NPs com os átomos de oxigênio. É ainda possível verificar-se a redução da intensidade das bandas características no comprimento de onda a 1662 cm^{-1} , sendo este um possível resultado de dissociação do grupo carbonilo, dando assim origem à formação de água [11].

Em suma, embora não existam desvios nos picos dos espectros das membranas de AC contendo Ag-NPs em relação às membranas de AC, confirma-se o sucesso da incorporação das Ag-NPs na matriz de AC, através da visualização de bandas de absorção na Figura 15 e Figura 16 (Espectroscopia UV-Vis), correspondente à banda de absorção típica das Ag-NPs.

1.1.5. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica apresentada na Figura 21 e na Figura 22 foi efetuada através de aquecimento linear das membranas desenvolvidas neste trabalho com concentrações de 1.0 mM de AgNO₃/P407, numa proporção 1:1 (v/m), a diferentes concentrações de AC (2 wt. % e 4 wt. %), de forma a ser possível constatar a perda da massa das mesmas, em função da temperatura. É ainda apresentado a derivada da curva de variação da massa com a temperatura (curvas a tracejado).

A análise destes termogramas permite verificar que as mínimas perdas de massa ocorrem no intervalo de temperatura entre os 30 e os 100 °C, que pode estar relacionada com a evaporação da água fisicamente adsorvida à superfície das membranas, ou pode resultar da eliminação de moléculas residuais de baixo peso molecular existentes nas membranas [105].

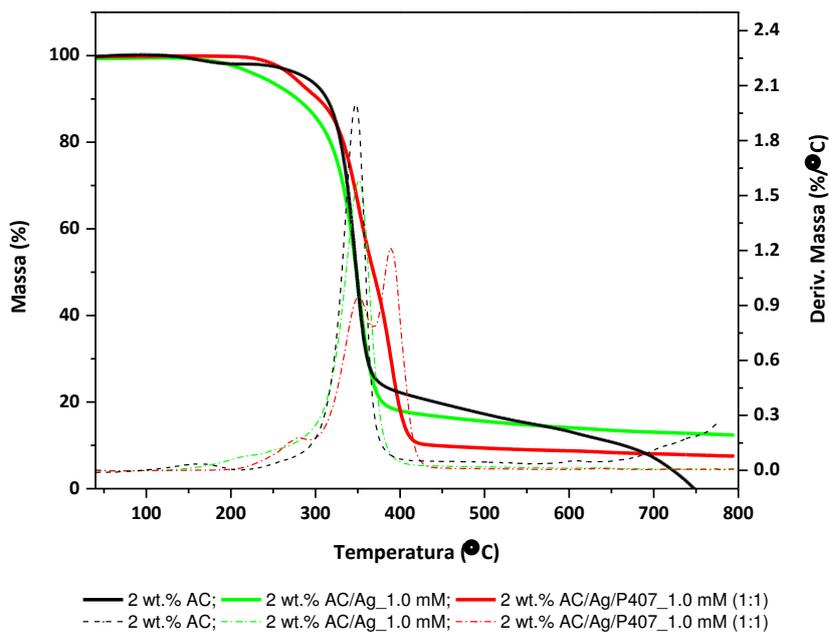


Figura 21 – Curvas de TGA em aquecimento linear (10 °C/min) no intervalo 30-800 °C para membranas contendo 2 wt. % AC.

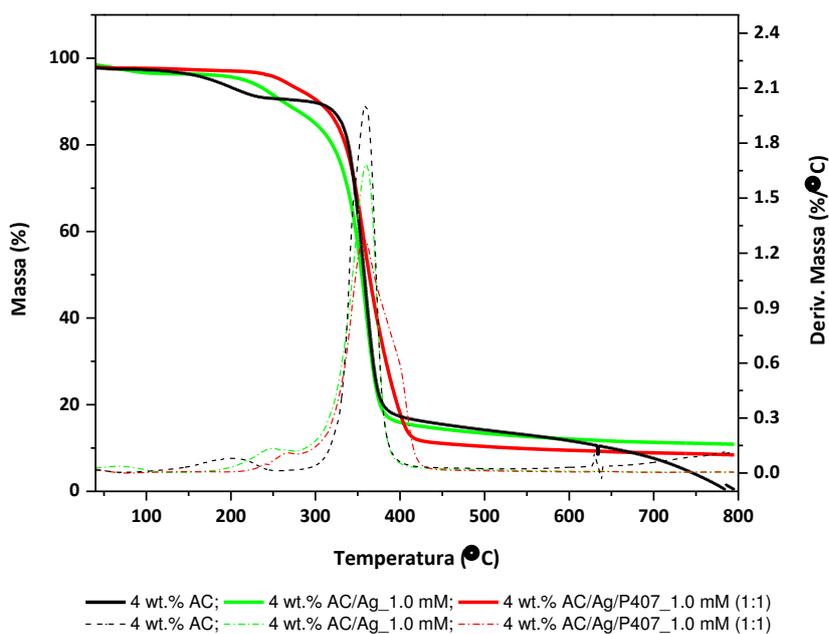


Figura 22 – Curvas de TGA em aquecimento linear (10 °C/min) no intervalo 30-800 °C para membranas contendo 4 wt. % AC.

Na Figura 21 e Figura 22, verifica-se que todas as membranas analisadas apresentam pelo menos três processos de degradação. O primeiro processo ocorre no intervalo de temperaturas entre os 150 °C e os 330 °C associada à eliminação dos grupos acetilo presentes na estrutura do AC e, conseqüentemente o início da decomposição do anel piranose [106].

No intervalo de temperaturas entre os 330 °C e os 450 °C, a elevada perda de massa está associada à eliminação do ácido acético e óxidos de carbono formados devido à cisão das ligações glicosídicas do AC [107].

O último processo de degradação ocorre entre os 450 °C e os 800 °C e corresponde à carbonização dos produtos em cinza [100, 106].

Comparando os perfis das curvas de TGA obtidas, verifica-se que as membranas de AC contendo Ag-NPs com e sem a presença do poloxamer 407 apresentam um perfil similar ao do AC, contudo, alguns desvios no intervalo de temperatura entre os 150 °C e os 450 °C são observados.

Tabela 11 – Estabilidade térmica e degradação das amostras obtidas a partir das curvas de TGA.

Membrana	T _{in} (°C)	T _{max} (°C)	Perda de massa a diferentes temperaturas (%)		
			150-330 °C	330-450 °C	800 °C
2 wt. % AC	185.2	347.9	6.02	78.8	100.0
2 wt. % AC/Ag_1.0 mM	215.7	351.7	7.60	64.9	89.1
2 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	280.2	389.5	11.83	55.0	93.0
4 wt. % AC	215.7	358.6	7.68	87.2	100.0
4 wt. % AC/Ag_1.0 mM	249.5	360.9	9.94	76.0	87.6
4 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	264.8	359.5	8.89	66.6	91.6

T_{in}: Temperatura inicial de degradação

T_{max}: Temperatura máxima de degradação

De acordo com a Tabela 11, a percentagem de residuo sólido obtida após esta análise térmica aumenta com a incorporação das Ag-NPs na matriz de AC.

A membrana de 4 wt. % de AC contendo Ag-NPs é a que apresenta menor perda de massa.

A incorporação de Ag-NPs retarda tenuemente o processo de degradação inicial, assim como a temperatura de degradação máxima, influenciando assim a estabilidade térmica das membranas de nanocompósitos.

Conforme se pode ver em ambas as figuras, assim como na Tabela 11, a incorporação das Ag-NPs na matriz de AC aumenta a estabilidade térmica das membranas de AC. Esta melhoria na estabilidade térmica das membranas contendo Ag-NPs pode ser atribuída à reduzida mobilidade

das cadeias de AC no nanocompósito devido à atração dos íons de Ag(I) em relação aos grupos hidroxilo do polímero por forças eletrostáticas [100].

1.1.6. Análise dinâmica mecânica

O DMA é uma análise térmica e mecânica que permite o estudo do comportamento viscoelástico dos polímeros. Com esta técnica é possível determinar algumas propriedades do material, tais como o módulo mecânico dinâmico (E) e o fator de amortecimento ($\tan \delta$), que indica as perdas de energia que ocorrem na amostra.

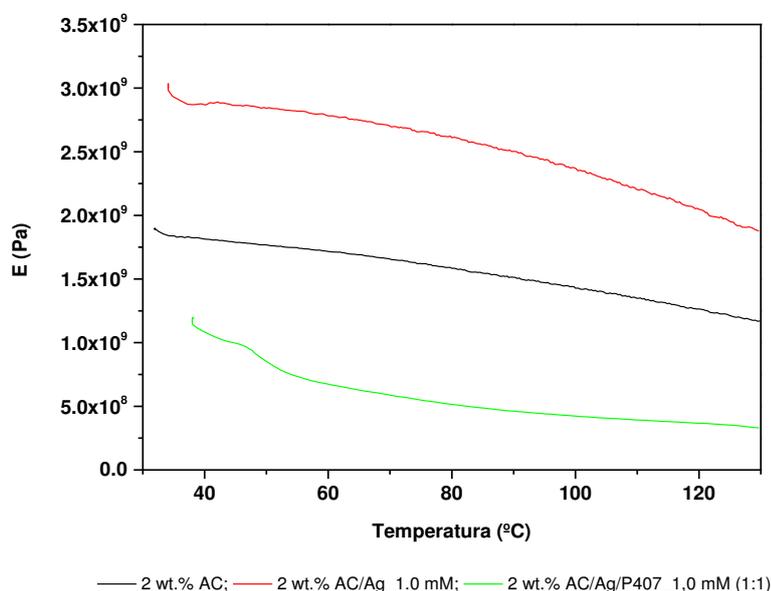


Figura 23 – Gráfico do módulo em função da temperatura para as membranas de nanocompósitos de 2 wt. % de AC.

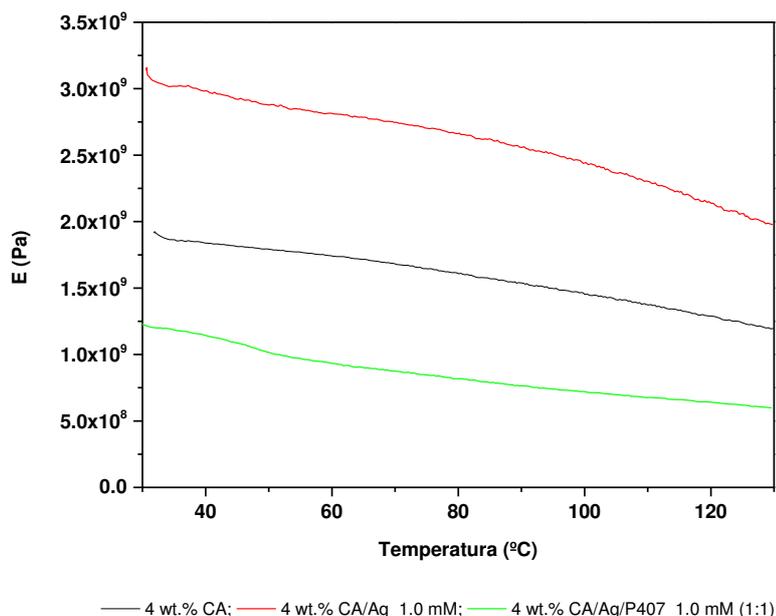


Figura 24 – Gráfico do módulo em função da temperatura para as membranas de nanocompósitos de 4 wt. % de AC.

Na Figura 23 e Figura 24, verifica-se uma diminuição do módulo logo desde o início do ensaio, sendo este facto verificado em todas as amostras. Verifica-se também que as membranas contendo Ag-NPs são os materiais que apresentam um valor do módulo mais elevado, cerca de 3 GPa para as membranas de 2 wt. % de AC contendo Ag-NPs, e 3.15 GPa para as membranas de 4 wt. % de AC contendo Ag-NPs. O que permite afirmar que as Ag-NPs têm um efeito sobre o valor do módulo, isto é, a incorporação de Ag-NPs tende a melhorar o comportamento mecânico do polímero, devido à substituição parcial do polímero por nanopartículas na matriz da membrana [108].

Tabela 12 – Comparação dos valores do módulo obtidos nos ensaios de DMA.

Membranas	Módulo (GPa)
2 wt. % AC	1.89
2 wt. % AC/Ag_1.0 mM	3.00
2 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	1.22
4 wt. % AC	1.92
4 wt. % AC/Ag_1.0 mM	3.15
4 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	1.84

Comparando os valores obtidos para as diferentes membranas com diferentes concentrações de AC (Tabela 12), verifica-se que as membranas incorporadas com maiores

tamanhos e distribuição de tamanhos de Ag-NPs, como o caso das membranas de 2 wt. % de AC contendo Ag-NPs, apresentam um módulo inferior, em comparação com as membranas que contêm Ag-NPs com tamanhos menores, como o caso das membranas de 4 wt. % de AC contendo Ag-NPs. Este efeito deve-se ao facto de as Ag-NPs, com tamanhos e distribuição de tamanhos menores, possuírem uma maior área superficial, formando uma interface mais forte com a matriz de polímero, aumentando assim a rigidez do nanocompósito [109]. Moura *et al.* [108] observaram para nanocompósitos de HPMC (hidroxipropil metilcelulose) contendo Ag-NPs com diferentes tamanhos (41 e 100 nm), um aumento das propriedades mecânicas para nanocompósitos contendo Ag-NPs de menores tamanhos.

Após a incorporação do poloxamer 407, verifica-se uma diminuição significativa nos valores do módulo, devido à aglomeração observada das Ag-NPs estabilizadas com P407 e dispersão não uniforme das mesmas na matriz polimérica, levando assim, à diminuição da elasticidade da membrana e conseqüentemente à diminuição da estabilidade mecânica [17]. Desta forma, pode-se dizer que o comportamento mecânico das membranas depende da dispersão das Ag-NPs na matriz de AC, assim como da presença de aglomerados. Logo, quanto melhor a dispersão das Ag-NPs e a sua interação, melhor deverá ser a resposta mecânica do material.

A $\tan \delta$ resulta da diferença entre a quantidade de energia dissipada por mecanismos viscosos relativos à energia armazenada na componente elástica fornecendo informações sobre as propriedades de amortecimento das membranas [109].

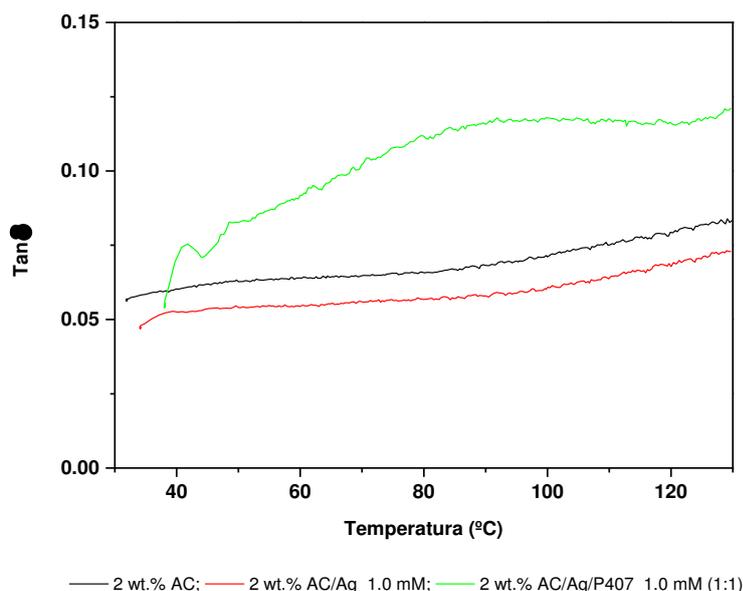


Figura 25 – Gráfico da $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas de nanocompósitos de 2 wt. % de AC.

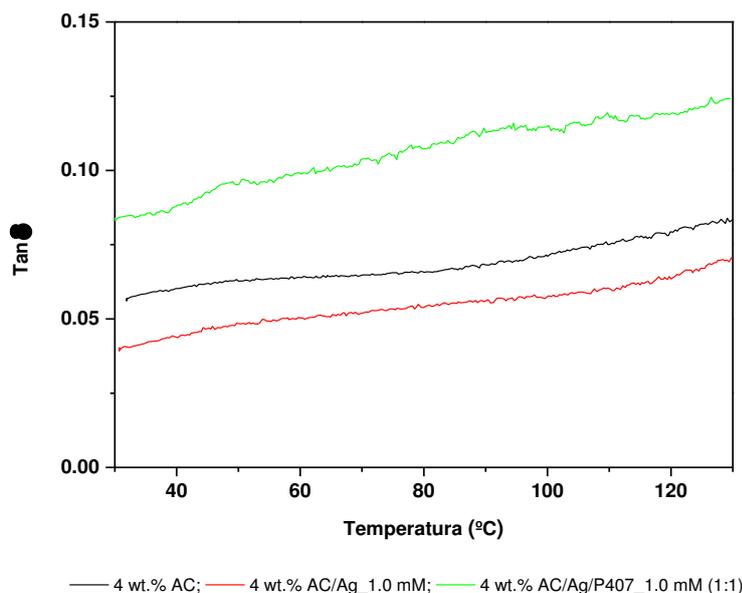


Figura 26 – Gráfico da $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas de nanocompósitos de 4 wt. % de AC.

Na Figura 25 e Figura 26, verifica-se um aumento da $\tan \delta$ logo desde o início do ensaio, sendo esta tendência verificada em todas as amostras. Este aumento da $\tan \delta$ com o aumento da temperatura indica que as membranas obtidas tornaram-se mais viscosas e menos elásticas [109]. Verifica-se também que as membranas contendo Ag-NPs estabilizadas com poloxamer 407 são os materiais que apresentam uma maior capacidade de dissipação de energia, pois apresentam maiores valores de $\tan \delta$, o que conduziram a um decréscimo no valor do módulo.

1.1.7. Microscopia eletrônica de varrimento

A interação entre o feixe de elétrons com a superfície da amostra resulta na emissão de elétrons secundários, elétrons retrodifundidos e os raios-X característicos. Os elétrons secundários, pouco energéticos têm origem nas camadas mais superficiais da amostra, e como tal fornecem a informação sobre a topografia da superfície. Por outro lado, os elétrons retrodifundidos são mais energéticos e facultam a informação do contraste que se relaciona qualitativamente com composição química da amostra [90, 92]. Relativamente aos raios-X emitidos pela amostra, estes, por sua vez permitem identificar e quantificar os elementos presentes na amostra [90].

A análise de SEM foi realizada com o intuito de averiguar a morfologia das membranas obtidas contendo Ag-NPs com e sem a presença do poloxamer 407.

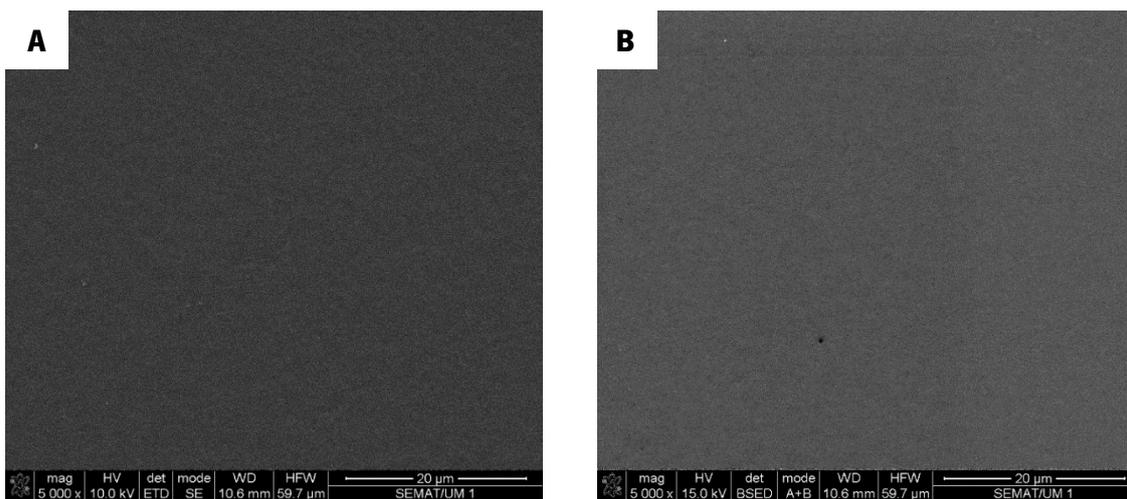


Figura 27 – SEM da superfície da membrana de 2 wt. % de AC com uma focagem de 20 μm : **(A)** imagem dada pelos eletrões secundários **(B)** imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.

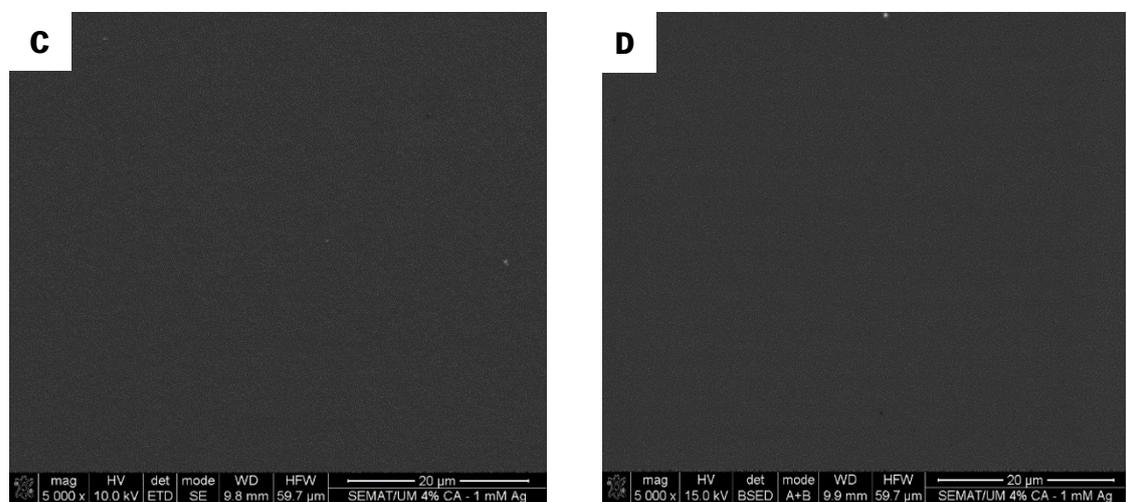


Figura 28 – SEM da superfície da membrana de 4 wt. % de AC com uma focagem de 20 μm : **(C)** imagem dada pelos eletrões secundários **(D)** imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.

A Figura 27 e a Figura 28 apresentam a morfologia da superfície da membrana de AC a diferentes concentrações de polímero (2 wt. % e 4 wt. %).

Como se pode observar em ambas as figuras, a superfície da membrana de AC com diferentes concentrações de substrato celulósico, são visualmente similares, verificando-se uma superfície suave da matriz.

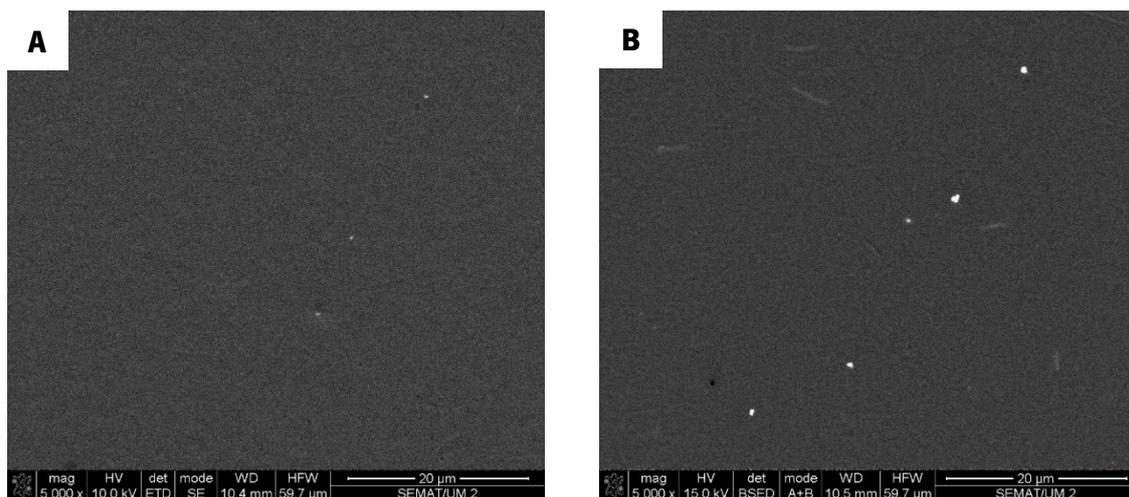


Figura 29 – SEM da superfície da membrana de 2 wt. % AC/Ag_{1.0} mM com uma focagem de 20 μm: **(A)** imagem dada pelos elétrons secundários **(B)** imagem dada pelos elétrons retrodifundidos.

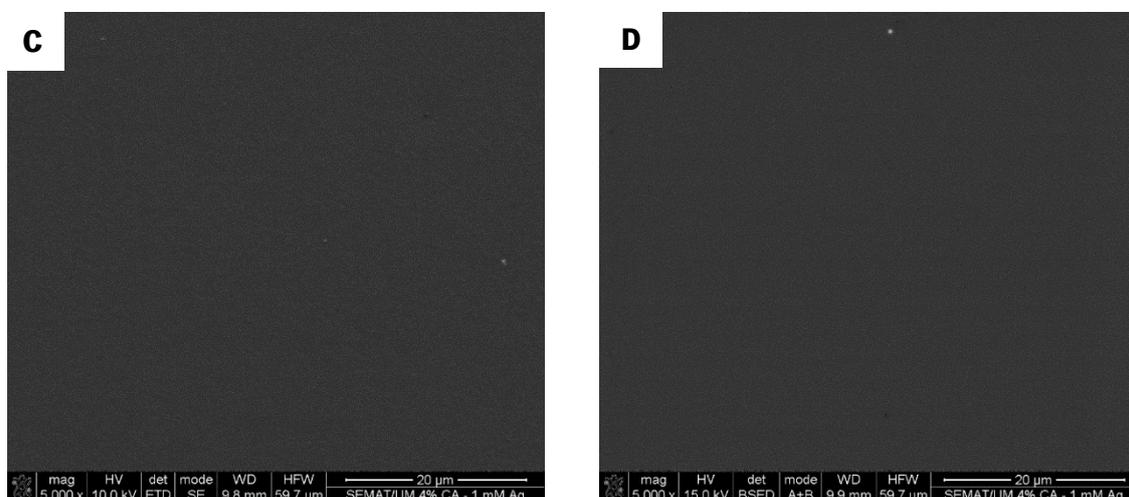


Figura 30 – SEM da superfície da membrana de 4 wt. % AC/Ag_{1.0} mM com uma focagem de 20 μm: **(C)** imagem dada pelos elétrons secundários **(D)** imagem dada pelos elétrons retrodifundidos.

Na Figura 29 verifica-se a presença das Ag-NPs com uma morfologia esférica, sendo esta observação mais perceptível na análise de SEM efetuada em retrodifusão **(B)**, onde as Ag-NPs se encontram representadas por uma cor clara. Com uma focagem de 20 μm, é possível observar-se a formação de aglomerados de Ag-NPs no substrato celulósico, assim como uma distribuição heterogénea das mesmas na matriz de AC, uma vez que se verifica a formação de aglomerados de Ag-NPs apenas em determinadas áreas da matriz polimérica. Estas observações efetuadas através de SEM confirmaram assim, os resultados da caracterização ótica destas membranas de nanocompósitos, ou seja, devido à formação de aglomerados de Ag-NPs, ocorre um alargamento da banda de absorção para maiores comprimentos de onda. Assim como, os resultados obtidos por DLS, em que a formação de Ag-NPs com tamanhos maiores é verificada, uma vez que os diâmetros médios hidrodinâmicos medidos das nanopartículas são superiores a 100 nm,

denotando-se assim uma formação de aglomerados. Em relação à Figura 30, nenhuma diferença é verificada quando comparada com a Figura 28, este facto deve-se ao tamanho bastante reduzido das Ag-NPs, não sendo assim visíveis a sua formação com uma focagem de 20 μm . Isto significa que os tamanhos e distribuição de tamanhos de Ag-NPs podem ser controlados através do ajuste da concentração de AC, uma vez que para concentrações maiores de AC verificam-se tamanhos menores de Ag-NPs.

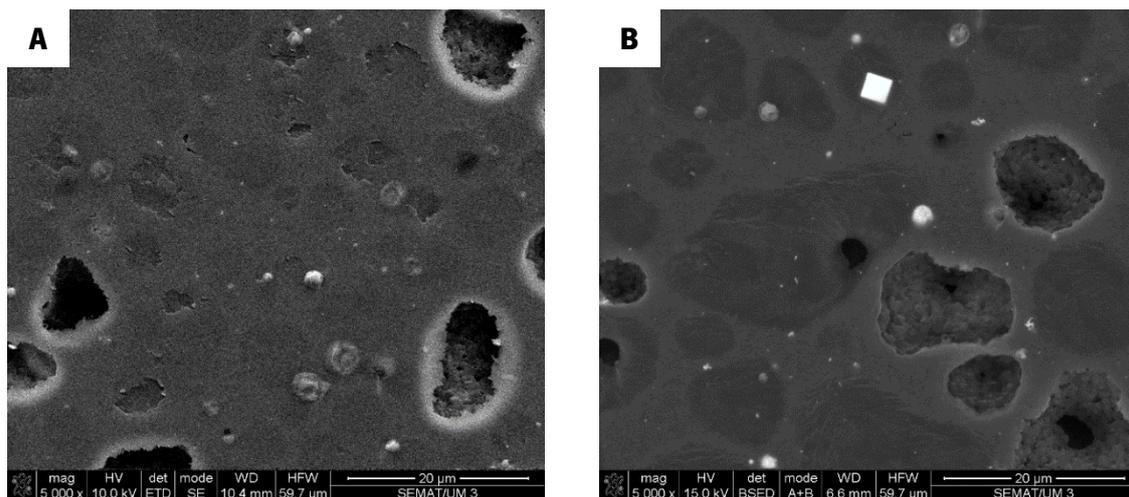


Figura 31 – SEM da superfície da membrana de 2 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1) com uma focagem de 20 μm : **(A)** imagem dada pelos eletrões secundários **(B)** imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.

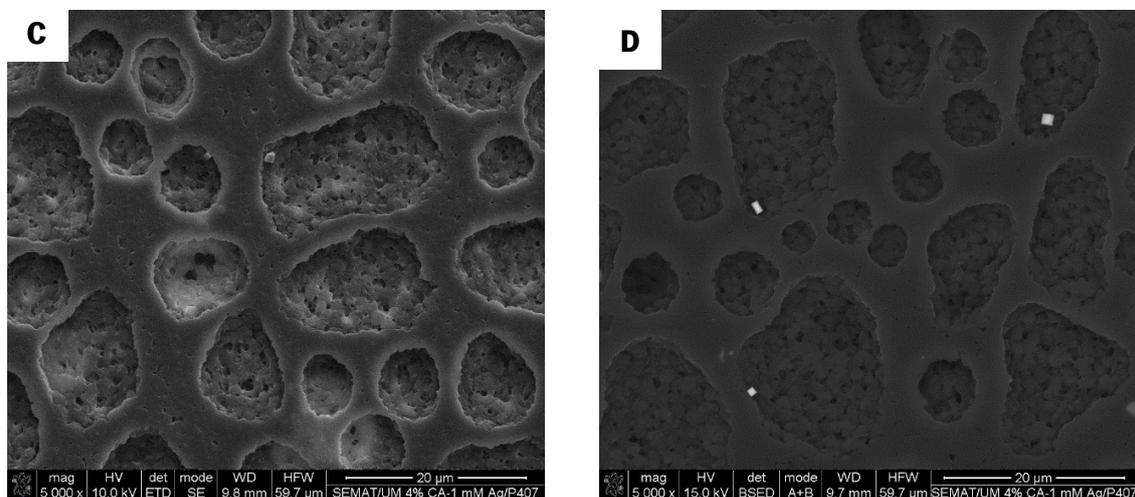


Figura 32 – SEM da superfície da membrana de 4 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1) com uma focagem de 20 μm : **(C)** imagem dada pelos eletrões secundários **(D)** imagem dada pelos eletrões retrodifundidos.

Com a incorporação do surfactante, poloxamer 407, as membranas de nanocompósitos apresentam uma morfologia diferente em relação à observada nas figuras anteriores. Torna-se visível a alteração/modificação da morfologia do AC, devido à presença do P407 que induz a formação de cavidades de elevadas dimensões na matriz polimérica. Por observação da Figura 31

e Figura 32, com uma focagem de 20 μm , é ainda possível verificar-se a presença do material inorgânico incorporado, as Ag-NPs. Estas nanopartículas encontram-se representadas numa cor mais clara e com um tamanho superior aos observados na Figura 29 e Figura 30. Neste caso, além das Ag-NPs esféricas mais aglomeradas, observam-se partículas com morfologias distintas, nomeadamente com formato quadrado. Posto isto, é ainda possível verificar-se, no caso da Figura 32, que as Ag-NPs localizam-se na superfície interna das cavidades da matriz de AC, que atuam como depósitos favorecendo assim, a acomodação das Ag-NPs no interior da estrutura [110]. Esta observação pode ser, possivelmente atribuída à atração dos iões Ag(I) em relação aos grupos hidroxilo do acetato de celulose devido a forças eletrostáticas.

Na Tabela 13 apresentam-se os resultados obtidos por microscopia eletrónica de varrimento com microanálise de raio-X (SEM/EDS), referentes à análise de SEM (Figura 31 e 32) efetuada em retrodifusão (**B** e **D**). Contudo, é necessário ter em consideração que os resultados de espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS) não são representativos de toda a amostra, uma vez que o feixe de eletrões incide apenas num ponto específico da mesma.

Tabela 13 – Análise química elementar obtida por EDS das membranas contendo Ag-NPs revestidas com poloxamer 407.

Elemento Químico	AC-Ag (percentagem atómica, %)	
	2 wt. % AC/Ag/P407 1.0 mM (1:1)	4 wt. % AC/Ag/P407 1.0 mM (1:1)
Oxigénio	14.25	12.96
Carbono	73.66	82.09
Prata	12.09	4.94
Total	100.00	100.00

Por observação da Tabela 13, é possível verificar-se que os pontos claros observados nas imagens de SEM, consistem em Ag-NPs, uma vez que a incidência do feixe de eletrões sobre esses pontos, revelou a presença de Ag na superfície da matriz de AC em ambas as membranas. É ainda possível observar-se uma maior concentração de Ag-NPs na membrana 2 wt. % AC contendo Ag-NPs estabilizadas com poloxamer 407.

A quantificação dos espectros obtidos por EDS apresenta valores de 12.09 % e 4.94 % de Ag para as membranas com 2 wt. % e 4 wt. % de AC contendo Ag-NPs estabilizadas com poloxamer 407, respetivamente.

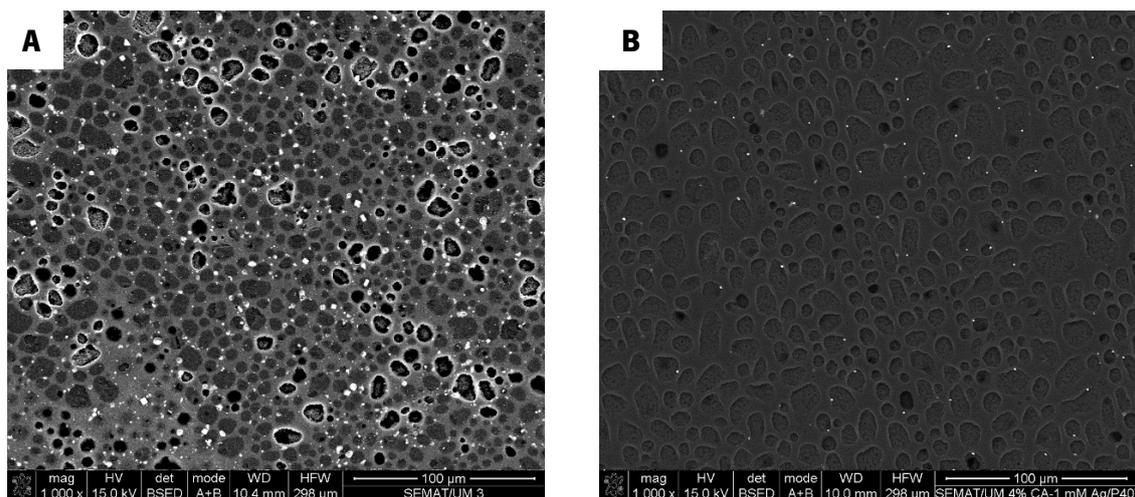


Figura 33 – SEM da superfície da membrana **(A)** 2 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1) com uma focagem de 100 µm **(B)** 4 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1) com uma focagem de 100 µm.

Na Figura 33, encontra-se representada a morfologia da superfície das membranas de AC contendo Ag-NPs/P407 com diferentes concentrações de acetato de celulose, 2 wt. % e 4 wt. % de AC, com uma focagem de 100 µm. Nestas imagens, é possível a observação de zonas com boa dispersão **(B)**, verificada através dos pontos brancos visíveis referentes às Ag-NPs. Observam-se também áreas com Ag-NPs mais aglomeradas e com uma dispersão aleatória e irregular, sendo estas mais perceptíveis na imagem **(A)**, onde a concentração de AC é menor. Como referido anteriormente, com a incorporação do poloxamer 407, verifica-se a formação de cavidades de grandes dimensões na matriz de AC, o que segundo Vimala *et al.* [111] significa uma melhor atividade antibacteriana, uma vez que uma estrutura porosa absorve uma maior quantidade de água e, por consequência liberta uma maior quantidade de iões Ag(I) no meio circundante, contribuindo assim para uma atividade antibacteriana superior.

1.1.8. Atividade antibacteriana

Foram realizados estudos da atividade antibacteriana das membranas de AC contendo Ag-NPs com e sem a presença do poloxamer 407, de modo a analisar o efeito do substrato celulósico usado e do surfactante na formulação da membrana relativamente à atividade antibacteriana.

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos para a atividade antibacteriana das membranas preparadas em relação a duas colónias de bactérias a 22 °C e 37 °C, sendo a suspensão líquida de bactérias com e sem a incorporação das membranas de AC, as amostras de controlo.

Tabela 14 – Resultados da atividade antibacteriana das membranas de nanocompósitos de Ag-NPs com e sem a presença de P407.

Parâmetro		N.º de colónias a 22 °C (CFU.mL⁻¹)	N.º de colónias a 37 °C (CFU.mL⁻¹)
Suspensão líquida bacteriana		> 300	247
Membranas	4 wt. % AC	> 300	> 300
	4 wt. % AC/Ag_1.0 mM	0	0
	4 wt. % AC/Ag/P407_1.0 mM (1:1)	0	0

Como evidenciado na Tabela 14, a atividade antibacteriana das membranas em relação ao número de colónias de bactérias estudadas a 22 °C e a 37 °C depende bastante da presença de Ag-NPs nas mesmas, uma vez que as amostras de controlo não apresentaram atividade antibacteriana.

As membranas selecionadas para analisar as suas propriedades antibacterianas, foram as membranas de 4 wt. % de AC reforçadas com 1.0 mM de AgNO₃ com e sem a presença do poloxamer 407, numa proporção 1:1 (AgNO₃/P407). Esta escolha foi efetuada, tendo em conta os resultados obtidos na caracterização realizada ao longo deste trabalho de investigação, dando-se especial ênfase aos tamanhos e distribuição de tamanhos, assim como PDI e carácter hidrofílico das Ag-NPs obtidas, desempenhando um papel importante na escolha das membranas para análise da atividade antibacteriana. As Ag-NPs de menores dimensões têm uma maior área superficial, o que significa que possuem uma maior quantidade de iões de Ag(I) em contacto com a solução. Logo, tendo em conta o facto de que os iões de Ag(I) são os que conferem as propriedades antibacterianas numa determinada membrana contendo Ag-NPs, faz sentido que menores tamanhos e distribuições de tamanhos das Ag-NPs proporcionem uma maior eficiência antibacteriana em relação a Ag-NPs com tamanhos e distribuição de tamanhos maiores. Daí a seleção de membranas com tamanhos e distribuição de tamanhos de Ag-NPs menores.

De acordo com a Tabela 14, verifica-se que as membranas de AC contendo Ag-NPs com e sem a presença de poloxamer 407, apresentam uma eficácia de 100 %, exibindo uma eliminação total das bactérias contidas na suspensão líquida. No entanto, devido ao efeito bactericida apresentado tanto pelas membranas de AC contendo Ag-NPs, com um diâmetro hidrodinâmico das Ag-NPs de 19.5 ± 4.4 nm, como pelas membranas de AC contendo Ag-NPs/P407, com um diâmetro hidrodinâmico das Ag-NPs 51.8 ± 11.9 nm, não foi possível verificar a influência que a variação de tamanhos de Ag-NPs tem na atividade antibacteriana. Esta forte atividade

antibacteriana das Ag-NPs era esperada e está associada à acumulação intracelular dos iões Ag(I) libertados em ambientes aquosos [112], que aderem à superfície das membranas celulares dos microrganismos perturbando drasticamente funções vitais como a respiração, a permeabilidade e a replicação [39].

Observando os resultados obtidos é notório que o objetivo em obter uma membrana antibacteriana foi atingido, uma vez que após 72 horas em contacto com uma suspensão líquida contendo bactérias, estas apresentam um efeito bactericida, revelando-se assim uma alternativa bastante interessante para o tratamento de águas contaminadas com bactérias.

1.2. Membranas de AC contendo Al-NPs e Ag-NPs

Todos os nanocompósitos sintetizados por deposição química *in situ* de Ag-NPs e Al-NPs numa matriz de AC, usando o isopropóxido de alumínio (Al(Pr-*i*O)₃) e o nitrato de prata (AgNO₃) como precursores metálicos, adquiriram a forma de membranas transparentes e bastante flexíveis.

Tabela 15 - Aspeto visual das membranas desenvolvidas contendo Ag-NPs e Al-NPs.

Membranas			
4 wt. % AC			
4 wt. % AC	4 wt. % AC/Al_1.0 mM	4 wt. % AC/Ag/Al_1.0 mM (1:1)	
			
	4 wt. % AC/Al_30 mM	4 wt. % AC/Ag/Al_1:30 mM (1:30)	
			

Na Tabela 15 verifica-se que a dispersão de Ag-NPs e Al-NPs na matriz de AC deu origem a membranas macroscopicamente homogéneas, notando-se uma leve coloração amarela nas

membranas contendo Ag-NPs, ao contrário do que acontece nas membranas contendo apenas Al-NPs, em que nenhuma cor é observada. Posto isto, verifica-se que essa coloração amarela, devido à redução do AgNO_3 com o borohidreto de sódio, é mais perceptível nas membranas contendo Ag-NPs e Al-NPs, numa proporção 1:1 ($\text{AgNO}_3/\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$) em volume, não se verificando o mesmo nas membranas contendo Ag-NPs e Al-NPs, numa proporção 1:30 ($\text{AgNO}_3/\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$) em volume. O facto de não ser visível essa coloração característica da presença de Ag-NPs nas membranas com uma maior concentração de $\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$, é provavelmente devido à maior concentração de isopropóxido de alumínio presente na membrana, e consequentemente maior reatividade apresentada por este precursor de alumínio.

Em ambos os casos, as membranas apresentam-se transparentes, sendo possível ver através das mesmas. A transparência e a flexibilidade exibidas por estas membranas apresentam-se, então, como características vantajosas, ampliando assim as possibilidades de aplicação das mesmas em dispositivos, onde estas características sejam necessárias.

1.2.2. Espectroscopia de Infravermelhos

A espectroscopia de infravermelhos foi realizada às membranas de AC contendo 1.0 mM de $\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$ com e sem a presença de 1.0 mM de AgNO_3 , com o objetivo de obter informação acerca da composição química das mesmas, e de uma certa forma, comprovar a formação de Al-NPs.

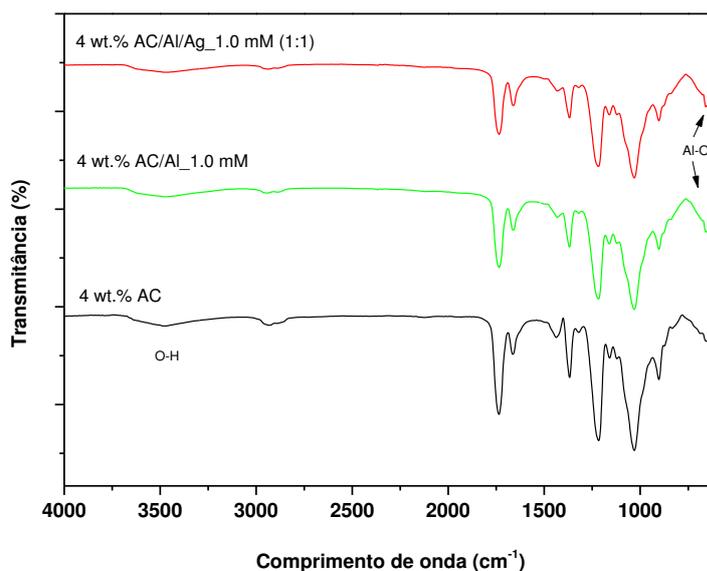


Figura 34 - Espectro de absorção FTIR-ATR das membranas de 4 wt. % AC contendo 1.0 mM de $\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$ e 1.0 mM de AgNO_3 .

Os espectros representados na Figura 34 exibem as bandas características do AC com e sem a incorporação de Ag-NPs e Al-NPs. Por comparação dos diferentes espectros obtidos, verifica-se que a formação de Al-NPs na membrana de AC é confirmada pelo aparecimento de novas bandas de absorção de luz infravermelha nos comprimentos de onda a 658 cm^{-1} e a 645 cm^{-1} , correspondente à presença da ligação Al-O na membrana [58], resultante da reação entre o acetato de celulose e o isopropóxido de alumínio.

Relativamente à formação de Ag-NPs nas membranas de AC contendo Al-NPs, não se verifica desvios ou alongamentos de picos, que possam comprovar a presença destas. No entanto confirma-se a incorporação das Ag-NPs na matriz de AC, através, não só, da visualização das imagens na Tabela 15 onde se verifica uma coloração leve amarela, indicativa da formação das mesmas, como também através do estudo da atividade antibacteriana, onde as Ag-NPs desempenham o papel principal (Tabela 16).

1.2.3. Atividade antibacteriana

Estudos da atividade antibacteriana das membranas de AC contendo Ag-NPs com e sem a presença de Al-NPs foram efetuados, de modo a investigar o efeito da incorporação das Al-NPs na formulação da membrana relativamente à atividade antibacteriana.

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para a atividade antibacteriana das membranas de nanocompósitos preparadas em relação a duas colónias de bactérias a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo a suspensão líquida de bactérias com e sem a incorporação das membranas de AC, as amostras de controlo.

Tabela 16 – Resultados da atividade antibacteriana das membranas de nanocompósitos de Ag-NPs com e sem a presença de Al-NPs.

Parâmetro		N.º de colónias a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$	N.º de colónias a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
		(CFU.mL ⁻¹)	(CFU.mL ⁻¹)
Suspensão líquida bacteriana		> 300	247
Membranas	4 wt. % AC	> 300	> 300
	4 wt. % AC/Ag_1.0 mM	0	0
	4 wt. % AC/Ag/Al_1.0 mM (1:1)	3	0

Verifica-se que, para ambas as situações estudadas, as amostras de controlo não apresentam atividade antibacteriana. Sendo o valor da concentração da suspensão líquida de bactérias em contacto com a membrana de AC praticamente idêntico à da suspensão líquida de bactérias sem a presença de membranas.

No caso da membrana de AC contendo Ag-NPs/Al-NPs, verifica-se que a eficácia da mesma não é de 100 % na eliminação total das bactérias a 22 °C, o que acontece no caso da membrana de AC contendo apenas Ag-NPs. No entanto, apesar de se detetarem bactérias vivas após 72 horas em contacto com a suspensão líquida de bactérias, o seu efeito bactericida é bastante notório, uma vez que se verifica uma redução de bactérias bastante acentuada (eficácia de 98 %).

Pode-se assim dizer que a presença de Ag-NPs nas membranas é o parâmetro com maior influência no estudo da atividade antibacteriana, tendo-se assim verificado o efeito bactericida, ou seja, a redução/eliminação das bactérias nas suspensões líquidas de bactérias em contacto com as membranas de AC contendo Ag-NPs e/ou Al-NPs.

1.2.4. Estudos de remoção de fósforo

A presente secção deste trabalho tem como finalidade estudar a cinética de adsorção de fósforo nas membranas contendo Al-NPs com e sem a presença de Ag-NPs na sua constituição química. Este estudo da cinética é um fator importante, pois permite prever a velocidade de remoção de fósforo num intervalo de tempo. Posto isto, foram efetuados ensaios de adsorção, utilizando para o efeito soluções de concentração inicial de fósforo (P) de 1.0 mg/L, às quais foi adicionada uma quantidade fixa de membrana (0.25 g/ 25 mL (m/v)).

Uma análise das curvas de cinética de remoção de fósforo em termos da influência da concentração de $Al(Pr-iO)_3$ na matriz de AC com e sem a presença de Ag-NPs encontra-se na Figura 35.

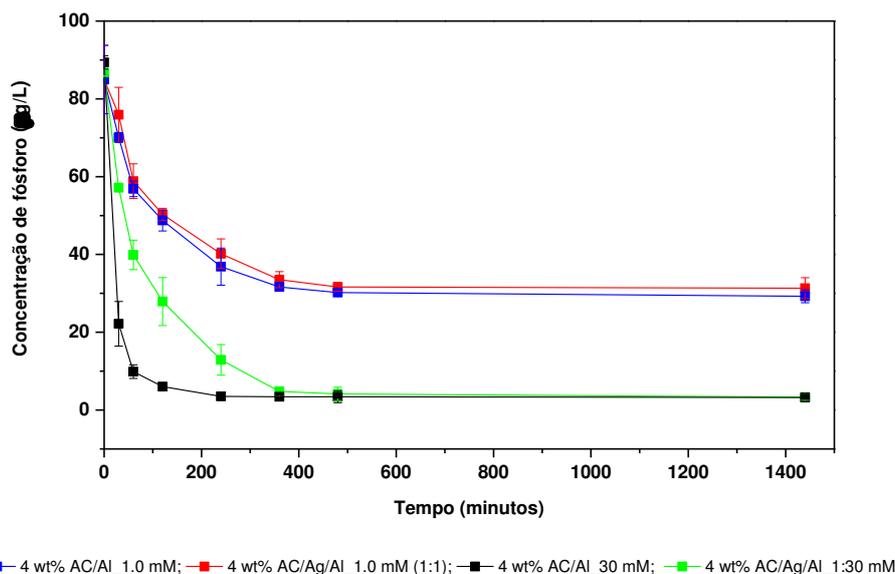


Figura 35 – Concentração de fósforo ao longo de 24 horas em contacto com as membranas de AC/Al e AC/Ag/Al.

Na Figura 35 é possível observar uma remoção da concentração de fósforo mais acentuada para as membranas com uma concentração de 30 mM de $Al(Pr-iO)_3$, ao fim de 24 horas, do que as observadas para as membranas com 1.0 mM de $Al(Pr-iO)_3$. Este aumento da capacidade de remoção de fósforo era esperado, uma vez que existe uma maior concentração de Al-NPs nestas membranas. Também quando comparados com as membranas contendo Ag-NPs resultados similares são obtidos, ao fim de 24 horas, o que significa que as Ag-NPs presentes nas membranas não influenciam a remoção de fósforo.

Por fim, observando os resultados obtidos é notório que o objetivo de obter uma membrana capaz de remover, não só as bactérias mas também o ião fosfato foi atingido, uma vez que as membranas de AC analisadas contendo Al-NPs e Ag-NPs apresentam uma capacidade de redução de concentrações de fósforo para valores inferiores a 35 µg/L (Tabela 18). Esta capacidade de redução de concentrações de fósforo é um fator muito importante, uma vez que o excesso de fósforo promove o crescimento excessivo das algas, resultando em problemas estéticos, mau odor, cor, sabor [58], assim como a diminuição do oxigénio disponível nos meios aquáticos, provocando a morte, e consequentemente decomposição de muitos organismos [113]. Walker *et al.* [114] determinaram que a concentração mínima de fósforo necessária para que ocorra o crescimento excessivo das algas no Lago *Okeechobee*, seria de 35 µg/L, sendo o máximo risco observado a 60 µg/L. Posto isto, pode-se concluir que as membranas obtidas neste trabalho são capazes de reduzir as concentrações de fósforo para valores inferiores a 35 µg/L, revelando-se assim como uma boa alternativa para a remediação de águas contaminadas com o ião fosfato.

Tabela 17 - Concentração de fósforo final após 24 horas em contacto com uma solução de P de 1.0 mg/L.

Concentração de fósforo após 24h		
Parâmetro	Incorporação	
	1.0 mM Al(Pr-<i>i</i>O)₃	30 mM Al(Pr-<i>i</i>O)₃
Membranas de 4 wt. % de AC contendo 1.0 mM de AgNO ₃	31.3 ± 2.7 µg/L	3.3 ± 0.8 µg/L

Capítulo V – Conclusões

O presente trabalho centrou-se no desenvolvimento e caracterização de uma membrana biopolimérica, acetato de celulose, contendo Ag-NPs e Al-NPs, para a remediação de meios aquáticos contaminados com microrganismos, podendo ainda ser utilizado para a remoção de águas contaminadas com o ião fosfato. Neste estudo foi avaliada a influência de diferentes concentrações de nanopartículas metálicas, assim como diferentes concentrações de acetato de celulose, e ainda o efeito da estabilização das Ag-NPs através da incorporação do P407.

As membranas de AC contendo Ag-NPs foram sintetizadas *in situ* por redução química do nitrato de prata (AgNO_3) com o agente redutor, borohidreto de sódio (NaBH_4) dispersas em DMF, com e sem a incorporação de poloxamer 407, por evaporação do solvente.

Num primeiro ponto, pode-se concluir que características como o tamanho, aglomeração e concentração de carga inorgânico, assim como a concentração de substrato celulósico revelaram-se relevantes no desenvolvimento de membranas de nanocompósitos poliméricos.

No que respeita à incorporação de Ag-NPs na matriz de AC, a sua ligação foi confirmada não só pela cor amarelada apresentada pelas membranas de nanocompósitos, mas também pelas imagens de SEM. Os resultados obtidos por DLS comprovaram que a solução coloidal contendo maiores concentrações de AC (4 wt. %), assim como uma maior concentração de AgNO_3 (1.0 mM), foi a que se apresentou mais monodispersa, ou seja, com uma menor taxa de aglomeração das Ag-NPs.

No que concerne à influência de diferentes concentrações de acetato de celulose, nas membranas de nanocompósitos com 4 wt. % de AC pode-se concluir que se obtêm Ag-NPs com menores tamanhos e distribuição de tamanhos, sendo este um dos principais objetivos desta dissertação, uma vez que as Ag-NPs de menores dimensões têm uma maior área superficial, o que por sua vez confere uma maior eficiência antibacteriana à membrana. As membranas de nanocompósitos desenvolvidas contendo Ag-NPs na sua formulação química apresentaram um efeito bactericida inibindo o crescimento de colónias de bactérias a 22 °C e 37 °C.

Adicionalmente, resultados experimentais resultantes da análise por DMA em modo de flexão indicaram que a incorporação de Ag-NPs tende a melhorar o comportamento mecânico da membrana biopolimérica, denotando-se uma melhoria bastante significativa na estabilidade mecânica da membrana de AC contendo Ag-NPs, para maiores concentrações de AC (4 wt. %).

Os resultados obtidos da análise por TGA comprovaram que a incorporação de Ag-NPs na matriz de AC retarda a temperatura de degradação máxima, aumentando assim, a estabilidade

térmica das membranas de AC. A menor perda de massa foi observada para a membrana de 4 wt. % de AC contendo 1.0 mM de AgNO_3 , cerca de 87.62 %.

Relativamente à incorporação de P407 na matriz de AC contendo Ag-NPs, registaram-se claras diferenças no carácter hidrofílico das membranas de AC, isto é, o surfactante P407 introduziu modificações superficiais na matriz de AC tornando-a mais hidrofílica. As imagens de SEM destas membranas permitiram confirmar a alteração da morfologia do AC, devido à presença do P407 que induziu a formação de cavidades de elevadas dimensões na matriz polimérica, o que contribuiu para uma boa atividade antibacteriana.

Membranas de AC contendo Ag-NPs e Al-NPs, sintetizadas *in situ* usando um precursor à base de alumínio, o isopropóxido de alumínio ($\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$) numa solução de AC contendo Ag-NPs, foram obtidas. A presença das Al-NPs na membrana de AC, foi confirmada pelo aparecimento de novas bandas de absorção de luz infravermelha nos comprimentos de onda a 658 cm^{-1} e a 645 cm^{-1} , correspondente à presença da ligação Al-O na membrana. Por outro lado, membrana de AC contendo Al-NPs e Ag-NPs, foi confirmada não só pela cor leve amarela apresentada pelas membranas de nanocompósitos mas também pela inibição bactericida de duas colónias de bactérias a $22\text{ }^\circ\text{C}$ e $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Estudos cinéticos de adsorção de fósforo nas membranas contendo Al-NPs demonstraram que a presença de Al-NPs apresenta uma capacidade de redução de concentração de fósforo para valores inferiores a $35\text{ }\mu\text{g/L}$. Este valor é considerado como a concentração mínima de fósforo necessária para que ocorra o crescimento excessivo das algas, resultando na diminuição do oxigénio disponível nos meios aquáticos. Em relação ao valor da capacidade de remoção de fósforo pelas membranas contendo Al-NPs, verificou-se que esta grandeza se altera com a incorporação de $\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$, observando-se uma melhor performance para as membranas de nanocompósitos contendo uma maior concentração de $\text{Al}(\text{Pr-}i\text{O})_3$.

Em suma, a combinação de diferentes nanopartículas metálicas, Ag-NPs e Al-NPs, permitiu obter membranas de nanocompósitos com dupla funcionalidade e bastante promissoras para diversas aplicações, nomeadamente no tratamento e remediação de meios aquáticos, onde a atividade antibacteriana e a capacidade de remoção de fósforo são cruciais para uma melhoria da qualidade da água. Posto isto, conclui-se que as membranas de nanocompósitos desenvolvidas neste trabalho poderão ser uma alternativa eficaz e de menor custo em relação a algumas opções convencionais para a remoção de contaminantes da água. Estas poderão ser aplicadas *in situ* no

leito do meio aquático sob a forma de membrana, no qual a água contaminada com bactérias e/ou íon fosfato, serão inibidas/removidas na superfície do material, respetivamente.

Propostas de trabalho futuro

Atendendo aos resultados obtidos e conclusões efetuadas nesta dissertação, sugerem-se algumas propostas de trabalho futuro, de modo a dar continuidade ao presente trabalho.

- Desenvolver nanocompósitos com níveis de incorporação de poloxamer 407 superiores a 1.0 mM, de modo a evitar a coalescência das Ag-NPs.
- Investigar a atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.
- Estudar a influência do pH na eficiência de remoção do fósforo pelas respetivas membranas.
- Transpor e avaliar os resultados obtidos à escala laboratorial para um sistema à escala real.
- Determinar a quantidade de íões Ag(I) libertados em ambientes aquosos.
- Determinar o papel ativo dos terminais redutores do acetato de celulose na formação das Ag-NPs.

Referências Bibliográficas

-
- [1] G. M. Geise, H. S. Lee, D. J. Miller, B. D. Freeman, J. E. McGrath, and D. R. Paul, "Water purification by membranes: the role of polymer science," *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 48, pp. 1685-1718, 2010.
- [2] R. Bergamasco, F. V. Da Silva, F. S. Arakawa, N. U. Yamaguchi, M. H. M. Reis, and C. J. Tavares, "Drinking water treatment in a gravimetric flow system with TiO₂ coated membranes," *Chemical Engineering Journal*, vol. 174, pp. 102-109, 2011.
- [3] Q. Li, S. Mahendra, D. Y. Lyon, L. Brunet, M. V. Liga, and D. Li, "Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications," *Water Research*, vol. 42, pp. 4591-4602, 2008.
- [4] World Health Organization (WHO), "Meeting the MDG drinking water and sanitation target: amid-term assessment of progress, 2004," Geneva, 2004.
- [5] J. Theron, J. Walker, and T. Cloete, "Nanotechnology and water treatment: applications and emerging opportunities," *Critical reviews in microbiology*, vol. 34, pp. 43-69, 2008.
- [6] R. D. Noble and S. A. Stern, *Membrane separations technology: principles and applications*. Elsevier, vol. 2, 1995.
- [7] J. Fabrega, S. N. Luoma, C. R. Tyler, T. S. Galloway, and J. R. Lead, "Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment," *Environment International*, vol. 37, pp. 517-531, 2011.
- [8] G. Lövestam, H. Rauscher, G. Roebben, B. S. Klüttgen, N. Gibson, and J.-P. Putaud, *Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes*. Publications Office, 2010.
- [9] J. Kim, S. Yun, and Z. Ounaies, "Discovery of cellulose as a smart material," *Macromolecules*, vol. 39, pp. 4202-4206, 2006.
- [10] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink, and A. Bohn, "Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, pp. 3358-3393, 2005.
- [11] S. Kendouli, O. khalfallah, N. Sobti, A. Bensouissi, A. Avci, and V. Eskizeybek, "Modification of cellulose acetate nanofibers with PVP/Ag addition," *Materials Science in Semiconductor Processing*, vol. 28, pp. 13-19, 2014.
- [12] P. Zugenmaier, "Characteristics of cellulose acetates - Characterization and physical properties of cellulose acetates," in *Macromolecular symposia*, pp. 81-166, 2004.
-

- [13] T. Heinze and T. Liebert, "Chemical characteristics of cellulose acetate," in *Macromolecular Symposia*, pp. 167-238, 2004.
- [14] D. A. Cerqueira, G. Rodrigues Filho, R. d. A. Carvalho, and A. J. Valente, "Caracterização de Acetato de Celulose Obtido a partir do Bagaço de Cana-de-Açúcar por 1H-RMN," *Polímeros*, vol. 20, pp. 85-91, 2010.
- [15] S. H. Ye, J. Watanabe, Y. Iwasaki, and K. Ishihara, "Antifouling blood purification membrane composed of cellulose acetate and phospholipid polymer," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 4143-4152, 2003.
- [16] A. Bledzki and J. Gassan, "Composites reinforced with cellulose based fibres," *Progress in polymer science*, vol. 24, pp. 221-274, 1999.
- [17] G. Arthanareeswaran, T. S. Devi, and M. Raajenthiren, "Effect of silica particles on cellulose acetate blend ultrafiltration membranes: Part I," *Separation and Purification Technology*, vol. 64, pp. 38-47, 2008.
- [18] M. M. Pendergast and E. M. Hoek, "A review of water treatment membrane nanotechnologies," *Energy & Environmental Science*, vol. 4, pp. 1946-1971, 2011.
- [19] J. H. Koo, *Polymer nanocomposites*. McGraw-Hill Professional Pub., 2006.
- [20] P. Judeinstein and C. Sanchez, "Hybrid organic-inorganic materials: a land of multidisciplinary," *J. Mater. Chem.*, vol. 6, pp. 511-525, 1996.
- [21] N. M. José and L. A. S. d. A. Prado, "Hybrid organic-inorganic materials: preparation and some applications," *Química Nova*, vol. 28, pp. 281-288, 2005.
- [22] A. V. A. M. Nóbrega, R. M. O. B. Nogueira, and M. Oliveira, "Hybrid nanocomposite for aquatic media remediation and respective production method," ed: Google Patents, WO 2012087173, 2012.
- [23] A. C. C. Esteves, A. Barros-Timmons, and T. Trindade, "Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos," *Química Nova*, vol. 27, pp. 798-806, 2004.
- [24] G. Kickelbick, *Hybrid materials: synthesis, characterization, and applications*. John Wiley & Sons, 2007.
- [25] N. Silvestry-Rodriguez, E. E. Sicairos-Ruelas, C. P. Gerba, and K. R. Bright, "Silver as a disinfectant," in *Reviews of environmental contamination and toxicology*, ed: Springer, pp. 23-45, 2007.

- [26] C. L. Fox, "Silver sulfadiazine—a new topical therapy for pseudomonas in burns: therapy of pseudomonas infection in burns," *Archives of Surgery*, vol. 96, pp. 184-188, 1968.
- [27] S. Kidambi and M. L. Bruening, "Multilayered polyelectrolyte films containing palladium nanoparticles: synthesis, characterization, and application in selective hydrogenation," *Chemistry of materials*, vol. 17, pp. 301-307, 2005.
- [28] K. Chaloupka, Y. Malam, and A. M. Seifalian, "Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications," *Trends in biotechnology*, vol. 28, pp. 580-588, 2010.
- [29] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, and J. T. Ramirez, "The bactericidal effect of silver nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 16, p. 2346, 2005.
- [30] J. Thiel, L. Pakstis, S. Buzby, M. Raffi, C. Ni, and D. e. J. Pochan, "Antibacterial Properties of Silver-Doped Titania," *Small*, vol. 3, pp. 799-803, 2007.
- [31] H. Kong and J. Jang, "Antibacterial properties of novel poly (methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles," *Langmuir*, vol. 24, pp. 2051-2056, 2008.
- [32] M. Marini, S. De Niederhausen, R. Iseppi, M. Bondi, C. Sabia, and M. Toselli, "Antibacterial activity of plastics coated with silver-doped organic-inorganic hybrid coatings prepared by sol-gel processes," *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 1246-1254, 2007.
- [33] P. Dallas, V. K. Sharma, and R. Zboril, "Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications, and perspectives," *Advances in colloid and interface science*, vol. 166, pp. 119-135, 2011.
- [34] C. Varsha, S. K. Bajpai, and C. Navin, "Investigation of water vapour permeation and antibacterial properties of nano silver loaded cellulose acetate film," *International Food Research Journal*, vol. 17, pp. 623-639, 2010.
- [35] A. F. de Faria, D. S. T. Martinez, S. M. M. Meira, A. C. M. de Moraes, A. Brandelli, and A. G. Souza Filho, "Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 113, pp. 115-124, 2014.
- [36] A. C. M. de Moraes, P. F. Andrade, A. F. de Faria, M. B. Simões, F. C. C. S. Salomão, and E. B. Barros, "Fabrication of transparent and ultraviolet shielding composite films based on graphene oxide and cellulose acetate," *Carbohydrate Polymers*, vol. 123, pp. 217-227, 2015.

- [37] S. S. Madaeni and T. Akbarzadeh Arbatan, "Preparation and Characterization of Microfiltration Membrane Embedded with Silver Nano-Particles," *Iran. J. Chem. Chem. Eng. Vol*, vol. 29, 2010.
- [38] S. Prabhu and E. K. Poulouse, "Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects," *International Nano Letters*, vol. 2, pp. 1-10, 2012.
- [39] J. S. Taurozzi, H. Arul, V. Z. Bosak, A. F. Burban, T. C. Voice, and M. L. Bruening, "Effect of filler incorporation route on the properties of polysulfone–silver nanocomposite membranes of different porosities," *Journal of Membrane Science*, vol. 325, pp. 58-68, 2008.
- [40] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria," *Journal of colloid and interface science*, vol. 275, pp. 177-182, 2004.
- [41] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, and H. J. Lee, "Antimicrobial effects of silver nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 3, pp. 95-101, 2007.
- [42] M. Danilczuk, A. Lund, J. Sadlo, H. Yamada, and J. Michalik, "Conduction electron spin resonance of small silver particles," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 63, pp. 189-191, 2006.
- [43] U. Klueh, V. Wagner, S. Kelly, A. Johnson, and J. Bryers, "Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation," *Journal of biomedical materials research*, vol. 53, pp. 621-631, 2000.
- [44] Y. Matsumura, K. Yoshikata, S.-i. Kunisaki, and T. Tsuchido, "Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate," *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, pp. 4278-4281, 2003.
- [45] V. K. Sharma, R. A. Yngard, and Y. Lin, "Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities," *Advances in colloid and interface science*, vol. 145, pp. 83-96, 2009.
- [46] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, and N. Pizurova, "Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, pp. 16248-16253, 2006.

- [47] C. Marambio-Jones and E. M. Hoek, "A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 12, pp. 1531-1551, 2010.
- [48] Q. Feng, J. Wu, G. Chen, F. Cui, T. Kim, and J. Kim, "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," *Journal of biomedical materials research*, pp. 662-8, 2001.
- [49] K. Kawahara, K. Tsuruda, M. Morishita, and M. Uchida, "Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions," *Dental Materials*, vol. 16, pp. 452-455, 2000.
- [50] G. Martinez-Castanon, N. Nino-Martinez, F. Martinez-Gutierrez, J. Martinez-Mendoza, and F. Ruiz, "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 10, pp. 1343-1348, 2008.
- [51] S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, "Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, pp. 1712-1720, 2007.
- [52] R. J. Diaz and R. Rosenberg, "Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems," *science*, vol. 321, pp. 926-929, 2008.
- [53] J. Hilton, M. O'Hare, M. J. Bowes, and J. I. Jones, "How green is my river? A new paradigm of eutrophication in rivers," *Science of the Total Environment*, vol. 365, pp. 66-83, 2006.
- [54] N. N. Rabalais, R. E. Turner, R. J. Diaz, and D. Justić, "Global change and eutrophication of coastal waters," *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, vol. 66, pp. 1528-1537, 2009.
- [55] M. Selman, S. Greenhalgh, R. Diaz, and Z. Sugg, "Eutrophication and hypoxia in coastal areas: a global assessment of the state of knowledge," *World Resources Institute*, vol. 284, pp. 1-6, 2008.
- [56] T. Deppe and J. Benndorf, "Phosphorus reduction in a shallow hypereutrophic reservoir by in-lake dosage of ferrous iron," *Water Research*, vol. 36, pp. 4525-4534, 2002.
- [57] B. R. Conover, "Method of treating lake water with aluminum hydroxide sulfate," ed: Google Patents, US 5039427, 1991.

- [58] M. Oliveira, A. Machado, and R. Nogueira, "Phosphorus removal from eutrophic waters with an aluminium hybrid nanocomposite," *Water, Air, & Soil Pollution*, vol. 223, pp. 4831-4840, 2012.
- [59] V. Balzani, "Nanoscience and nanotechnology: a personal view of a chemist," *Small*, vol. 1, pp. 278-283, 2005.
- [60] K. N. Thakkar, S. S. Mhatre, and R. Y. Parikh, "Biological synthesis of metallic nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 6, pp. 257-262, 2010.
- [61] S. K. Ghosh and T. Pal, "Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications," *Chemical Reviews*, vol. 107, pp. 4797-4862, 2007.
- [62] F. Mafuné, J.-y. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, and H. Sawabe, "Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, pp. 8333-8337, 2000.
- [63] J. A. Dahl, B. L. Maddux, and J. E. Hutchison, "Toward greener nanosynthesis," *Chemical reviews*, vol. 107, pp. 2228-2269, 2007.
- [64] S. Mandal, R. Roy, and A. Pal, "Effect of particle shape distribution on the surface plasmon resonance of Ag-SiO₂ nanocomposite thin films," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 36, p. 261, 2003.
- [65] G. A. Ozin, A. C. Arsenault, and L. Cademartiri, *Nanochemistry: a chemical approach to nanomaterials*. Royal Society of Chemistry, 2009.
- [66] D. L. Fedlheim and C. A. Foss, *Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications*. CRC Press, 2001.
- [67] A. R. Tao, S. Habas, and P. Yang, "Shape control of colloidal metal nanocrystals," *small*, vol. 4, pp. 310-325, 2008.
- [68] S. Agnihotri, S. Mukherji, and S. Mukherji, "Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy," *RSC Advances*, vol. 4, pp. 3974-3983, 2014.
- [69] L. Jeong and W. H. Park, "Preparation and Characterization of Gelatin Nanofibers Containing Silver Nanoparticles," *International journal of molecular sciences*, vol. 15, pp. 6857-6879, 2014.

- [70] L. Mulfinger, S. D. Solomon, M. Bahadory, A. V. Jeyarajasingam, S. A. Rutkowsky, and C. Boritz, "Synthesis and study of silver nanoparticles," *Journal of chemical education*, vol. 84, p. 322, 2007.
- [71] T. Maneerung, S. Tokura, and R. Rujiravanit, "Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing," *Carbohydrate polymers*, vol. 72, pp. 43-51, 2008.
- [72] D. G. Angelescu, M. Vasilescu, M. Anastasescu, R. Baratoiu, D. Donescu, and V. S. Teodorescu, "Synthesis and association of Ag(0) nanoparticles in aqueous Pluronic F127 triblock copolymer solutions," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 394, pp. 57-66, 2012.
- [73] M. Gonzales and K. M. Krishnan, "Phase transfer of highly monodisperse iron oxide nanocrystals with Pluronic F127 for biomedical applications," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 311, pp. 59-62, 2007.
- [74] G. Dumortier, J. L. Grossiord, F. Agnely, and J. C. Chaumeil, "A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics," *Pharmaceutical research*, vol. 23, pp. 2709-2728, 2006.
- [75] L. Kvitek, A. Panáček, J. Soukupova, M. Kolar, R. Vecerova, and R. Prucek, "Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs)," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 112, pp. 5825-5834, 2008.
- [76] T. Sakai and P. Alexandridis, "Ag and Au monometallic and bimetallic colloids: morphogenesis in amphiphilic block copolymer solutions," *Chemistry of materials*, vol. 18, pp. 2577-2583, 2006.
- [77] L. Wang, X. Chen, J. Zhao, Z. Sui, W. Zhuang, and L. Xu, "Preparation of silver nanoparticles templated from amphiphilic block copolymer-based hexagonal liquid crystals," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 257, pp. 231-235, 2005.
- [78] T. Sakai and P. Alexandridis, "Size-and shape-controlled synthesis of colloidal gold through autoreduction of the auric cation by poly (ethylene oxide)–poly (propylene oxide) block copolymers in aqueous solutions at ambient conditions," *Nanotechnology*, vol. 16, p. S344, 2005.

- [79] M. Rycenga, C. M. Cobley, J. Zeng, W. Li, C. H. Moran, and Q. Zhang, "Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications," *Chemical reviews*, vol. 111, pp. 3669-3712, 2011.
- [80] M. Oliveira, D. Ribeiro, J. Nobrega, A. Machado, A. Brito, and R. Nogueira, "Removal of phosphorus from water using active barriers: Al₂O₃ immobilized on to polyolefins," *Environmental technology*, vol. 32, pp. 989-995, 2011.
- [81] R. Pecora, "Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids," *Journal of nanoparticle research*, vol. 2, pp. 123-131, 2000.
- [82] B. J. Berne and R. Pecora, *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation, 2000.
- [83] M. Kaszuba, D. McKnight, M. T. Connah, F. K. McNeil-Watson, and U. Nobbmann, "Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 10, pp. 823-829, 2008.
- [84] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz, "The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, pp. 668-677, 2003.
- [85] N. R. Jana, T. K. Sau, and T. Pal, "Growing small silver particle as redox catalyst," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, pp. 115-121, 1999.
- [86] C. Jung, "Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to study structural properties of cytochromes P450 (CYPs)," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 392, pp. 1031-1058, 2008.
- [87] E. Turi, *Thermal characterization of polymeric materials*. Elsevier, 2012.
- [88] K. P. Menard, *Dynamic mechanical analysis: a practical introduction*. CRC press, 2008.
- [89] J. Mano and J.-P. Cahon, "A simple method for calibrating the temperature in dynamic mechanical analysers and thermal mechanical analysers," *Polymer Testing*, vol. 23, pp. 423-430, 2004.
- [90] G. Lawes, "Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis," 1987.
- [91] G. Kampf, "Characterization of Plastics by Physical Methods: Experimental Techniques and Practical Application," *Carl Hanser Verlag, 1986*, p. 351, 1986.

- [92] P. Echlin, *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*. Springer Science & Business Media, 2011.
- [93] B. Hafner, "Energy Dispersive Spectroscopy on the SEM: A Primer," *Characterization Facility, University of Minnesota*, pp. 1-26, 2006.
- [94] M. Abelho, "Protocolos de Microbiologia Ambiental," ed: Trabalhos práticos de Biologia—módulo Microbiologia. Escola Superior Agrária de Coimbra, 2010.
- [95] A. D. Eaton, L. S. Clesceri, and A. Greenburg, "Standard methods for the examination of water and wastewater. Baltimore, Maryland, American Public Health Association," ed: United Book Press, Inc, 1995.
- [96] D. Klemenčič, B. Simončič, B. Tomšič, and B. Orel, "Biodegradation of silver functionalised cellulose fibres," *Carbohydrate polymers*, vol. 80, pp. 426-435, 2010.
- [97] J. He, T. Kunitake, and A. Nakao, "Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers," *Chemistry of Materials*, vol. 15, pp. 4401-4406, 2003.
- [98] T. I. Abdullin, O. V. Bondar, Y. G. Shtyrlin, M. Kahraman, and M. Culha, "Pluronic block copolymer-mediated interactions of organic compounds with noble metal nanoparticles for SERS analysis," *Langmuir*, vol. 26, pp. 5153-5159, 2009.
- [99] B. Chudasama, A. K. Vala, N. Andhariya, R. Mehta, and R. Upadhyay, "Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 12, pp. 1677-1685, 2010.
- [100] M. Murali, U. Dalimba, and K. Sridharan, "Synthesis, characterization, and nonlinear optical properties of donor–acceptor conjugated polymers and polymer/Ag nanocomposites," *Journal of Materials Science*, vol. 47, pp. 8022-8034, 2012.
- [101] N. G. Khlebtsov and L. A. Dykman, "Plasmonic nanoparticles: fabrication, optical properties, and biomedical applications," in *Handbook of photonics for biomedical science*, ed: CRC Press Boca Raton, pp. 37-82, 2010.
- [102] E. A. Vogler, "Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces," *Advances in colloid and interface science*, vol. 74, pp. 69-117, 1998.
- [103] C. W. Scheeren, V. Hermes, O. Bianchi, P. F. Hertz, S. L. Dias, and J. Dupont, "Antimicrobial membrane cellulose acetate containing ionic liquid and metal nanoparticles," *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 11, pp. 5114-5122, 2011.

- [104] S. Pandey, G. K. Goswami, and K. K. Nanda, "Green synthesis of biopolymer–silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection," *International journal of biological macromolecules*, vol. 51, pp. 583-589, 2012.
- [105] A. Hanna, A. H. Basta, H. El-Saied, and I. Abadir, "Thermal properties of cellulose acetate and its complexes with some transition metals," *Polymer degradation and stability*, vol. 63, pp. 293-296, 1999.
- [106] S. Rajesh, P. Maheswari, S. Senthilkumar, A. Jayalakshmi, and D. Mohan, "Preparation and characterisation of poly (amide-imide) incorporated cellulose acetate membranes for polymer enhanced ultrafiltration of metal ions," *Chemical Engineering Journal*, vol. 171, pp. 33-44, 2011.
- [107] M. R. Huang and X. G. Li, "Thermal degradation of cellulose and cellulose esters," *Journal of applied polymer science*, vol. 68, pp. 293-304, 1998.
- [108] M. R. De Moura, L. H. Mattoso, and V. Zucolotto, "Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging," *Journal of Food Engineering*, vol. 109, pp. 520-524, 2012.
- [109] S. G. Caridade, E. G. Merino, N. M. Alves, V. de Zea Bermudez, A. R. Boccaccini, and J. F. Mano, "Chitosan membranes containing micro or nano-size bioactive glass particles: evolution of biomineralization followed by in situ dynamic mechanical analysis," *journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 20, pp. 173-183, 2013.
- [110] J. S. Taurozzi, C. A. Crock, and V. V. Tarabara, "C 60-polysulfone nanocomposite membranes: Entropic and enthalpic determinants of C 60 aggregation and its effects on membrane properties," *Desalination*, vol. 269, pp. 111-119, 2011.
- [111] K. Vimala, Y. M. Mohan, K. S. Sivudu, K. Varaprasad, S. Ravindra, and N. N. Reddy, "Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: a facile approach for superior antibacterial application," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 76, pp. 248-258, 2010.
- [112] R. Kumar, S. Howdle, and H. Münstedt, "Polyamide/silver antimicrobials: effect of filler types on the silver ion release," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 75, pp. 311-319, 2005.
- [113] K. L. Jaunarajs, "Waste water treatment phosphate removal by iron oxide," ed: Google Patents, US 3499837, 1970.

- [114] W. W. Walker Jr and K. E. Havens, "Relating algal bloom frequencies to phosphorus concentrations in Lake Okeechobee," *Lake and Reservoir Management*, vol. 11, pp. 77-83, 1995.