



**Sara Isabel  
Fateixa**

## **Nanoestruturas de $\text{Ag}_2\text{S}$ : síntese e propriedades antifúngicas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Controlo de Qualidade, realizada sob a orientação científica do Doutor Tito da Silva Trindade, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

**Aos meus pais e ao Rui  
pelo incansável apoio**

## **o júri**

presidente

Doutor Armando da Costa Duarte  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

Doutor João António Batista Pereira de Oliveira  
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Doutor Tito da Silva Trindade  
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Doutor Jorge Luís Gabriel Ferreira Costa Pereira  
Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

## agradecimentos

A apresentação desta dissertação, bem como a realização de todo o trabalho que a ela está associada nunca teriam sido possíveis sem a preciosa ajuda de pessoas às quais gostava de agradecer. Antes de mais quero agradecer ao meu orientador Doutor Tito Trindade. Quero lhe oferecer o meu mais sincero obrigado por me ter despertado o bichinho da investigação, pelos incentivos, discussões e confiança que me depositou. Enfim, por estar sempre presente, o meu mais importante e mais sincero agradecimento vai para ele.

Quero também salientar a fundamental importância da minha orientação ao cargo do Doutor João Oliveira (sempre disponível para me indicar qual o caminho a seguir e tirar aquelas dúvidas impertinentes sobre estatística) e da Doutora Adelaide Almeida (pela sua paciência e orientação no trabalho microbiano). A eles, um muito obrigado.

Para um trabalho destes ser realizado, foram importantes as ajudas que recebi de pessoas que me ensinaram e realizaram a caracterização dos materiais preparados. Quero assim agradecer à Mestre Marta Ferro (SEM, EDS), à Mestre Márcia Neves (imagens de SEM e TEM), à Doutora Rosário Soares (DRX), à Mestre Celeste Azevedo (TGA, FTIR, Raman).

Devido ao espectacular ambiente de trabalho que me proporcionaram, quero agradecer a todos aqueles com quem partilhei um espaço no laboratório, tanto de Química Inorgânica e Materiais como de Microbiologia. Um agradecimento especial à Márcia Neves e ao meu parceiro de bancada, Manuel Martins, pela incansável ajuda que me deram, inclusive material, imagens e programas e por todas as discussões saudáveis que tivemos.

Um agradecimento muito especial aos meus pais e irmã por proporcionarem esta tese possível, por aquelas longas conversas ao telemóvel e na Internet, por acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir. O meu último agradecimento e não menos importante vai para ti, Rui, por estares sempre presente e me ajudares a ultrapassar mais uma etapa da minha vida.

## palavras-chave

Nanoestruturas, Ag<sub>2</sub>S, nanocompósitos, efeito antimicrobiano

## resumo

Esta tese descreve a investigação realizada sobre a actividade antifúngica de nanocompósitos de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S.

Assim, prepararam-se primeiramente os nanocompósitos pelo crescimento de nanofases de Ag<sub>2</sub>S na superfície de partículas submicrométricas de SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>. O Ag<sub>2</sub>S foi obtido pela decomposição do complexo dietilditiocarbamato de prata (I) na presença de 1,2-diaminopropano. Os nanocompósitos obtidos (SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) foram caracterizados por várias técnicas que mostraram nanocristais de Ag<sub>2</sub>S (acantite) distribuídos sobre as superfícies de SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>.

A actividade antifúngica dos nanocompósitos mencionados foi investigada na presença dos fungos *Penicillium sp* e *Aspergillus niger*. Os nanocompósitos apresentaram actividade antifúngica estando esta dependente de vários parâmetros tais como a natureza do substrato, o teor de Ag<sub>2</sub>S e tempo de exposição ao fungo.

**keywords**

Nanostructures, Ag<sub>2</sub>S, nanocomposites, antimicrobial effect

**abstract**

In this work the fungicide properties of novel SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S and TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S nanocomposites were investigated.

Thus the nanocomposites were first prepared by growing Ag<sub>2</sub>S nanophases at the surfaces of submicron SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> particles. The Ag<sub>2</sub>S nanophases were grown by the decomposition of a silver (I) diethyldithiocarbamate complex in the presence of 1,2-diaminopropane. The nanocomposites obtained (SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S and TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) were characterized by a range of techniques which showed Ag<sub>2</sub>S (*acanthite*) nanocrystals dispersed over the SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> surfaces.

The antifungal activity of the above mentioned nanocomposites was investigated against *Penicillium sp* and *Aspergillus niger*. The nanocomposites showed antifungal activity and this depended on several parameters such as the substrate characteristics, Ag<sub>2</sub>S content and fungi exposition time.

## *Abreviaturas*

AgDTC – dietilditiocarbamato de prata

ADN – ácido desoxirribonucleico

AFM – microscopia de força atómica (do inglês atomic force microscopy)

DMF - N, N – dimetilformamida

DRX – difracção de raios X de pós

EDS – espectroscopia de dispersão de electrões (do inglês electron dispersion spectroscopy)

Et – grupo etilo

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês Fourier transform infrared spectroscopy)

ICP – acoplamento de plasma induzido (do inglês inductively coupled argon plasma)

IV - infravermelho

Me – grupo metil

NaDTC – dietilditiocarbamato de sódio

PDA – potato dextrose agar

PVP - polivinilpirrolidona

RMN – ressonância magnética nuclear

SEM – microscopia electrónica de varrimento (do inglês scanning electron microscopy)

SERS – do inglês Surface Enhanced Raman Scattering

TADDD – dibrometo de bis (1,1 – trimetilamoniadecanoilaminoetil) dissulfito

TEM – microscopia electrónica de transmissão (do inglês transmission electron microscopy)

TEOS – tetraetoxissilano

TGA – análise termogravimétrica (do inglês thermogravimetric analysis)

TMS – tetrametilssilano

TOP – trioctilfosfina

TOPO - óxido de trioctilfosfina

UV-Vis – ultravioleta – visível

## *Índice geral*

<b>1.Capítulo: Introdução geral</b>	31
1.1.Nanotecnologia e nanomateriais	33
1.2.Nanopartículas de prata	39
1.2.1. Métodos de síntese química	39
1.2.2. Modificação superficial	43
1.2.3 Propriedades e aplicações	45
1.3.Nanopartículas de sulfureto de prata (Ag <sub>2</sub> S)	45
1.3.1. Sínteses de nanopartículas de Ag <sub>2</sub> S	46
1.3.2. Modificação superficial	48
1.3.3. Propriedades e aplicações	49
1.4.Efeitos antimicrobianos da prata	49
1.4.1. Efeito antifúngico	51
1.4.2. Efeito antibacteriano	54
1.5. Introdução aos testes estatísticos:	55
1.5.1. Testes de hipóteses	55
1.5.1.1. Comparação de variâncias	59
1.5.1.2. Comparação de médias quando $n \geq 30$	59
1.5.1.3. Comparação de médias quando $n < 30$	61
1.5.2. Propagação de erros	63
1.6 Contexto e Objectivos	64
1.7.Referências	65
<b>2.Capítulo: Nanoestruturas de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S</b>	69
2.1.Introdução	71
2.2 Síntese do nanocompósito	72
2.2.1.Síntese e caracterização do precursor molecular: Dietilditiocarbamato de prata (I) (AgDTC)	72
2.2.2. Sílica amorfa (SiO <sub>2</sub> )	74
2.3.Caracterização estrutural e morfológica dos nanocompósitos	78
2.4.Efeito fungicida e tratamento estatístico de dados	82
2.4.1.Actividade antifúngica de nanopartículas de SiO <sub>2</sub> e do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	82
2.4.2. Efeito da concentração do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S na actividade antifúngica	89
2.4.3. Actividade antifúngica do Ag <sub>2</sub> S depositado em SiO <sub>2</sub> com diferentes tamanhos	94
2.4.4. Actividade antifúngica do Ag <sub>2</sub> S preparado por diferentes métodos	99
2.4.5. Actividade antifúngica da prata (metálica e iónica)	104
2.4.6. Actividade antifúngica de fibras de celulose com SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	111
2.5.Conclusão	113
2.6.Referências	113



<b>3.Capítulo: Nanoestruturas de TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S</b>	115
3.1.Introdução	117
3.2.Síntese do nanocompósito	119
3.2.1. Dióxido de Titânio (TiO <sub>2</sub> )	119
3.3.Caracterização estrutural e morfológica dos nanocompósitos	124
3.4.Efeito fungicida e tratamento estatístico de dados	126
3.4.1. Actividade antifúngica de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> e do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	127
3.4.2. Actividade antifúngica das nanopartículas de TiO <sub>2</sub> com diferentes tamanhos	132
3.4.3. Actividade antifúngica do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com diferentes tamanhos de TiO <sub>2</sub>	137
3.4.4. Actividade antifúngica da prata (metálica e iónica)	142
3.5.Conclusão	147
3.6.Referências	147
<b>4.Capítulo: Conclusões gerais e perspectivas de trabalho futuro</b>	151
<b>5. Capítulo: Procedimento experimental</b>	157
5.1.Reagentes químicos utilizados	159
5.2.Procedimento experimental – sínteses químicas	159
5.2.1. Precursor unimolecular: dietilditiocarbamato de prata (I) (AgDTC)	159
5.2.2. Preparação de nanocompósitos por decomposição térmica do dietilditiocarbamato de prata (I)	160
5.2.3. Preparação de folhas de papel	162
5.2.4. Preparação de Ag <sub>2</sub> S puro	162
5.2.5. Preparação de um colóide de prata	163
5.3.Procedimento experimental – testes microbianos	164
5.3.1. Preparação de meios de cultura	164
5.3.2. Preparação de suspensão de fungo	164
5.3.3. Diluição do fungo	164
5.3.4. Teste da actividade antifúngica das nanopartículas de sílica e do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	165
5.3.5. Teste da actividade antifúngica das nanopartículas de sílica e do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com o aumento do tempo de exposição dos materiais	166
5.3.6. Teste da actividade antifúngica do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com o aumento da sua concentração	166
5.3.7. Teste da actividade antifúngica do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com diferentes tamanhos de sílica	166
5.3.8. Teste da actividade antifúngica de fibras de celulose com SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	167
5.3.9. Teste da actividade antifúngica do Ag <sub>2</sub> S preparado por diferentes métodos	167
5.3.10. Teste da actividade antifúngica da prata (metálica e iónica)	167
5.3.11. Teste da actividade antifúngica das nanopartículas de TiO <sub>2</sub> e do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	167
5.3.12. Teste da actividade antifúngica das nanopartículas de TiO <sub>2</sub> com diferentes tamanhos	168

5.3.13. Teste da actividade antifúngica do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com diferentes tamanhos de TiO <sub>2</sub>	168
5.3.14. Teste da actividade antifúngica da prata (metálica e iónica)	168
5.4. Caracterização instrumental	168
5.5. Referências	170

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Filme fino com uma camada superhidrofílica que repele gotas de água.	33
<b>Figura 1.2.</b> Escala aproximada das dimensões de alguns objectos.	34
<b>Figura 1.3.</b> Amostras de nanocristais de CdSe (dispersos em matriz orgânica) com tamanhos médios de partícula diferentes (2 a 5 nm de diâmetro).	37
<b>Figura 1.4.</b> À medida que os materiais vão ficando cada vez mais pequenos, a área superficial em relação ao volume aumenta.	38
<b>Figura 1.5.</b> Imagem de TEM da nanopartículas de Ag preparadas em DMF (A) á temperatura ambiente (B) sob condições de refluxo.	41
<b>Figura 1.6.</b> Esquema ilustrativo do processo de formação de partículas de prata@polipirrol em núcleo – coroa.	44
<b>Figura 1.7.</b> Esquema ilustrativo do possível mecanismo de conjugação dos anti-anticorpos de coelho utilizando anticorpos de cabra ligados a partículas de sílica@prata..	44
<b>Figura 1.8.</b> Cristal de acantite ramificado.	46
<b>Figura 1.9.</b> Imagem de SEM da estrutura do <i>Aspergillus niger</i> : hifa com dois corpos esféricos que são os esporos.	51
<b>Figura 1.10.</b> Imagem de SEM (cores adicionadas) de um micélio com as hifas (verde), esporângio (laranja) e esporos (azul) do <i>Penicillium sp.</i> (aumento de 1560 x).	52
<b>Figura 1.11.</b> Imagem ao microscópio óptico das células do fungo <i>Botrytis cinerea</i> onde: 1) célula com crescimento normal, provavelmente não esteve em contacto com as nanopartículas de SiO <sub>2</sub> /Ag; 2) célula extensa devido á estimulação das nanopartículas de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S; 3) célula rebentada devido á estimulação forte das nanopartículas de SiO <sub>2</sub> /Ag.	53
<b>Figura 1.12.</b> Imagem de TEM de uma célula da bactéria <i>E – coli</i> tratada com nanopartículas de prata (50 µg/cm <sup>3</sup> ) durante 1 hora..	54
<b>Figura 1.13.</b> Região de rejeição de H <sub>0</sub> para um teste unilateral para a direita	56
<b>Figura 1.14.</b> Região de rejeição de H <sub>0</sub> quando se realiza um teste bilateral	56
<b>Figura 1.15.</b> Relação entre a variação de $\alpha$ e $\beta$	58
<b>Figura 2.1.</b> Termograma do complexo AgDTC	73
<b>Figura 2.2.</b> Imagem de SEM das partículas de SiO <sub>2</sub> preparadas.	75
<b>Figura 2.3.</b> Comportamento do Potencial Zeta de nanopartículas esféricas de sílica com tamanhos diversos em função do pH.	76
<b>Figura 2.4.</b> Difractograma de raios X de pós do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S.	79
<b>Figura 2.5.</b> Difractograma de raios X de pós em função da temperatura para o nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S.	80
<b>Figura 2.6.</b> a) Imagem de SEM do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S, ao fim de 8 horas de reacção; b) esquema do nanocompósito de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S.	81
<b>Figura 2.7.</b> a) Imagem de TEM do nanocomposito de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S demonstrando a formação de ilhas de Ag <sub>2</sub> S na superfície da sílica; b) grande ampliação de uma ilha de uma nanopartícula de Ag <sub>2</sub> S.	81

<b>Figura 2.8.</b> Efeito das nanopartículas de SiO <sub>2</sub> e SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S no crescimento médio do diâmetro das colónias do <i>Penicillium sp.</i>	83
<b>Figura 2.9.</b> Efeito das nanopartículas de SiO <sub>2</sub> e SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S no crescimento médio do diâmetro das colónias do <i>Aspergillus niger.</i>	83
<b>Figura 2.10.</b> Efeito das partículas de SiO <sub>2</sub> e SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S no crescimento do <i>Penicillium sp</i> em função do tempo de exposição.	88
<b>Figura 2.11.</b> Efeito das partículas de SiO <sub>2</sub> e SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S no crescimento do <i>Aspergillus niger</i> em função do tempo de exposição (ufc – unidade formadora de colónias).	88
<b>Figura 2.12.</b> Efeito do aumento da concentração do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com um tempo de exposição de 48 horas no crescimento do <i>Penicillium sp.</i>	89
<b>Figura 2.13.</b> Efeito do aumento da concentração do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com um tempo de exposição de 48 horas no crescimento do <i>Aspergillus niger.</i>	90
<b>Figura 2.14.</b> Efeito da actividade antifúngica do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com diferentes tamanhos de sílicas no diâmetro das colónias do <i>Penicillium sp.</i>	95
<b>Figura 2.15.</b> Efeito da actividade antifúngica do nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com diferentes tamanhos de sílicas no diâmetro das colónias do <i>Aspergillus niger.</i>	95
<b>Figura 2.16.</b> Efeito antifúngico do Ag <sub>2</sub> S preparado por métodos diferentes no crescimento das colónias de o <i>Penicillium sp.</i>	100
<b>Figura 2.17.</b> Efeito antifúngico do Ag <sub>2</sub> S preparado por métodos diferentes no crescimento das colónias de o <i>Aspergillus niger.</i>	100
<b>Figura 2.18.</b> Efeito da mesma concentração de prata em diferentes compostos no crescimento das colónias do <i>Penicillium sp.</i>	105
<b>Figura 2.19.</b> Efeito da mesma concentração de prata em diferentes compostos no crescimento das colónias do <i>Aspergillus niger.</i>	105
<b>Figura 2.20.</b> a) Imagem de SEM do fungo <i>Penicillium sp</i> ; b) Imagem de SEM do fungo <i>Aspergillus niger</i>	108
<b>Figura 2.21.</b> a) Imagem de SEM do <i>Penicillium sp</i> exposto ao nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S durante 48 horas; b) Imagem de SEM com maior ampliação das partículas de SiO <sub>2</sub> com Ag <sub>2</sub> S a cobrir todas as hifas do <i>Penicillium sp.</i>	108
<b>Figura 2.22.</b> a) Imagem de SEM do <i>Aspergillus niger</i> exposto ao nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S durante 48 horas; b) Imagem de SEM com maior ampliação das partículas de SiO <sub>2</sub> com Ag <sub>2</sub> S a cobrir todas as hifas do <i>Aspergillus niger.</i>	110
<b>Figura 2.23.</b> Imagens de SEM do <i>Penicillium sp</i> e do <i>Aspergillus niger</i> expostos à prata metálica durante 48 horas.	110
<b>Figura 2.24.</b> Imagens de SEM do <i>Penicillium sp</i> e do <i>Aspergillus niger</i> expostos à prata iónica (Ag <sub>2</sub> S preparado por precipitação) a durante 48 horas.	112
<b>Figura 2.25.</b> a) Fotografia de uma placa com PDA e uma folha de fibras de celulose no centro, com um crescimento com 8 dias de incubação ( <i>Aspergillus niger</i> ); b) Fotografia de uma placa com PDA e uma folha de fibras de celulose e SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S no centro, com um crescimento com 8 dias de incubação; c) imagem de SEM de esporos adultos do <i>Aspergillus niger</i> na presença da folha de fibras de celulose; d) imagem de SEM de esporos adultos do <i>Aspergillus</i>	116

	<i>Níger</i> na presença da folha de fibra de celulose e o nanocompósito.	
<b>Figura 3.1.</b>	a) Esquema representativo da forma do rútilo; b) esquema representativo da forma da anátase.	117
<b>Figura 3.2.</b>	Imagem de SEM das partículas de TiO <sub>2</sub> preparadas.	120
<b>Figura 3.3.</b>	Potencial Zeta de nanopartículas esféricas de TiO <sub>2</sub> em função do pH	124
<b>Figura 3.4.</b>	Difractograma de raios X de pós do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S.	125
<b>Figura 3.5.</b>	a) Imagem de SEM do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S, ao fim de 8 horas de reacção; b) esquema da estrutura do nanocompósito de TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S.	125
<b>Figura 3.6.</b>	Imagem de TEM do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S, ao fim de 8 horas de reacção.	126
<b>Figura 3.7.</b>	Efeito das nanopartículas de TiO <sub>2</sub> e TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S no crescimento das colónias do <i>Penicillium sp.</i>	127
<b>Figura 3.8.</b>	Efeito das nanopartículas de TiO <sub>2</sub> e TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S no crescimento das colónias do <i>Aspergillus níger</i>	128
<b>Figura 3.9.</b>	Efeito das nanopartículas de TiO <sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro no crescimento das colónias do <i>Penicillium sp.</i>	133
<b>Figura 3.10.</b>	Efeito das nanopartículas de TiO <sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro no crescimento das colónias do <i>Aspergillus níger</i> .	133
<b>Figura 3.11.</b>	Efeito do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.69 e 2.64 % m/m de prata no crescimento das colónias do <i>Penicillium sp.</i>	137
<b>Figura 3.12.</b>	Efeito do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.69 e 2.64 % m/m de prata no crescimento das colónias do <i>Aspergillus niger</i> .	138
<b>Figura 3.13.</b>	Efeito da mesma concentração de prata em diferentes materiais no crescimento das colónias do <i>Penicillium sp.</i>	143
<b>Figura 3.14.</b>	Efeito da mesma concentração de prata em diferentes materiais no crescimento das colónias do <i>Aspergillus níger</i> .	143
<b>Figura 3.15.</b>	A imagem em cima á esquerda mostra uma imagem de SEM do <i>Penicillium sp</i> exposto a nanopartículas esféricas de TiO <sub>2</sub> durante 48 horas; a imagem á direita mostra uma imagem de SEM com maior ampliação das partículas de TiO <sub>2</sub> a cobrirem uma hifa do <i>Penicillium sp.</i>	146
<b>Figura 3.16.</b>	A imagem em cima á esquerda mostra uma imagem de SEM do <i>Aspergillus niger</i> exposto a nanopartículas esféricas de TiO <sub>2</sub> durante 48 horas; a imagem á direita mostra uma imagem de SEM com maior ampliação das partículas de TiO <sub>2</sub> a cobrirem uma hifa do <i>Aspergillus níger</i> .	146
<b>Figura 3.17.</b>	A imagem em cima á esquerda mostra uma imagem de SEM do <i>Penicillium sp</i> exposto ao nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S durante 48 horas; a imagem á direita mostra uma imagem de SEM com maior ampliação do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S a cobrirem uma hifa do <i>Penicillium sp.</i>	147
<b>Figura 3.18.</b>	A imagem em cima á esquerda mostra uma imagem de SEM do <i>Aspergillus niger</i> exposto ao nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S durante 48 horas; a imagem á direita mostra uma imagem de SEM com maior ampliação do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S a cobrirem uma hifa do <i>Aspergillus niger</i> .	147
<b>Figura 5.1.</b>	Esquema representativo das diluições efectuadas nos testes fúngicos.	164
<b>Figura 5.2.</b>	Esquema representativo de uma sementeira á superfície de fungos.	165

## *Índice de Tabelas*

<b>Tabela 1.1.</b> Descrição de algumas aplicações da nanotecnologia.	35
<b>Tabela 1.2.</b> Diferentes resultados associados a um teste de hipóteses	59
<b>Tabela 2.1.</b> Caracterização do complexo AgDTC por várias técnicas.	73
<b>Tabela 2.2.</b> Diâmetro das esferas de SiO <sub>2</sub> preparadas.	77
<b>Tabela 2.3.</b> Resultados do teste Z aplicado na comparação do diâmetro das partículas de sílica por dois métodos diferentes.	78
<b>Tabela 2.4.</b> Valores das médias dos diâmetros das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor da sílica e do SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S em cada fungo.	85
<b>Tabela 2.5.</b> Valores das médias dos diâmetros das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor da sílica e do SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S nos dois fungos.	86
<b>Tabela 2.6.</b> Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor de 2 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S e 10 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S em cada fungo.	92
<b>Tabela 2.7.</b> Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor de 2 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S e 10 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S nos dois fungos.	93
<b>Tabela 2.8.</b> Valores das médias do diâmetro das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.99% m/m de Ag e do SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 5.99% m/m de Ag em cada fungo.	97
<b>Tabela 2.9.</b> Valores das médias do diâmetro das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.99% m/m de Ag e do SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 5.99% m/m de Ag nos dois fungos.	98
<b>Tabela 2.10.</b> Percentagens (%) de inibição devido á presença de Ag <sup>(1)</sup> em diferentes materiais.	101
<b>Tabela 2.11.</b> Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor diferentes compostos com Ag <sub>2</sub> S entre os fungos.	102
<b>Tabela 2.12.</b> Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor da prata metálica, do Ag <sub>2</sub> S preparado por precipitação e o nanocompósito SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S nos dois fungos.	106
<b>Tabela 3.1.</b> Médias do diâmetro das esferas de TiO <sub>2</sub> preparadas com a variação de KCl.	123
<b>Tabela 3.2.</b> Resultados do teste Z na comparação das médias dos diâmetros das partículas de TiO <sub>2</sub> por dois métodos distintos.	123

<b>Tabela 3.3.</b> Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do TiO <sub>2</sub> e do TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S em cada fungo.	129
<b>Tabela 3.4.</b> Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do TiO <sub>2</sub> e do TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S nos dois fungos.	131
<b>Tabela 3.5.</b> Valores das médias do diâmetro das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor de partículas de TiO <sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro em cada fungo.	134
<b>Tabela 3.6.</b> Valores das médias do diâmetro das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor de partículas de TiO <sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro nos dois fungos.	136
<b>Tabela 3.7.</b> Valores das médias do diâmetro das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.69 e 2.64 % de m/m de prata em cada fungo.	139
<b>Tabela 3.8.</b> Valores das médias do diâmetro das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.69 e 2.64 % de m/m de prata nos dois fungos.	141
<b>Tabela 3.9.</b> Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor da prata metálica, do Ag <sub>2</sub> S preparado por precipitação e o nanocompósito TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S nos dois fungos.	144
<b>Tabela 5.1.</b> Volumes usados para preparar partículas de sílica com diferentes tamanhos	160

## *1 Capítulo*

### *Introdução geral*



*“Why cannot we write the entire 24 volumes of the Encyclopedia Britannica on the head of a pin?”*

Richard Feynman  
Annual meeting of the American Physical Society (1959)

### 1.1 Nanotecnologia e nanomateriais

A Nanotecnologia tem sido apontada como uma tecnologia extremamente inovadora pois dedica-se à criação de materiais, dispositivos e sistemas, através do controlo da matéria a uma escala de tamanhos nanométricos realçando a exploração de novas propriedades e fenómenos desenvolvidos a esta escala (1-100 nm). Assim, com o aparecimento de novos métodos de sínteses químicas, por exemplo, e aperfeiçoamento dos já existentes, é possível criar estruturas com tamanhos nanométricos (figura 1.1) com propriedades específicas, como por exemplo a temperatura de fusão, propriedades magnéticas, a capacidade de carga e a cor sem alterar a composição química do material<sup>1</sup>.



**Figura 1.1.** Filme fino com uma camada superhidrofílica que repele gotas de água<sup>1</sup>.

Eric Drexler, nos anos 80, popularizou a palavra “Nanotecnologia” antecipando a criação de máquinas à escala nanométrica, como por exemplo motores, braços de robôs, computadores inteiros tão pequenos como uma célula. Há medida que a nanotecnologia se tornava num conceito aceite, o significado da palavra mudava para abranger os tipos mais simples de tecnologia à escala nanométrica<sup>2</sup>. Para uma melhor compreensão do significado da escala nanométrica, a figura 1.2 ilustra o tamanho relativo de alguns objectos, incluindo entidades biológicas comuns.

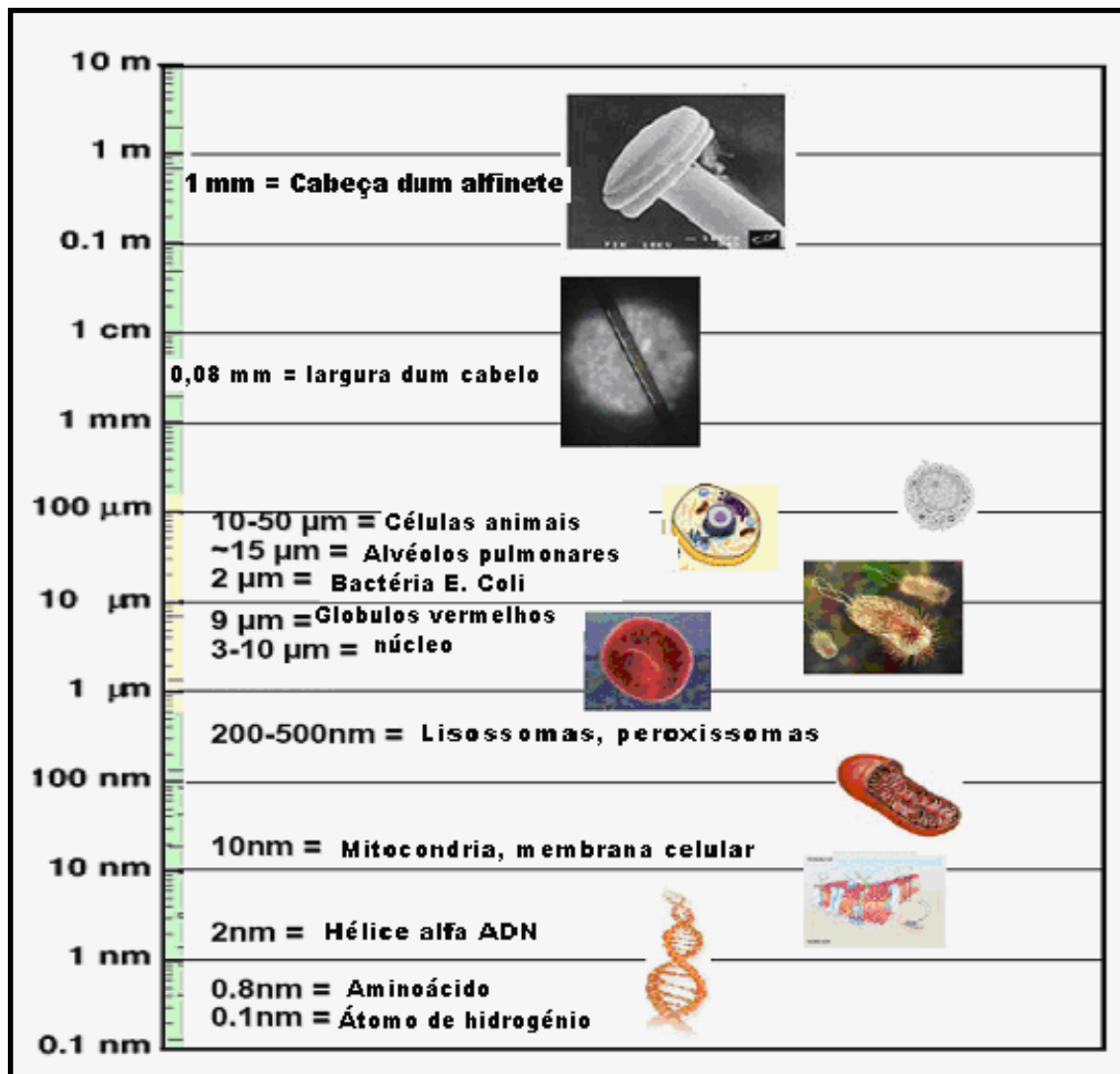


Figura 1.2 Escala aproximada das dimensões de alguns objectos<sup>3</sup>.

Com o decorrer dos anos, o desenvolvimento da nanotecnologia trouxe grandes benefícios a áreas científicas tão diferentes como a medicina e saúde, a electrónica e tecnologia de computadores, a química, a física e a engenharia de materiais (Tabela 1.1) devido ao facto de lhes proporcionar a capacidade de sintetizar estruturas numa escala nanométrica com um controlo preciso de tamanho e composição dando-lhes assim a possibilidade de organizar estruturas maiores com propriedades e funções únicas, fibras de carbono, que podem ser cerca de cinquenta vezes mais duras que o aço, supercondutores que funcionam a temperaturas cada vez mais próximas da temperatura ambiente, polímeros mecano – sensíveis, compósitos cerâmicos que resistem facilmente a temperaturas na ordem dos 1600 °C são alguns exemplos disso<sup>4</sup>.

**Tabela 1.1** Descrição de algumas aplicações da nanotecnologia <sup>4-7</sup>

<b>Medicina e saúde</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Construção de sistemas idênticos aos dos que são criados pela Natureza.</li><li>- Sistemas internos específicos, para determinadas zonas do corpo humano, que permitam o transporte e a entrega de genes e de drogas.</li><li>- Sistemas sensoriais que consigam um auto – diagnóstico para uso doméstico.</li><li>- Materiais para a regeneração de ossos e tecidos.</li></ul>
<b>Industria electrónica e de comunicação</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Novos processadores e dispositivos com circuitos mais pequenos e rápidos (em milhões de vezes) com funções mais sofisticadas e menor consumo energético.</li><li>- Novos sistemas de comunicação com altas-frequências na espectroscopia óptica aumentando assim as transmissões em cerca de dez vezes.</li><li>- Uso de nanofilmes e nanopontos em todos os meios de gravação.</li></ul>

<p><b>Industria Aeronáutica e automobilística</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aparecimento de materiais mais leves e resistentes, reforçados com nanopartículas para melhorar o desempenho dos motores e reduzir o consumo de combustíveis.</li> <li>- Novos dispositivos e aditivos para diminuir o desgaste e erosão das peças dos veículos e melhorar a lubrificação dos motores.</li> <li>- Plásticos não inflamáveis e mais baratos.</li> <li>- Fabricação de tintas para conferir uma maior durabilidade na superfície dos veículos.</li> <li>- Materiais de reconhecimento com poder de auto – reparação.</li> </ul>
<p><b>Industria química e de materiais</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Catalisadores que aumentam a eficiência energética e da combustão.</li> <li>- Fluidos magnéticos inteligentes para uso com lubrificantes.</li> <li>- Fabricação de equipamentos de corte duros e resistentes.</li> <li>- Nanocompósitos que combinam propriedades de materiais dispares, tais como polímeros e argilas.</li> </ul>
<p><b>Meio ambiente</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Desenvolvimento de agentes de limpeza e descontaminação para a remoção de compostos poluentes podendo-se assim, recuperar solos e efluentes.</li> <li>- Redução das fontes de poluição atmosférica.</li> <li>- Novas possibilidades para a reciclagem.</li> <li>- Equipamentos nanoestruturados para aumentar a eficiência do armazenamento e produção de energia, bem como a redução do seu consumo.</li> <li>-Aperfeiçoamento de células com substratos semicondutores para converter a energia solar em energia eléctrica</li> <li>- Membranas selectivas que possam filtrar contaminantes ou ainda eliminar o sal da água.</li> </ul>
<p><b>Sector de Instrumentação</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nova geração de microscópios e de instrumentos de medida.</li> <li>- Desenvolvimento de novos processos e ferramentas para a manipulação da matéria ao nível atómico.</li> <li>- Incorporação de nanopós com propriedades especiais em</li> </ul>

	materiais tais como sensores que detectam e corrigem fracturas iminentes.
--	---

Materiais que têm despertado o interesse de muitos cientistas, por todas as razões acima mencionadas, são os sólidos nanocristalinos – nanocristais – partículas cristalinas com dimensões de poucos nanômetros, em geral entre 1 -100 nm. Actualmente encontram-se publicados diversos estudos que provam a ocorrência de alterações significativas nas propriedades ópticas, electrónicas e mecânicas de um material quando este passa de forma macrocristalina para um produto de tamanho nanométrico<sup>5,6</sup>.

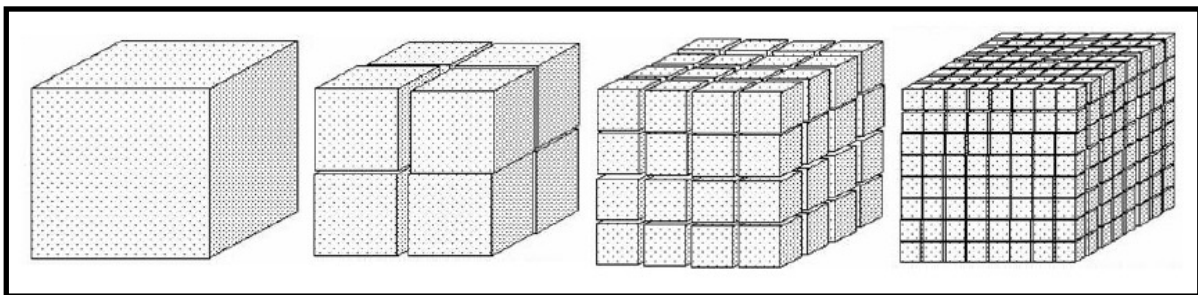
Nanomaterias que apresentam novas transições magnéticas e modificam os parâmetros das já existentes no “bulk” através do controlo do tamanho das partículas, como é o caso do Er (10-70 nm)<sup>9</sup> e nanoestruturas que podem ser uma alternativa na miniaturização de transformadores de altas-frequências, onde o controlo do tamanho dos cristais (via tratamento térmico) imerso na malha do material magnético torna este mais “suave” e garante o bom funcionamento do dispositivo, como é o caso do Fe, podem ser dados como exemplo de propriedades mecânicas alteradas<sup>9</sup>. Em alguns semicondutores a alteração das propriedades ópticas torna-se evidente pela simples observação da cor da amostra, como é o caso do semiconductor CdSe (Figura 1.3)<sup>8</sup>. O CdSe macrocristalino apresenta uma cor castanha escura enquanto que no CdSe nanocristalino, a cor pode variar do amarelo ao vermelho, dependendo do tamanho médio da partícula.



**Figura 1.3** Amostras de nanocristais de CdSe (dispersos em matriz orgânica) com tamanhos médios de partícula diferentes (2 a 5 nm de diâmetro)<sup>8</sup>.

Estas alterações de cor são devidas aos efeitos quânticos de dimensão (confinamento) e a sua origem está directamente relacionada com o tipo de ligação química no cristal<sup>9</sup>. A relação entre propriedades e tamanho é conhecida desde o século XIX, quando Faraday mostrou que a cor das partículas coloidais de Au podia ser modificada, alterando apenas o tamanho das partículas<sup>10</sup>. No entanto, apesar da longa história que envolve este assunto, o interesse nas nanopartículas foi significativo apenas nos últimos vinte anos. As actividades de investigação relacionadas com esta área foram impulsionadas pela capacidade em controlar as propriedades dos materiais através do controlo do tamanho das partículas. Este desenvolvimento pode resultar em novas tecnologias, incluindo a conversão de energia<sup>11-15</sup>, armazenamento de dados<sup>16</sup>, diodos emissores de luz (LED – Light Emitting Diode)<sup>17</sup> e pigmentos especiais<sup>18</sup>.

Não são só as alterações ao nível óptico e mecânico que são importantes nos nanomateriais, existem outras alterações significativas quando este toma proporções nanométricas como a área superficial. A área superficial está intimamente relacionada com o tamanho das partículas pois à medida que estas vão diminuindo, a área superficial aumenta (Figura 1.4), criando assim, uma melhoria na reactividade química e por sua vez, o controlo de propriedades específicas como a estabilidade da superfície, topologia e a interface da matriz – material (alteração das propriedades da matriz)<sup>3</sup>.



**Figura 1.4** À medida que os materiais vão ficando cada vez mais pequenos, a área superficial em relação ao volume aumenta<sup>3</sup>.

A determinação do carácter físico e químico dos nanomateriais é um dos aspectos mais importantes para a compreensão da organização moleculares dos mesmos. Contudo, tal

caracterização é muitas vezes dificultada devido ao tamanho reduzido das partículas. Para contornar tais dificuldades, esta avaliação combina diversas técnicas de análise, tais como análises morfológicas, espectroscopias de IV, Raman e UV/Vis, microscopias diversas como SEM, TEM e AFM (permite obter informação sobre as nanopartículas e a sua imagem) associadas a EDS, difracção de raios X, entre outras.

### 1.2 Nanopartículas de prata

A origem da palavra prata vem do latim “*argentum*” que significa brilhante. A prata é um metal de transição dúctil, de cor prateada que se encontrando no décimo primeiro grupo da tabela periódica, entre o paládio e o cádmio<sup>19</sup>. Em contraste com o cádmio, que pertence ao mesmo período na tabela periódica, a prata não é tóxica, no entanto, a maior parte dos seus sais são prejudiciais ao ser humano. Estes compostos podem ser absorvidos pelo corpo e permanecerem no sangue até se depositarem nos tecidos, provocando a argiria, que se manifesta pela pigmentação cinzenta da pele e mucosas<sup>19,20</sup>. Contudo, há outros compostos de prata, como o nitrato de prata (I), que são bastante usados na medicina, no tratamento de irritações nas membranas mucosas da boca e garganta<sup>19,20</sup>.

Por ser um metal com alta condutividade eléctrica, a prata é um forte candidato para a produção de tintas e pastas condutivas, polímeros condutores, adesivos condutores e corantes. Na forma de nanopartículas, as propriedades da prata são enormemente aumentadas em virtude do aumento dos pontos de contacto disponíveis no material<sup>21</sup>.

#### 1.2.1 Métodos de síntese química

O estudo de nanopartículas não é trivial, tanto do ponto de vista experimental como do teórico, só pelo facto do tamanho ser extremamente reduzido, dificultando a sua caracterização através das técnicas convencionais. Além disso, é importante obter amostras com distribuição de tamanho reduzida (amostras ideais)<sup>22-25</sup>.

Para a obtenção de nanopartículas pode-se utilizar dois grandes métodos de síntese: métodos físicos ou métodos químicos. Os métodos 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. A litografia é um exemplo deste método<sup>26</sup>. Os métodos químicos ou “*bottom up*” são os preferidos por se tratarem de métodos mais simples e eficazes, além de possibilitarem um maior controlo sobre os processos. Tais métodos são baseados em reacções químicas e precursores moleculares ou atómicos para a obtenção das nanopartículas desejadas<sup>27</sup>. Embora ambos os métodos possam ser usados para obter nanopartículas metálicas, apenas se vão referenciar, e devido à sua importância, alguns métodos experimentais pertencentes ao último grupo.

Antigamente as nanopartículas de prata eram sintetizadas, principalmente, por dois métodos: o método do citrato introduzido por Faraday<sup>28</sup> e o método de duas fases descrito por Brust<sup>29</sup>. Com o método do citrato era possível produzir nanopartículas de prata quase monodispersas com tamanhos entre os 2 e os 100 nm. Contudo o problema deste método era a restrição da água como solvente e o baixo conteúdo de nanopartículas de prata nas soluções resultantes. O método de Brust e as suas variações são os esquemas sintéticos mais populares actualmente, mas a variação de tamanhos é limitada (aproximadamente 1 a 5 nm). Outro problema deste método é a monocamada de ligandos orgânicos que cobrem as nanopartículas preparadas, que torna difícil a criação de superfícies funcionais ou modificações nas suas superfícies para a concretização de alguns objectivos.

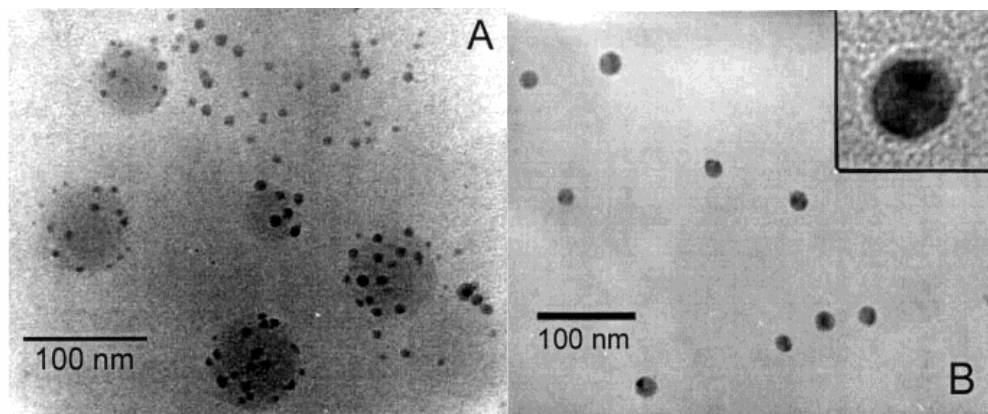
Actualmente, um dos métodos mais estudados e utilizados para a síntese de nanopartículas de prata é a precipitação controlada (redução química dos iões de prata na presença ou ausência de agentes estabilizadores)<sup>30-33</sup>. A precipitação de prata em soluções aquosas e não aquosas necessitam da redução química do catião metálico, daí se utilizarem agentes redutores tais como o H<sub>2</sub> gasoso, ABH<sub>4</sub> (A = metal alcalino), hidrazina hidratada (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) e hidrocloreto de hidrazina (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·2HCl)<sup>34</sup>.

A prata (I) pode ser reduzida com BH<sub>4</sub><sup>-</sup> numa solução aquosa de Ag<sup>+</sup> na presença, por exemplo, dibrometo de bis (1,1 – trimetilamoniadecanoilaminoetil) disulfito (TADDD), formando nanopartículas monodispersas tão pequenas como 3,3 nm<sup>35</sup>. Neste caso específico, o excesso de borohidreto reduz o dissulfito a tiol que serve de ligando



estabilizador. As partículas são redispersas em colóides estáveis em água ligeiramente acidificada.

As nanopartículas de prata também podem ser preparadas por precipitação em meio não aquoso, onde sais de prata como o  $\text{AgNO}_3$  ou  $\text{AgClO}_4$  podem ser reduzidos, por exemplo, em N, N – dimetilformamida (DMF), em que o 3 – (propilamino) trimetoxissilano serve de agente estabilizador<sup>36</sup>. Neste caso específico, a reacção envolve a oxidação da DMF num ácido carboxílico ( $\text{HCONMe}_2 + 2 \text{Ag}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{Ag}^0 + \text{MeNCOOH} + 2 \text{H}^+$ ) e o tamanho das nanopartículas de prata pode variar desde 6 a 20 nm pelo simples ajuste da temperatura bem como o rácio molar entre  $[\text{DMF}]/[\text{Ag}]$  (Figura 1.5)<sup>36</sup>. Contudo estes métodos podem levar a resultados significativamente diferentes quanto à morfologia e tamanho, dependendo não só da escolha do agente redutor e estabilizador, mas também das condições de reacção.



**Figura 1.5** Imagem de TEM da nanopartículas de Ag preparadas em DMF (A) á temperatura ambiente (B) sob condições de refluxo<sup>36</sup>.

A síntese de nanocubos de prata monodispersos (100 nm) pela redução do  $\text{AgNO}_3$  com o etilenoglicol, descrito por Sun e Xia, é notável. Nesta preparação, o etilenoglicol serve tanto de agente redutor, como de solvente ao passo que, o poli(venilpirrolidona) é usado como agente de conjugação. Os autores demonstram isso controlando as condições experimentais como a temperatura, a concentração do sal metálico, proporção metal / estabilizador e tempo de crescimento. Havendo este controlo, o tamanho e morfologia dos

nanocristais de prata são facilmente controlados e podem-se obter elevadas quantidades de nanocubos com várias dimensões de amostra (50 – 100 nm)<sup>34</sup>.

A decomposição térmica de precursores moleculares na presença de polímeros é um método alternativo à precipitação na preparação de colóides metálicos<sup>37, 38</sup>. Tipicamente, um complexo metálico, como o  $\text{Co}_2(\text{CO})_8$  é decomposto a 130 – 170 °C em atmosfera inerte num solvente como por exemplo o etilenoglicol ( $\text{Co}_2(\text{CO})_8 \rightarrow 2 \text{Co (s)} + 8 \text{CO}\uparrow$ )<sup>34</sup>.

Actualmente, nanopartículas monodispersas de prata, bem como outros metais tais como o ouro e o cobalto, são frequentemente preparadas pela decomposição de sistemas moleculares na presença de compostos diversos, tais como TOP (trioctilfosfina), TOPO (óxido de trioctilfosfina), ácido oleico, entre outros. A via organometálica proporciona a criação de nanopartículas monodispersas com uma distribuição de tamanhos reduzida e propriedades estáveis ao ar. Contudo, este método requer temperaturas de reacção relativamente elevadas (250 – 300 °C)<sup>39</sup>.

A utilização de micelas também é um métodos muito estudado e usado na preparação de nanopartículas de prata<sup>40,41,42</sup>. O sistema micelar invertido é um processo onde a agregação ocorre no núcleo aquoso invertido das micelas e as partículas crescem rodeadas por moléculas de tensioactivos. Recentemente, Klabunde e colaboradores conseguiram preparar nanopartículas monodispersas de ouro (Au), envolvendo o envelhecimento de nanopartículas polidispersas na presença de tensioactivos em excesso<sup>43</sup>. A principal vantagem da síntese por micelas invertidas é a elevada estabilidade coloidal.

Com os métodos acima descritos é possível preparar nanopartículas de diversas formas (esféricas, fios, prismas, cubos, etc) e com tamanhos bem definidos, mas na maior parte destes métodos, os colóides têm uma concentração muito baixa de prata (milimoles por litro ou menos). A escolha do agente estabilizador é um passo crítico porque este determina a estabilidade, solubilidade, reactividade e até mesmo o tamanho e forma das nanopartículas durante a síntese. Contudo, os estabilizadores como os tensioactivos e os polímeros iónicos não são facilmente retirados da superfície dos colóides de prata, afectando inevitavelmente as propriedades físicas e químicas das nanopartículas resultantes<sup>44</sup>. Para solucionar este problema, novos métodos de síntese de nanopartículas

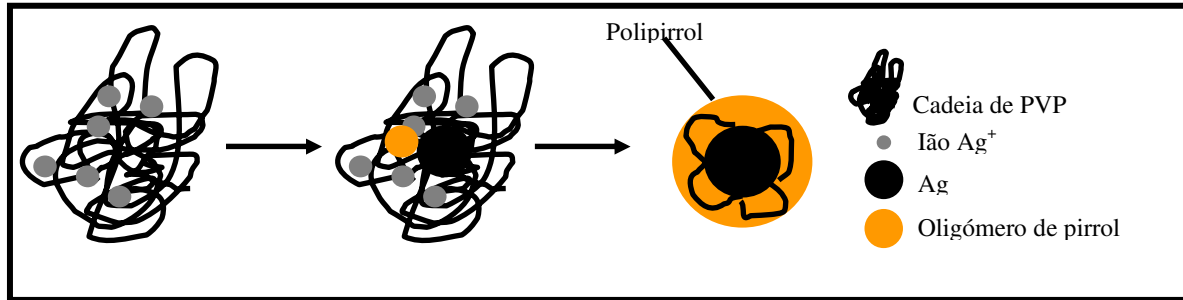
metálicas têm vindo a ser estudados e desenvolvidos, tais como a fotorredução<sup>45,46</sup>, síntese somoquímica<sup>47</sup> e a irradiação por microondas<sup>48</sup>.

### 1.2.2 Modificação superficial

A síntese de nanopartículas multifuncionais tem tido especial interesse pois estas apresentam propriedades ópticas, fotofísicas e catalíticas únicas, interagindo, por isso, com o meio ambiente de um modo muito complexo<sup>49</sup>. Com o uso de ligandos vários, as nanopartículas podem ser conjugadas, por exemplo, com biomoléculas específicas tais como açúcares, péptidos, proteínas e ADN.

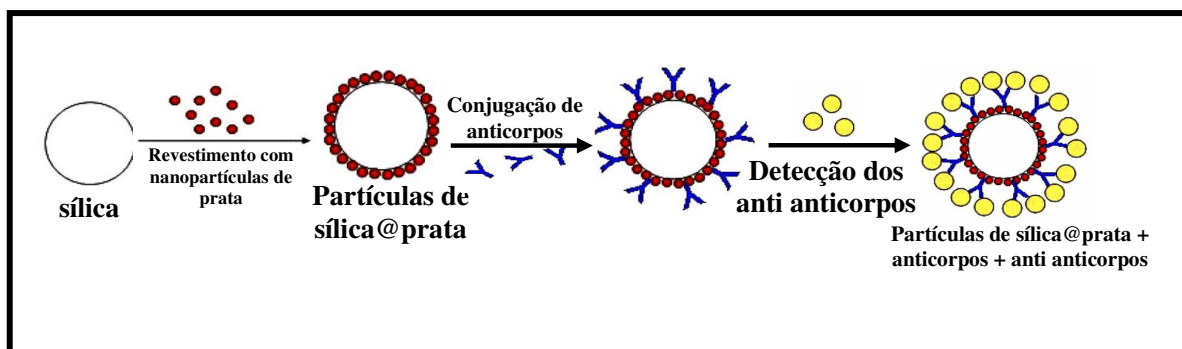
As nanopartículas com uma arquitectura em núcleo – coroa (camada de material orgânico ou inorgânico que envolve um núcleo de uma nanopartícula inorgânica) têm sido investigadas como um meio de melhorar a estabilidade, a superfície química do núcleo das nanopartículas e a reactividade com outros compostos. Alguns exemplos disso são nanopartículas estáveis em meio hidrofílico com capacidade de se ligarem a ligandos em meio hidrofóbico, coroas de Au que permitem a ligação covalente de ligandos tióis à partícula proporcionando a estas propriedades ópticas únicas<sup>49</sup>, partículas com nanómetros de tamanho que são constituídas por um núcleo de Au e coroa de poli(metilmetacrilato) como protecção<sup>50</sup>, encapsulamento de nanopartículas de prata em coroas de ácido polimetacrilato por meio de polimerização por emulsão<sup>51</sup>.

Além disso, partículas metálicas inseridas no núcleo de polímeros condutores como o polipirrol ou a polianilina têm despertado muito interesse no ponto de vista da síntese de nanocompósitos, pelo facto de estes possibilitarem a preparação de materiais para sensores químicos e dispositivos microelectrónicos. Por exemplo, partículas em núcleo – coroa de prata e polipirrol respectivamente, normalmente designadas por Ag@polipirrol, podem ser preparadas pela polimerização do pirrol na superfície das partículas de prata (Figura 1.6)<sup>50</sup>.



**Figura 1.6** Esquema ilustrativo do processo de formação de partículas de prata@polipirrol em núcleo – coroa<sup>50</sup>.

Recentemente, nanopartículas de prata biofuncionalizadas com antigénios foram aplicadas em biossensores proporcionando a oportunidade de desenvolver novos sistemas de diagnóstico que dependem da posição e da intensidade da banda de plasmão (390 – 420 nm). Coroas metálicas em sílica, por exemplo, são utilizadas para preparar biossensores, pois proporcionam uma rápida e sensível detecção de anticorpos na presença de anti – anticorpos. Este tipo de biossensores implica a síntese de nanopartículas na forma núcleo – coroa de sílica@prata por precipitação controlada, ancorando depois os anticorpos nas coroas das nanopartículas (Figura 1.7)<sup>52</sup>



**Figura 1.7** Esquema ilustrativo do possível mecanismo de conjugação dos anti-anticorpos de coelho utilizando anticorpos de cabra ligados a partículas de sílica@prata<sup>52</sup>.

### 1.2.3 Propriedades e aplicações

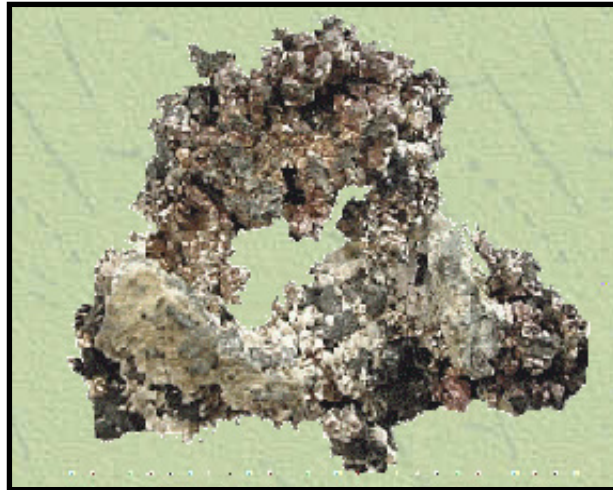
As nanopartículas metálicas apresentam propriedades físicas e químicas únicas provocadas pela elevada área superficial e densidade electrónica superficial<sup>53</sup>. Contudo, muitas destas propriedades dependem do tamanho, forma, composição química e estrutura dos nanocristais metálicos, daí que muitos estudos tenham sido efectuados para estabelecer relações entre estes parâmetros<sup>54</sup>.

A prata metálica, tanto em macrocristal como finamente dispersa, é um material cada vez mais importante para muitas tecnologias, pois expõe propriedades únicas, normalmente associadas à dos metais nobres como a estabilidade química, a excelente condutividade térmica e actividade catalítica<sup>55</sup>. Contudo, a prata possui características específicas, como o efeito antimicrobiano e o comportamento óptico (fortes oscilações na banda de plasmão)<sup>56</sup>. Consequentemente, as nanopartículas de prata são utilizadas como catalizadores, pigmentos em vidros e cerâmicos, materiais antimicrobianos, em SERS, em electrónica (transmissores de electrões únicos, unificadores eléctricos), revestimentos condutores e análises químicas (sensores químicos e biológicos) entre outros<sup>39</sup>.

### 1.3 Nanopartículas de sulfureto de prata ( $\text{Ag}_2\text{S}$ )

O  $\text{Ag}_2\text{S}$  apresenta uma tonalidade cinzenta e ocorre naturalmente na natureza na forma cristalina acantite (figura 1.8), existindo um polimorfo com o nome argentite. Muitos guias de minerais permutam os nomes ou combinam-nos como acantite – argentite. Contudo, o nome do mineral à temperatura ambiente é acantite, sendo a argentite, o nome dado ao polimorfo a temperaturas elevadas<sup>57</sup>.

A acantite e a argentite têm a mesma fórmula química, mas estruturas diferentes. A argentite tem uma estrutura estável a temperaturas acima de 173 °C. Abaixo dos 173 °C, a argentite transforma a sua estrutura isométrica na estrutura monociclíca da acantite. Esta transformação muitas vezes altera os cristais, criando formas irreconhecíveis denominadas pseudomorfes (formas falsas), mas alguns ainda terão uma forma cristalina isométrica<sup>57</sup>.



**Figura 1.8** Cristal de acantite ramificado

É bem conhecido que o  $\alpha$ - $\text{Ag}_2\text{S}$ , acantite, é um tipo de semicondutor muito importante e as nanopartículas do  $\alpha$ - $\text{Ag}_2\text{S}$  representam uma classe de nanopartículas semicondutoras muito interessantes devido às suas propriedades únicas tais como a fotovisualização e fotodegradação na região do IV<sup>58</sup>. Contudo, as tentativas de preparar nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  monodispersas têm sido dificultadas pelo facto das nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  mostrarem uma forte tendência a agregar, formando novamente pós macrocristalinos<sup>58</sup>.

### 1.3.1 Sínteses de nanopartículas de $\text{Ag}_2\text{S}$

A síntese deste semicondutor pode ser conseguida usando vários métodos de preparação. O método convencional de síntese corresponde à precipitação aquosa de nitrato de prata (I) e sulfureto de sódio. Os métodos de precipitação controlada de nanopartículas semicondutoras podem promover a formação de um colóide estável quando se utiliza um agente que se liga à superfície das partículas prevenindo desta forma um crescimento não controlado. O método mais simples para a preparação de um sistema coloidal estável envolve o uso do próprio solvente como agente estabilizante das partículas.

Os estabilizadores mais utilizados são compostos que têm um tiol como grupo funcional, como por exemplo o ácido mercaptoacético e o 3-mercapto-1,2 – propanodiol, que facilmente coordenam à superfície da prata.

A ocorrência de pequenas alterações nas condições experimentais conduz invariavelmente ao aparecimento de nanocristais com diferentes tamanhos (nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  com formas cúbicas, em dendrite, esferas, com bioatividade, até mesmo com menos de 15 nm) e, conseqüentemente com propriedades ópticas diferentes<sup>59</sup>

Encontram-se descritas na literatura outras formas de preparar nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  tais como a técnica de microemulsão e micelas invertidas<sup>60,61</sup>. A técnica de microemulsão promove uma solução em meio microheterogéneo para criar nanopartículas, ou seja, esta técnica envolve reacções de precipitação no interior de micelas invertidas. Dois compostos solúveis em água, que irão reagir para formar o precipitado, são dissolvidos separadamente em duas microemulsões com uma composição específica, sendo misturados posteriormente; esta mistura vai fazer com que haja reacções de precipitação no interior das micelas (coroa), formando-se assim as nanopartículas<sup>60</sup>. A formação de nanopartículas num sistema como este é em parte controlada pela dinâmica das trocas inter – micelares. As microcavidades do tensioactivo provocam um efeito gaiola ou coroa que limita a nucleação das partículas, crescimento e aglomeração, de uma maneira muito complexa. Uma das vantagens desta técnica é proporcionar a preparação de nanopartículas estáveis de  $\text{Ag}_2\text{S}$  a pressão e temperatura ambiente<sup>60</sup>.

Hoje em dia, novas direcções para a preparação de nanomateriais semicondutores têm vindo a ser tomadas como o uso de precursores unimoleculares<sup>58</sup>. Exemplos disso são a preparação de  $\text{CdS}$ ,  $\text{ZnS}$ ,  $\text{ZnSe}$ ,  $\text{CdSe}$  e  $\text{Ag}_2\text{S}$  a partir do tratamento térmico de precursores unimoleculares tais como ditio- e diselenocarbamatos metálicos<sup>58</sup>. Os métodos mais usados, envolvendo precursores unimoleculares, são aqueles em que a formação dos semicondutores nanocristalinos resulta da decomposição térmica do precursor em fase líquida ou em fase sólida<sup>58,62</sup>. Como o precursor contém na sua composição os dois elementos químicos que vão originar o semicondutor, elimina-se desta forma a necessidade de duas fontes química, metal e não-metal.

### 1.3.2 Modificação superficial

A modificação da superfície das nanopartículas semicondutoras atrai especial atenção porque fornece estratégias de selecção de nanopartículas com diferentes propriedades físicas e químicas na sua superfície, permitindo a sua aplicação em diferentes campos<sup>53</sup>. Vários grupos de investigadores têm estudado vários métodos de preparação de nanopartículas semicondutoras, tais como CdS, ZnS, ZnSe, CdSe e Ag<sub>2</sub>S<sup>58,60,63</sup>, em que todos envolvem um ligando orgânico para estabilizar as nanopartículas e proteger as suas superfícies (ex. protecção contra a corrosão).

Nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S quando ligadas a certos ligandos ou moléculas podem ser utilizadas na medicina ou biologia como biossensores para a conjugação de biomoléculas específicas, como por exemplo, proteínas, lípidos, açúcares, péptidos, entre outras<sup>60</sup>. Estas nanopartículas modificadas, por exemplo, com oligonucleotidos são utilizadas com o objectivo de captar o ADN<sup>60</sup>.

Nem sempre a utilização de um solvente orgânico é o método mais fácil para modificar a superfície das nanopartículas e por sua vez, modificar as suas propriedades. Os nanocompósitos (combinação de pelo menos dois materiais, em que pelo menos um deles está à escala nanométrica) e materiais em núcleo – coroa (material orgânico ou inorgânico envolve uma nanopartícula inorgânica) têm marcado posição em muitas áreas, mas é nas aplicações médicas que têm tido especial atenção.

Partículas em núcleo – coroa de semicondutor – semicondutor também têm sido estudadas, tais como ZnS@CdS, CdS@ZnS, CdS@Ag<sub>2</sub>S<sup>58</sup>, demonstrando propriedades muito diferentes das dos materiais sozinhos. Han e colaboradores conduziram estudos de absorção não linear de nanopartículas de CdS@Ag<sub>2</sub>S, onde verificaram a existência de uma longa cauda de absorção que cobria toda a região visível do espectro. Esta cauda deve-se à formação da coroa de sulfureto de prata sob a superfície do núcleo da nanopartícula de sulfureto de cádmio<sup>58</sup>.



### 1.3.3 Propriedades e aplicações

O  $\text{Ag}_2\text{S}$  é um composto semiconductor com boa estabilidade química e de fácil preparação<sup>64</sup>. As suas nanopartículas são auto – organizadas em camadas e quando conjugadas com outras nanopartículas na forma núcleo – coroa, conseguem modificar algumas propriedades, por exemplo, observa-se alterações nas propriedades luminescentes do  $\text{CdS}@\text{Ag}_2\text{S}$  devido à presença do  $\text{Ag}_2\text{S}$ <sup>65</sup>. Além destas propriedades, as nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  tem um forte potencial para a fotovisualização e fotodegradação na região do IV<sup>66</sup> e quando depositadas nos poros de eléctrodos, como o  $\text{TiO}_2$ , podem causar mudanças na fotossensibilidade do substrato perto da região IV<sup>67</sup>.

As nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  são utilizadas em fotossensibilizadores para processos fotográficos<sup>67</sup>, em nanodispositivos químicos, ópticos, magnéticos e electrónicos, tais como células fotovoltaicas, fotocondutores, detectores de IV, condutores superiônicos, entre outros<sup>59,61,68</sup>.

### 1.4 Efeitos antimicrobianos da prata

Entre os muitos nanomateriais promissores com propriedades antimicrobianas, as nanopartículas metálicas destacam-se devido à sua elevada actividade química (elevada área superficial e estrutura superficial cristalina)<sup>69</sup>. Esta classe de nanopartículas está intrinsicamente ligada ao desenvolvimento de novos dispositivos, utilizados em inúmeras aplicações físicas, biológicas, biomédicas e farmacêuticas<sup>70</sup>.

A resistência de microrganismos a antibióticos tem crescido nos últimos anos, daí a preparação de drogas uniformes à escala nanométrica com exigências específicas como o tamanho, forma e propriedades químicas e físicas seja de grande interesse para as indústrias farmacêuticas. Outro motivo para o desenvolvimento de novos materiais antimicrobianos mais seguros e baratos é o facto de a maior parte dos agentes antimicrobianos utilizados serem extremamente tóxicos e irritantes para o ser humano<sup>70</sup>. Estudos anteriores mostraram que nanopartículas metálicas exibem actividade antimicrobiana, podendo ser usadas como bactericidas e fungicidas. Recentemente, Klabunde e colaboradores demonstraram que nanopartículas de óxidos metálicos,

altamente reactivos, exibem uma excelente acção antimicrobiana contra bactérias, tanto gram positivas como gram negativas<sup>70</sup>.

Com o passar dos anos, as nanopartículas metálicas, como a prata, tornaram-se úteis no desenvolvimento de vias de administração oral, pulmonar, dérmica, entre outras, como veículo de transporte de drogas, aumentando a biodisponibilidade da droga e a protecção da bioestabilidade e bioactividade da mesma. Como exemplo podem-se referir nanopartículas de prata usadas para otimizar a administração oral, melhorando a biodisponibilidade das drogas que são pouco absorvidas<sup>71</sup>. Estas nanopartículas são capazes de penetrar nas células para, por exemplo, permear os tecidos, permitindo que as drogas sejam entregues com eficiência nos tecidos alvo sem encherem os tubos capilares<sup>71</sup>.

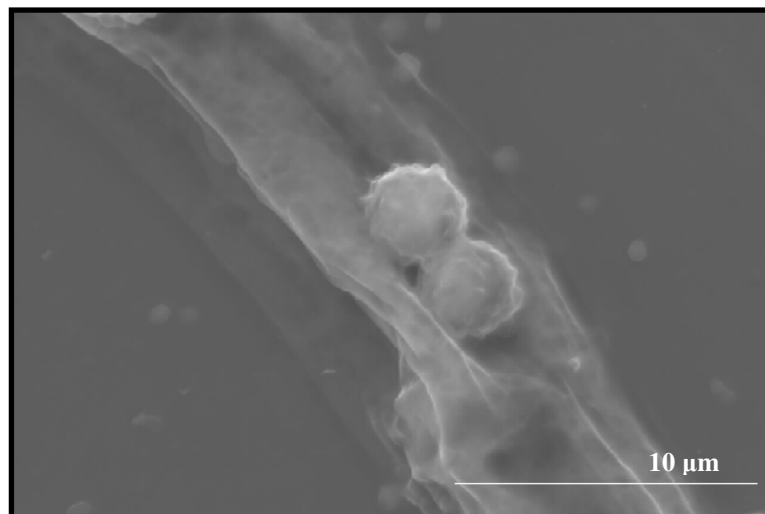
A prata metálica, a prata iónica e compósitos à base de prata têm sido extensivamente estudados e explorados devido às suas propriedades medicinais em vários produtos, tais como filtros antimicrobianos, materiais para revestimento de feridas, desinfecção de águas, biossensores, filtração química, gasosa e do ar, em tecidos protectores, etc.<sup>72</sup> Como a prata é um metal não tóxico ao ser humano, tem ganho uma boa reputação como agente antimicrobiano, sendo considerada por muitos, o elemento mais tóxico para os microrganismos na seguinte sequência: Ag > Hg > Cu > Cd > Cr > Pb > Co > Au > Zn > Fe > Mn > Mo > Sn<sup>72</sup>.

Gibbard foi o primeiro investigador a estudar sistematicamente a actividade antimicrobiana da prata. Ele descobriu que se a prata for limpa com materiais abrasivos cobertos de tecido ou papel, esta se torna inactiva e se for fundida e solidificada em atmosfera de hidrogénio, nenhuma actividade é encontrada<sup>73,74</sup>. Contudo a solidificação da prata fundida ao ar exhibe actividade antimicrobiana<sup>72</sup>. Foram obtidos resultados similares quando a prata metálica foi tratada com ácido nítrico, onde houve dissolução da prata metálica e formação de uma camada superficial oxidada<sup>72</sup>.

Hoje em dia, muitos sais de prata são utilizados na área da medicina, tais como a sulfadiazina de prata (I) (tratamento de queimaduras) e nitrato de prata (I) (oftalmologia neonatal)<sup>72</sup>. As nanopartículas de prata também são utilizadas a nível clínico na forma de catalisadores, agentes bactericidas e fungicidas<sup>73</sup>, contudo pouco tem sido descrito no uso de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S como agente antimicrobiano.

### 1.4.1 Efeito antifúngico

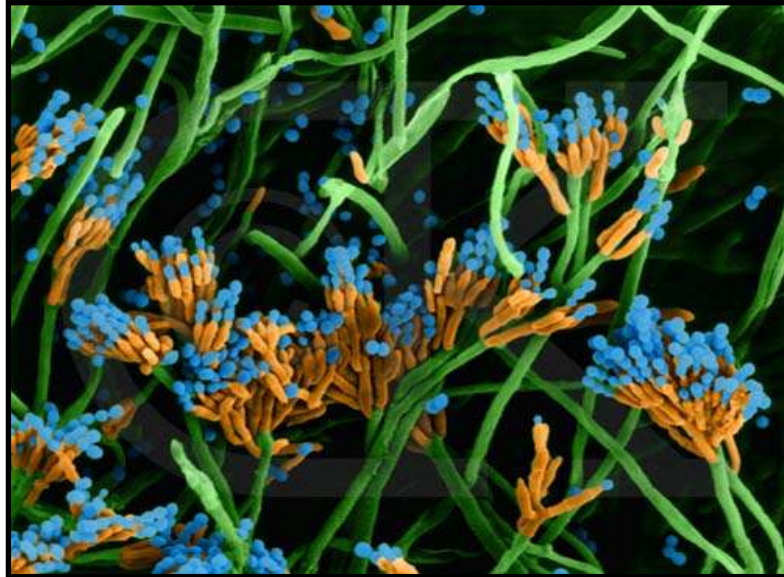
É muito difícil definir os fungos tal é a sua diversidade, no entanto, estes possuem algumas características em comum que os distinguem dos outros seres vivos. Os fungos apresentam filamentos, as chamadas hifas, com paredes rijas, ricas em quitina, o mesmo material que reveste insectos como o besouro; são heterotróficos, isto é, não possuem clorofila e, portanto, alimentam-se de matéria orgânica, sendo a sua alimentação feita pela absorção de nutrientes graças à presença de enzimas (por eles produzidas) que degradam produtos tais como celulose e amido<sup>75</sup>. Por outro lado, os fungos são eucarióticos, ou seja, possuem um núcleo típico no interior das suas células, comparável ao das plantas e animais. Reproduzem-se por via sexuada ou assexuada, essencialmente através da produção de esporos<sup>75</sup>(figura 1.9).



**Figura 1.9** Imagem de SEM da estrutura do *Aspergillus niger*: hifa com dois corpos esféricos que são os esporos.

Os fungos podem ser unicelulares ou pluricelulares e são divididos em dois grandes grupos: bolores e leveduras. Os bolores (classe em estudo) são fungos pluricelulares que apresentam células filamentosas. A estes filamentos dá-se o nome de hifa e ao conjunto de

hifas é chamado de micélio. (Figura 1.10)<sup>76</sup>. As leveduras são fungos unicelulares que apresentam células ovais, esféricas e cilíndricas.



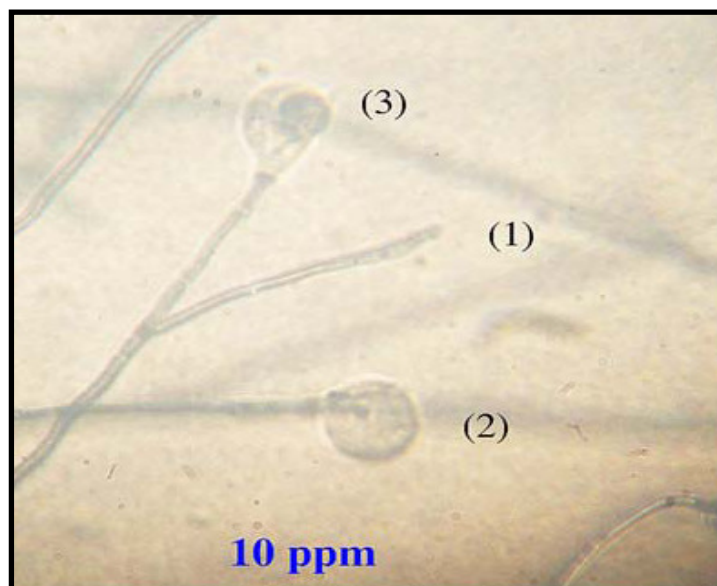
**Figura 1.10** Imagem de SEM (cores adicionadas) de um micélio com as hifas (verde), esporângio (laranja) e esporos (azul) do *Penicillium* sp. (aumento de 1560 x)<sup>76</sup>.

O reino fungi é um dos reinos mais numerosos. Estima-se que existam, pelo menos, um milhão e quinhentas mil espécies de fungos. No entanto, actualmente, apenas cerca de setenta mil espécies de fungos foram então identificadas, ou seja, menos de 5% das possíveis existentes. Se dentro deste 5 %, já existem tantas espécies de grande importância, como as que se utilizam no fabrico de alimentos, incluindo bebidas, ácidos orgânicos, fármacos e inúmeros outros produtos, a descoberta de novas espécies com propriedades biotecnológicas distintas pode ainda aumentar o interesse do estudo deste grupo de microrganismos<sup>77</sup>. Por outro lado, alguns destes fungos são prejudiciais para o homem, podendo provocar doenças, por exemplo, micoses. Os alimentos, em especial, estão muito implicados na transmissão destes microrganismos para o homem.

Os bolores produzem micotóxicas (substâncias tóxicas), consoante o tipo de fungo, quando em contacto com os alimentos. Fungos como o *Aspergillus* podem-se encontrar em

alimentos como o milho, amendoim, cevada, café e vinho, onde produzem toxinas como a aflotoxina B1 e ocratoxina, consoante a sua subespécie. Fungos como o *Penicillium* encontram-se no trigo, aveia, cevada, milho, arroz, frutas e polpas de frutas. O consumo de alimentos com toxinas pode provocar efeitos crónicos, como cancro, lesões no fígado e dos rins e depressões no sistema imune, de difícil associação com o consumo de alimentos contaminados<sup>78</sup>.

O efeito antifúngico da prata encontra-se pouco descrito, mas nos poucos trabalhos existentes, é referida como tendo um forte efeito na destruição de infecções fúngicas como por exemplo em *Candidiases* (fungo)<sup>72</sup>. No início dos anos 70, muitos investigadores descobriram que a prata iónica facilmente destrói a *Candidiases* e outros fungos como o *Aspergillus niger*<sup>79</sup>. Em 1992, Simonetti reconfirmou esses estudos<sup>79</sup>, onde sugeriu que a interacção electrostática entre a carga negativa das células dos fungos e a carga positiva dos iões de  $\text{Ag}^+$  é crucial para a inibição do crescimento dos fungos<sup>72</sup> (Figura 1.11).

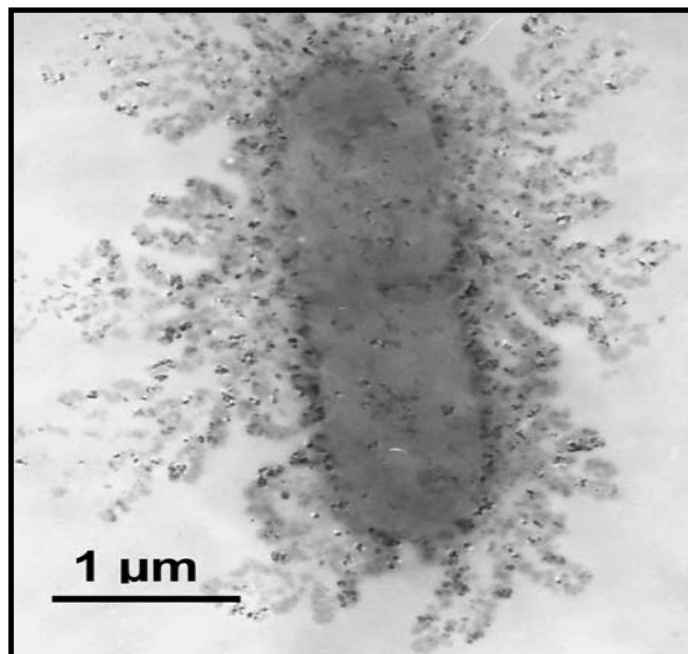


**Figura 1.11** Imagem ao microscópio óptico das células do fungo *Botrytis cinerea* onde: 1) célula com crescimento normal, provavelmente não esteve em contacto com as nanopartículas de  $\text{SiO}_2/\text{Ag}$ ; 2) célula estendida devido á estimulação das nanopartículas de  $\text{SiO}_2/\text{Ag}$ ; 3) célula rebentada devido á estimulação forte das nanopartículas de  $\text{SiO}_2/\text{Ag}$ <sup>74</sup>.

### 1.4.2 Efeito antibacteriano

As bactérias em relação à composição da parede celular podem ser divididas em dois grupos: as gram negativas e as gram positivas<sup>69</sup>. As bactérias gram negativas apresentam uma camada fina de mureína (peptidoglicano) com cerca de 2 a 3 nm de espessura e uma membrana externa formada por lipopolissacarídeos. As bactérias gram positivas apresentam uma camada espessa e entrelaçada de mureína com cerca de 30 nm<sup>69</sup>.

A prata (na forma elementar  $\text{Ag}^0$  e monovalente  $\text{Ag}^+$ ) é conhecida pelas suas extraordinárias propriedades antibacterianas e inibitórias desde os tempos ancestrais<sup>80,81</sup>. Hoje em dia sabe-se que, tanto nanopartículas de prata como nanocompósitos de prata têm uma elevada toxicidade para microrganismos, mostrando um forte efeito antibacteriano em pelo menos 16 espécies diferentes de bactérias incluindo a *Escherichia coli*<sup>70</sup> (Figura 1.12). Além disso, íons prata têm sido usados como componente antibacteriano, na preparação de compostos de resina dental e fibras de troca de íons e no revestimento de dispositivos médicos<sup>70</sup>. Contudo, actualmente, o mecanismo antibacteriano é só parcialmente entendido.



**Figura 1.12** Imagem de TEM de uma célula da bactéria *E – coli* tratada com nanopartículas de prata ( $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) durante 1 hora<sup>70</sup>.

Foi proposto que a prata iónica ( $\text{Ag}^+$ ) interacciona fortemente com os grupos doadores de electrões que tenham enxofre, oxigénio ou azoto em enzimas vitais (ex. respiratórias) e inactiva-as<sup>69</sup>. Este ataque nas enzimas respiratórias leva a uma alteração na permeabilidade da membrana, causando, por isso, alterações nas membranas celulares incluindo o rompimento e saída do plasma pela parede celular<sup>82</sup>. Evidências experimentais sugerem também que o ADN perde a sua capacidade de se replicar assim que a bactéria entra em contacto com iões prata<sup>69</sup>.

## 1.5 Introdução aos testes estatísticos

### 1.5.1 Testes de hipóteses

Os testes de hipóteses consistem numa técnica estatística utilizada na determinação da aproximação de uma amostra a uma função de distribuição, ou seja, verifica se os dados amostrais (ou estimativas a partir deles) são ou não compatíveis com determinadas populações ou com valores previamente propostos para os parâmetros populacionais<sup>83</sup>.

Uma hipótese pode ser definida como um pressuposto sobre uma ou mais populações. Num teste de hipóteses há que definir duas hipóteses, a hipótese do nulo ( $H_0$ ) e a hipótese alternativa ( $H_1$ ). A hipótese alternativa está associada ao pressuposto que se pretende verificar se é válido no contexto do problema em análise. A hipótese do nulo é a hipótese complementar de  $H_1$ , por isso é considerada verdadeira ao longo do teste até ao momento em que haja evidências estatísticas a apontar no sentido contrário. Portanto, quando se rejeita  $H_0$ , aceita-se  $H_1$  como válida uma vez que se admite que as hipóteses são complementares<sup>84</sup>.

Um teste de hipóteses envolve sempre duas hipóteses alternativas

$$H_0 \cap H_1 = \emptyset \quad (1.1)$$

O objectivo dos testes de hipóteses é determinar qual das hipóteses é a correcta. Assim, o resultado do teste corresponderá a uma de duas respostas possíveis: “não significativamente diferentes” ou “significativamente diferentes”. Devido ao facto de, em qualquer um dos casos, ter-se o risco de errar, umas das características deste tipo de testes é precisamente o de controlar ou minimizar esse risco<sup>83</sup>.

O procedimento básico de um teste de hipóteses é composto por 5 fases: i) enunciar as hipóteses  $H_0$  e  $H_1$ ; ii) determinar o nível de confiança e identificar a estimativa do teste; iii) determinar a região crítica (grupo de valores que levam à rejeição da hipótese do nulo) e a região de aceitação em função do nível de confiança escolhido pelas tabelas estatísticas apropriadas; iv) calcular o valor da estimativa do teste; v) e por ultimo, concluir, se a estatística do teste pertencer à região crítica então rejeita-se  $H_0$ , caso contrário não se rejeita  $H_0$ <sup>85</sup>.

A estratégia básica utilizada por este método consiste na tentativa de suportar a validade de  $H_1$ , uma vez provada a improbabilidade de  $H_0$ , isto é, conseguir mostrar, com elevada probabilidade, que a hipótese do nulo é falsa, ficando assim confirmada a validade da hipótese alternativa. Se não for possível rejeitar  $H_0$ , a hipótese  $H_1$  não será reforçada pelo teste<sup>84</sup>.

É de salientar que  $H_1$  contém sempre uma desigualdade ou não – igualdade ( $>$ ;  $<$ ;  $\neq$ ). Assim, quando a  $H_1$  tiver uma desigualdade ( $>$  ou  $<$ ), o teste diz-se unilateral (à direita para o sinal  $>$  e à esquerda para o sinal  $<$ ); quando  $H_1$  envolver não – igualdade ( $\neq$ ), o teste é bilateral. O contrário se aplica a  $H_0$ , mesmo quando na  $H_0$  faz mais sentido figurar o sinal  $\geq$  ou  $\leq$ , o teste é realizado considerando apenas a situação em que  $H_0$  se aproxima mais de  $H_1$ , ou seja contém sempre uma igualdade<sup>84</sup>.

O nível de confiança do teste corresponde à probabilidade  $\alpha$  de, no caso de  $H_0$  ser verdadeiro, a estimativa do teste pertencer à região da rejeição. As figuras 1.13 e 1.14 apresentam a região da rejeição da hipótese do nulo quando se realiza um teste unilateral e um teste bilateral. O nível de confiança representa a probabilidade (ou risco) de se incorrer o erro de rejeitar  $H_0$  quando esta hipótese é de facto verdadeira, erro esse designado por erro do tipo I. Os valores mais frequentes para o nível de confiança são  $\alpha = 0.05$  (5%) e  $\alpha = 0.01$  (1%), embora se possa atribuir a  $\alpha$  qualquer valor entre 0 e 1<sup>83</sup>.



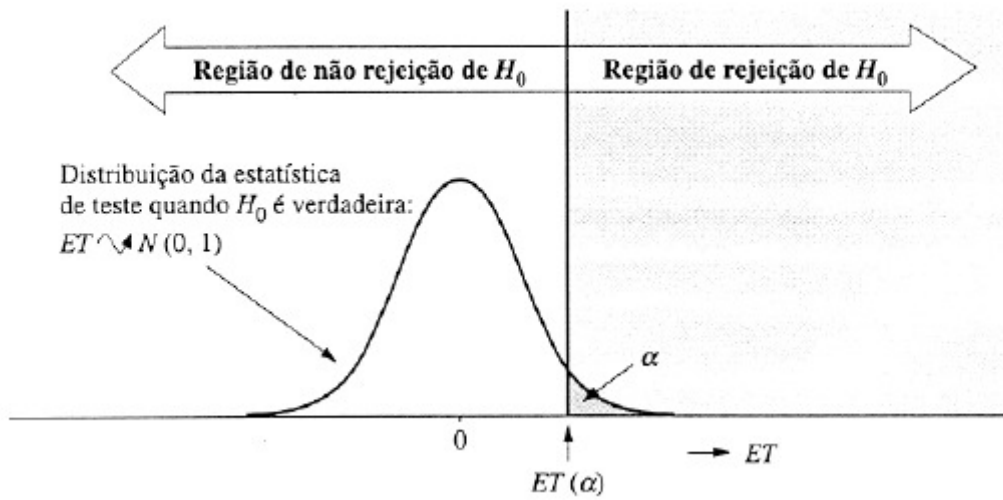


Figura 1.13 Região de rejeição de  $H_0$  para um teste unilateral para a direita<sup>84</sup>.

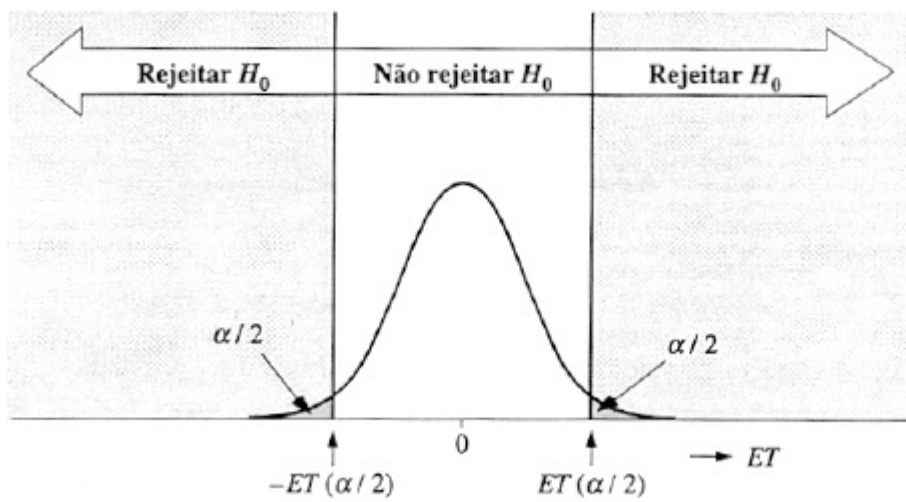


Figura 1.14 Região de rejeição de  $H_0$  quando se realiza um teste bilateral<sup>84</sup>.

Sempre que se realiza um teste de hipóteses pode-se cometer dois tipos de erros:

**- Erro do tipo I**

$$P(\text{cometer um erro do tipo I}) = P(\text{rejeitar } H_0 \parallel H_0 \text{ é verdadeira})$$

$$= \text{nível de confiança do teste} = \alpha$$

**- Erro do tipo II**

$$P(\text{cometer um erro do tipo II}) = P(\text{não rejeitar } H_0 \parallel H_0 \text{ é falsa})$$

$$= P(\text{não rejeitar } H_0 \parallel H_1 \text{ é verdadeira}) = \beta$$

A probabilidade de rejeitar  $H_0$  quando esta é falsa designa-se por potência do teste e é dada por  $1-\beta$ . A relação entre a variação do nível de confiança  $\alpha$  e a potência do teste  $\beta$  está representada na figura 1.15 e os diferentes resultados associados ao teste de hipóteses estão representados na tabela 1.2<sup>83</sup>.

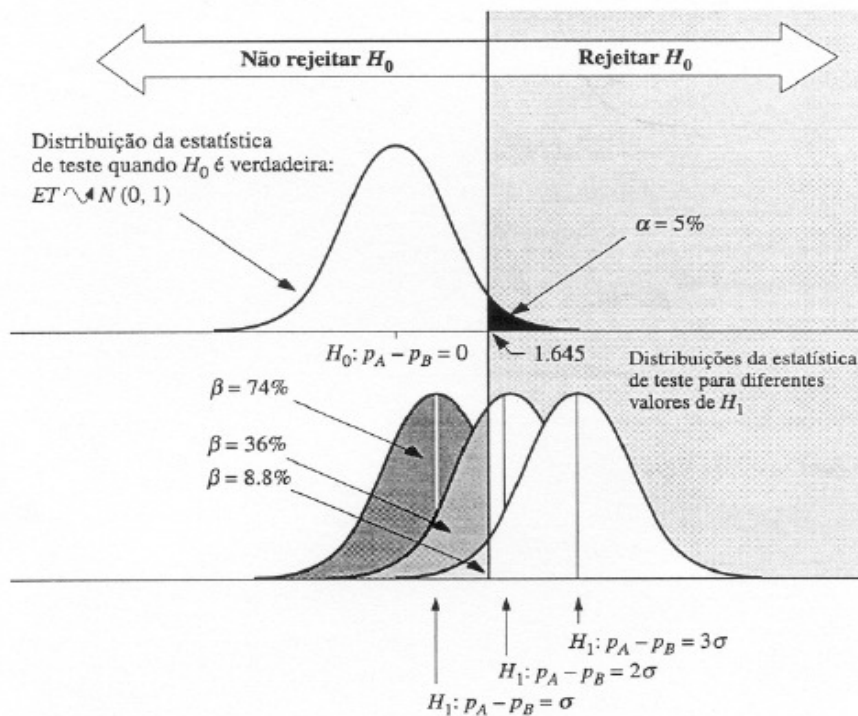


Figura 1.15 Relação entre a variação de  $\alpha$  e  $\beta$ <sup>84</sup>.

**Tabela 1.2** Diferentes resultados associados a um teste de hipóteses<sup>83</sup>

	<b>H<sub>0</sub> verdadeira</b>	<b>H<sub>0</sub> falsa</b>
<b>H<sub>0</sub> rejeitada</b>	Erro tipo I (Probabilidade $\alpha$ )	Decisão Correcta (Probabilidade $1-\beta$ )
<b>H<sub>0</sub> não rejeitada</b>	Decisão Correcta (Probabilidade $1-\alpha$ )	Erro tipo II (Probabilidade $\beta$ )

Embora existam vários testes de hipóteses, apenas se vão referenciar os testes utilizados nesta dissertação.

### 1.5.1.1 Comparação de variâncias

O teste F é utilizado para comparar variâncias, testando a hipótese de igualdade das variâncias a um determinado nível de confiança (equação 1.2).

$$F_{\text{calc}} = \frac{s_1^2 (\text{maior})}{s_2^2 (\text{menor})} \quad (1.2)$$

O  $F_{\text{calc}}$  na equação 1.2 é comparado com o  $F_{\text{tab}}$  em tabelas próprias para  $n_1-1$  e  $n_2-1$  graus de liberdade. Se  $F_{\text{calc}}$  for maior que  $F_{\text{tab}}$  num determinado nível de confiança, as variâncias são significativamente diferentes.

### 1.5.1.2 Comparação de médias quando $n \geq 30$

O teste Z tanto pode ser utilizado para o estudo de uma média populacional como para duas médias populacionais com a condição do tamanho da amostra ser igual ou superior a 30. Neste teste assume-se sempre que a variável em estudo tem uma distribuição normal com variâncias populacionais conhecidas<sup>86</sup>.

### Comparação de um resultado médio com um valor “conhecido”

A estimativa do teste Z baseia-se na média amostral  $\bar{x}$ , demonstrando que a média amostral tem uma distribuição aproximadamente normal com média  $\mu$ , variância  $\sigma$  e  $n$  o tamanho da amostra (equação 1.3).

$$Z_{\text{cal}} = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\sigma / \sqrt{n}} \quad (1.3)$$

O valor tabelado de Z pode ser obtido em tabelas apropriadas de acordo com o nível de confiança determinado. Assim, quando  $Z_{\text{cal}}$  é maior que  $Z_{\text{tab}}$ , rejeita-se  $H_0$ ; caso contrário, não se rejeita  $H_0$ <sup>86</sup>.

### Comparação de duas médias

Este teste baseia-se nas médias amostrais  $\bar{X}_1$  e  $\bar{X}_2$ , sendo condicionado pelos valores das variâncias  $\sigma_1$  e  $\sigma_2$ . Desta condição resulta duas equações diferentes para o cálculo do Z de duas médias (equações 1.4 e 1.5)<sup>86</sup>.

- se  $\sigma_1 \neq \sigma_2$

$$Z_{\text{calc}} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{(\sigma_1^2/n_1) + (\sigma_2^2/n_2)}} \quad (1.4)$$

- se  $\sigma_1 = \sigma_2$

$$Z_{\text{calc}} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sigma \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}} \quad (1.5)$$

### 1.5.1.3 Comparação de médias quando $n < 30$

“*Student*” é o pseudônimo de W. S. Gosset que, em 1908, propôs a distribuição t. Esta distribuição é muito parecida com a distribuição normal, sendo centrada no zero com formato de sino. A curva não é tão alta quanto a curva da distribuição normal, mas as suas caudas são. O parâmetro que determina a altura e a largura da distribuição t depende do tamanho da amostra ( $n < 30$ ) e é denominado graus de liberdade (GL), denotado com a letra grega  $\nu$ <sup>87</sup>.

#### Comparação de um resultado médio com um valor “conhecido”

Este teste não descreve o que acontece na natureza mas sim o que aconteceria se se seleccionasse milhares de amostras aleatórias de uma população normal com média  $\mu$  e se calculasse o t para cada amostra (equação 1.6). A fórmula 1.6 é escrita com valores absolutos para que o  $t_{\text{calc}}$  seja sempre positivo<sup>87</sup>.

$$t_{\text{calc}} = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s/\sqrt{n}} \quad (1.6)$$

Com o nível de confiança determinado, a hipótese alternativa definida e os graus de liberdade calculados ( $GL = n-1$ ), o valor tabelado de t é obtido em tabelas apropriadas, sendo a regra de decisão: se  $t_{\text{calc}}$  for maior que  $t_{\text{tab}}$ , rejeita-se a hipótese do nulo, caso contrário, não se rejeita  $H_0$ <sup>87</sup>.

#### Comparação de duas médias

O teste t pode ser utilizado para decidir se 2 grupos de medidas repetidas fornecem resultados não significativamente diferentes ou significativamente diferentes, dentro de um determinado nível de confiança<sup>88</sup>. O teste t baseia-se nas médias amostrais  $\bar{X}_1$  e  $\bar{X}_2$ ,

sendo condicionado pelos valores das variâncias  $s_1^2$  e  $s_2^2$ . Desta condição resulta duas equações diferentes para o cálculo do t de duas médias (equações 1.7 e 1.9)<sup>86</sup>

- se  $s_1^2 = s_2^2$

$$t_{\text{calc}} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{s \cdot \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}} \quad (1.7)$$

$$s^2 = \frac{s_1^2 \cdot (n_1 - 1) + s_2^2 \cdot (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2} \quad (1.8)$$

Aqui s é um desvio padrão “agrupado” no qual é calculado com os dois desvios padrão dos dois grupos em estudo. O tcalc da equação 1.12 é comparado com o t tabelado em tabelas próprias para  $n_1 + n_2 - 2$  graus de liberdade.

- se  $s_1^2 \neq s_2^2$

$$t_{\text{calc}} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{(s_1^2/n_1) + (s_2^2/n_2)}} \quad (1.9)$$

$$\text{Graus de liberdade} = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2 (n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2 (n_2 - 1)}} \quad (1.10)$$

### 1.5.2 Propagação de erros

Qualquer cálculo matemático com números incertos dará resultados incertos, sendo necessário estimar o erro dos resultados a partir dos erros dos números envolvidos na operação (lei da propagação dos erros)<sup>89</sup>.

Seja  $F$  uma função (geralmente não linear) de  $n$  variáveis aleatórias  $X_j$  cujas variâncias  $\sigma_j^2$  são conhecidas<sup>83,89</sup>:

$$F = \varphi(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n) \quad (1.11)$$

Para linearizar a função, desenvolve-se uma relação funcional conforme o teorema de Taylor e obtém-se o diferencial total por redução da primeira derivada. Para isso deriva-se parcialmente a função  $\varphi$ , em relação à variável  $X_j$  das variâncias  $\sigma_j^2 \neq 0$  (equação 1.12)<sup>89</sup>. Se a variância  $\sigma_j^2$  do valor  $X_j$  for igual a zero, então não existe qualquer comportamento de dispersão e é tomado como um valor constante, ou seja, a sua derivação é zero.

$$dy = \frac{\partial \varphi}{\partial X_1} dX_1 + \frac{\partial \varphi}{\partial X_2} dX_2 + \frac{\partial \varphi}{\partial X_3} dX_3 + \dots + \frac{\partial \varphi}{\partial X_n} dX_n \quad (1.12)$$

Substituindo o diferencial  $dX_j$  pelo desvio padrão  $\sigma_j$  e elevando a equação ao quadrado, obtém-se um resultado a partir da lei de propagação das covariâncias, denominada lei geral de propagação dos erros (equação 1.13)<sup>89</sup>.

$$\sigma_y^2 = \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x_1}\right)^2 \sigma_1^2 + \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x_2}\right)^2 \sigma_2^2 + \dots + \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x_n}\right)^2 \sigma_n^2 + 2 \left( \frac{\partial \varphi}{\partial x_1} \cdot \frac{\partial \varphi}{\partial x_2} \cdot \sigma_{12} + \frac{\partial \varphi}{\partial x_1} \cdot \frac{\partial \varphi}{\partial x_3} \cdot \sigma_{13} + \dots + \frac{\partial \varphi}{\partial x_{n-1}} \cdot \frac{\partial \varphi}{\partial x_n} \cdot \sigma_{n-1,n} \right) \quad (1.13)$$

Nesta equação, os valores de  $\sigma_{12}, \sigma_{13}, \sigma_{14}, \dots$  representam as covariâncias entre as variáveis mutuamente dependentes  $X_j$ . Para as variâncias dependentes  $X_j$ , a covariância é nula, por isso a soma do produto total desaparece e surge a soma dos quadrados individuais da lei de propagação das variâncias para as variáveis mutuamente dependentes  $X_j$ , denominada lei de propagação dos erros simplificada (equação 1.14)<sup>89</sup>.

$$\sigma_y^2 = \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x_1}\right)^2 \cdot \sigma_1^2 + \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x_2}\right)^2 \cdot \sigma_2^2 + \dots + \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x_n}\right)^2 \cdot \sigma_n^2 = \sum_{j=1}^n \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x_j}\right)^2 \cdot \sigma_j^2 \quad (1.14)$$

Caso as variâncias,  $\sigma_j^2$ , sejam desconhecidas, os valores estimados,  $s_j^2$ , podem ser substituídos na expressão geral (equação 1.15)<sup>89</sup>:

$$s_y^2 = \sum_{j=1}^n \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x_j}\right)^2 \cdot s_j^2 \quad (1.15)$$

## 1.6 Contexto e Objectivos

Apesar de se registar um interesse crescente no efeito antimicrobiano da prata metálica e iónica, são poucos os estudos que se referem à sua utilização na inactivação fúngica. No trabalho aqui apresentado foram desenvolvidos materiais nanocompósitos contendo prata (I) de matriz inorgânica (SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) que foram testados como agentes antifúngicos na inactivação de dois fungos que frequentemente contaminam alimentos com a produção de toxinas (*Penicillium sp* e *Aspergillus niger*).

Nesta dissertação procurar-se-á investigar em particular a actividade antifúngica do Ag<sub>2</sub>S variando vários parâmetros, tais como o tamanho das partículas das matrizes inorgânicas (SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>), o tempo de exposição dos nanocompósitos aos fungos e o tipo de Ag<sub>2</sub>S



utilizado (diferentes métodos de preparação). Testou-se ainda, a actividade antifúngica da prata metálica e comparou-se com a actividade antifúngica do Ag<sub>2</sub>S. Estes estudos envolvem ainda uma componente de análise estatística dos estudos experimentais.

Os resultados aqui apresentados possibilitarão estudar de uma forma sistemática a aplicação do Ag<sub>2</sub>S como agente antifúngico (sozinho ou em matrizes inorgânicas). Permitirão ainda evidenciar a importância destes nanocompósitos (SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) em aplicações futuras, tais como em fibras de celulose, com interesse no fabrico de papel para protecção alimentar.

### 1.7 Referências

- 
- <sup>1</sup> Carrara, S.; *Nanostrutture Organiche:le Nanoparticelle*, Corso di NanoBioTecnologie.
  - <sup>2</sup> [www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia](http://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia) (12-07-07).
  - <sup>3</sup> Fateixa S., *Acção fungicida das nanopartículas de prata*, Seminário de Mestrado em Química Analítica e Controlo de Qualidade, Universidade de Aveiro, **2007**.
  - <sup>4</sup> Nanotecnologias – Modelo SENAL de prospecção; **2004** n°2.
  - <sup>5</sup> Alencar, S. *Uma Introdução à Nanotecnologia*, **2006**.
  - <sup>6</sup> Costerton J. W.; Stewart P. S.; Greenberg E. P.; *Science*, **1999**, 284, 1318.
  - <sup>7</sup> [www.eq.ufrj.br](http://www.eq.ufrj.br) (12-07-07).
  - <sup>8</sup> Monteiro O. C., Trindade T., *Boletim SPQ*, **2002**, 84, 49.
  - <sup>9</sup> Mulvarey P.; *MRS Bulletin*, **2001**, 12, 1009.
  - <sup>10</sup> Faraday, *Philos. Trans. R. Soc.*, **1857**, 147, 145.
  - <sup>11</sup> O'Regan B.; Grätzel M., *Nature*, **1991**, 353, 737.
  - <sup>12</sup> Liw; Osora H.; Oterol L.; Duncan D. C.; Fox M. A., *J. Phys. Chem. A*, **1998**, 102, 5333.
  - <sup>13</sup> Bedja I.; Kawat P. V.; Lapin A. G.; Hotchandani S., *Langmuir*, **1997**, 13, 2398.
  - <sup>14</sup> Kavan L.; Kratochvilova K.; ; Grätzel M., *J. Electroanal – Chem.*, **1995**, 394, 93.
  - <sup>15</sup> Hagteldt A.; ; Grätzel M., *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 49.
  - <sup>16</sup> Weller D.; Moser A., *IEEE Trans. Magn.*, **1999**, 35, 4423.
  - <sup>17</sup> Wei C.; Grouquist D.; Roark J., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2002**, 2, 47 and Calvin V. L.; Schlamp M. C.; Alivisatos A. P., *Nature*, **1954**, 370, 354.

- 
- <sup>18</sup> Feldmann C., *Adv. Mater*, **2001**, 17, 1301.
- <sup>19</sup> Wikipédia – A enciclopédia viva (18-06-07).
- <sup>20</sup> <http://nautilus.fis.uc.pt> (19 – 06 - 07).
- <sup>21</sup> <http://qmc.ufsc.br/~franco/ctsaude/ctsaude.htm> (19-07-07).
- <sup>22</sup> Brust M., Kiely C. J., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2002**, 202, 175.
- <sup>23</sup> Poole C. P. Jr, Owens F. J., *Wiley – Interscience*, **2003**
- <sup>24</sup> Liz – Marzan L. M. *Materials Today*, **2004**, 2, 26.
- <sup>25</sup> Zanchet D., Hall B. D., Ugante D., *J. Phys. Chem B*, **2000**, 104, 11013.
- <sup>26</sup> Ozin G. A., *Advanced Materials*, **1992**, 4, 612.
- <sup>27</sup> Zarbin A. J. G., *Novos nanocompósitos obtidos pelas interações de compostos organometálicos e polímeros condutores com vidros porosos*, Tese de Douturamento, IQ – Unicamp, **1997**.
- <sup>28</sup> Faraday M., *Philos. Trans. R. Soc Lond.*, **1857**, 145.
- <sup>29</sup> Brust M., Walker M., Bethell D., Schiffrin D. J., Whyman R., *Chem Commun*, **1994**, 801.
- <sup>30</sup> Toshima N., Yonezama T., Kushihashi K., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **2005**, 89, 489.
- <sup>31</sup> Liz – Marzan N., Philipse A. P., *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 15120.
- <sup>32</sup> Rivas L., Sanchez - Cortes S., Garcia – Ramos J. V., Morcillo G., *Langmuir*, **2001**, 17, 574.
- <sup>33</sup> Pyaterko A., Yamaguchi M., Suzuki M., *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 21608.
- <sup>34</sup> Cusshing B. L., Kolesnichenko V. L., O’Connor C. J., *Chem Rev*, **2004**, 104, 3893.
- <sup>35</sup> Yonezawa T., Onane S., Kiwizuka N., *Langmuir*, **2000**, 12, 2412.
- <sup>36</sup> Pastoriza – Santos I., Liz – Marzán L. M., *Langmuir*, **1999**, 15, 948.
- <sup>37</sup> Esumi K., Tano T., Torigae K., Meguro K., *Chem Mater*, **1990**, 5, 264.
- <sup>38</sup> Kim D., Jeong S., Moon J., *Nanotechnology*, **2006**, 17, 4019.
- <sup>39</sup> Chen Z., Gao L., *Materials Research Bulletin*, **2007**, 42, 1657.
- <sup>40</sup> Egorova E. M., Revina A. A., *Colloids Surf A*, **2000**, 168, 87
- <sup>41</sup> Mafure F., Kohnok J. K., Takeda Y., Kondow T., *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 8333
- <sup>42</sup> Huang H. H., Ni X. P., Lay G. L., Chew C. H., Tan K. L., Loh F. C., Deng J. F., Xu G. Q., *Langmuir*, **1996**, 12, 109.

- 
- <sup>43</sup> Sang – Wook K., Jonguam P., youngjin J., Yunhee C., Sujin H., taeghwan H., *Nano Letters*, **2003**, 3 1289.
- <sup>44</sup> Balon L., Malval J. P., Schneider R., Burget D., *Mat. Chem. Phy*, **2007**, 104, 417.
- <sup>45</sup> Zhou Y., Hao L., Hu Y., Zhu Y., Chen Z., *Chem. Lett.*, **2001**, 1192.
- <sup>46</sup> Jin R., Cão Y., Mirkin C. A., Kelly K. L., Schotz G. L., Zhang J. G., *Science*, **2004**, 294, 1901.
- <sup>47</sup> Xiong X., Xie Y., Du G., Tian X., *Chem. Lett.*, **2002**, 98.
- <sup>48</sup> Pastoriza – Santos I., Iiz – Marzan L. M., *Langmuir*, **2002**, 18, 2888.
- <sup>49</sup> Tang D., Yuan R., Chain Y., *Wiley Interscience*, **2006**.
- <sup>50</sup> Yang, X.; Lu, X.; *Materials Letters*, **2005**, 59, 2484.
- <sup>51</sup> Hughey J., *Research Accomplishments*, **2005**.
- <sup>52</sup> Kalele, S. A.; Ashtaputre, S. S.; Hebalkar, N. Y.; Gosav, S. W.; Deobagkar, D. N.; *Chem. Phys. Lett.*, **2005**, 404, 136.
- <sup>53</sup> Pho K. H., Park J. E., Osaka T., Park S. G., *Electrochimica*, **2005**, 51, 956.
- <sup>54</sup> He R., Qian X., Yin J., Zhu Z., *Chem. Phys. Lett*, **2003**, 349, 454.
- <sup>55</sup> Sondi I., Goia D. V., Matijevic' E., *Colloid and Interface Science*, **2003**, 260, 75.
- <sup>56</sup> Bunge S. D., Boyle T. J., Headley T. J., *Nano Letters*, **2003**, 3, 901.
- <sup>57</sup> www.mindat.org (26 – 06 – 07).
- <sup>58</sup> Wang X., Liu W., Hao J., Fu X., xu B., *Chem. Lett.*, **2005**, 34, 1664.
- <sup>59</sup> Martinez – Gastañón, G. A.; sanchez – Loredó, M. G.; Dorantes H. J.; Martinez – Mendoza, J. R.; Ortega – Zarzosa G.; *Materials Letters*, **2005**, 59, 529.
- <sup>60</sup> Hota G., Jain S., Khilar K. C., *Colloids and Surface A*, **2004**, 232, 119.
- <sup>61</sup> Gao F., Lu Q., Zhao D., *Nano Letters*, **2003**, 3, 85.
- <sup>62</sup> Wada Y., Kareko M., Niiro D., Tsukahara Y., *Chemistry Letters*, **2005**, 34, 1618.
- <sup>63</sup> Foglia S., Suber L., Righin M., *Colloids and Surface A*, **2001**, 177, 3.
- <sup>64</sup> Armelao L., Colombo P., Fabrizio M., Gross S., Tondello E., *Journal of Materials Chemistry*, **1999**, 9, 2893.
- <sup>65</sup> Kryukov, A. I.; Zin'chuk, N. N.; Korzh, Y.; *Theoretical and Experimental Chemistry*, **2001**, 37, 296.
- <sup>66</sup> Lu, Q.; Gao, F.; Zhao, D.; *Nanotechnology*, **2002**, 13, 741.
- <sup>67</sup> Shuklas S., seal S., *Journal of Sol – Gel Science and Technology*, **2002**, 23, 151.
- <sup>68</sup> Pan H., tǎo X., Mão C., Zhu J. J., liang F., *Talanta*, **2007**, 71, 276.

- 
- <sup>69</sup> Morones J. T., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez J. T., Yacamán M. J., *Nanotechnology*, **2005**, 16, 2346.
- <sup>70</sup> Sondi I., Salopek – Sondi B., *Colloid and Interface Science*, **2004**, 275, 177.
- <sup>71</sup> Selvaraj V., Alagar M., Hamerton I., *Electrochimica*. **2006**, 52, 1152.
- <sup>72</sup> Lala N. L., Rawaseshan R., bojun L., Sundarrajan S., barhate r. S., Ying – jun L., Rawakrishnas S., *Biotechnology and Bioengineering*, **2007**, 97, 1357.
- <sup>73</sup> Fan F. F; band A. J; *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 279.
- <sup>74</sup> Oh S., Lee S, Choi S., Lee I, Lee Y, Chun J., Park J., Park H., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2006**, 275, 228.
- <sup>75</sup> [www.brasilecola.com/biologia/fungi](http://www.brasilecola.com/biologia/fungi) (26 - 08 - 07).
- <sup>76</sup> [www.reinofungi.com.br](http://www.reinofungi.com.br) (02 – 08 - 07).
- <sup>77</sup> [www.Ufv.br/trab2002/MELHOR/MHR004](http://www.Ufv.br/trab2002/MELHOR/MHR004)(26 – 08 - 07).
- <sup>78</sup> Almeida, A.; *Fungos*, Universidade de Aveiro – Departamento de Biologia, **2007**.
- <sup>79</sup> [www.silvermedicine.org](http://www.silvermedicine.org) (02 – 08 – 07).
- <sup>80</sup> Lee D., Cohen R. E., Rubner M. F., *Langmuir*, **2005**, 21, 9651.
- <sup>81</sup> Jiang H., Manolache S., Wong A. C. L., denes F. S., *journal of Applied Polymer Science*, **2004**, 93, 1411.
- <sup>82</sup> Keleher J., Bashant J., Heldt N., Johnson L., Li Y., *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, **2002**, 18, 133.
- <sup>83</sup> Miller, J. N., Miller, J. C.; “*Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry*”, Prentice Hall
- <sup>84</sup> [www.fe.up.pt](http://www.fe.up.pt) (26-11-07)
- <sup>85</sup> [www.dpi.ufv.br](http://www.dpi.ufv.br) (26-11-07)
- <sup>86</sup> [www.dim.fm.usp.br](http://www.dim.fm.usp.br) (26-11-07)
- <sup>87</sup> [www.inf.ufsc.br](http://www.inf.ufsc.br) (26-11-07)
- <sup>88</sup> Harris, D. C., “*Análise Química Quantitativa*”, LTC EDITORA
- <sup>89</sup> [http://geodesia . ufsc.br/geodesia-online/arquivo/cobrac\\_2002/090/090.HTM](http://geodesia.ufsc.br/geodesia-online/arquivo/cobrac_2002/090/090.HTM) (04-12-07)

## *2 Capítulo*

### *Nanoestructuras de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S*

## 2.1 Introdução

Um nanocompósito é constituído por pelo menos dois materiais, em que pelo menos um deles está à escala nanométrica. Hoje em dia, existem vários métodos de preparação de nanocompósitos, em que as suas propriedades finais dependerão, em grande parte, da combinação dos componentes utilizados no processo de fabricação.

De entre os vários tipos de nanocompósitos existentes (orgânico – orgânico, inorgânico – orgânico e inorgânico – inorgânico), destacam-se neste capítulo os que são constituídos por nanopartículas inorgânicas e matrizes inorgânicas, e serão aqui referidos como nanocompósitos inorgânicos.

Hoje em dia, encontra-se descrita na literatura uma variedade de sínteses de nanocompósitos inorgânicos, como por exemplo, CdS/Cd(OH)<sub>2</sub><sup>1</sup>, CdS/SiO<sub>2</sub><sup>2,3</sup>, SiO<sub>2</sub>/CdSe<sup>4</sup>, CdSe/CdS<sup>5</sup>, CdS/PbS<sup>6</sup> e CdSe/ZnS<sup>7,8</sup>. Estes compostos inorgânicos são designados pela terminologia C1/C2, que significa que a fase C2 (externa) se encontra depositado na fase C1 (interna).

Têm sido vários os métodos desenvolvidos para a síntese deste tipo de nanocompósitos (C1/C2), podendo-se citar o crescimento epitaxial em fase sólida<sup>9</sup>, a nucleação e crescimento no interior de micelas inversas<sup>10</sup>, irradiação por ultra – sons de soluções coloidais<sup>11</sup> e a decomposição electrolítica<sup>12</sup>. No entanto estes métodos nem sempre permitem um controlo total da morfologia e composição química dos nanocompósitos preparados. Como alternativa, tem sido investigado a decomposição de precursores unimoleculares para a produção de materiais semicondutores, como por exemplo, filmes e nanocristais<sup>7</sup>. Recentemente, estes precursores foram utilizados na produção de nanocompósitos<sup>3,4,13</sup>.

Neste capítulo pretende-se investigar a preparação de um nanocompósito de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S utilizando a decomposição térmica do dietilditiocarbamato de prata (I) e a sua respectiva acção antifúngica.

## 2.2 Síntese do nanocompósito

### 2.2.1 Síntese e caracterização do precursor molecular: Dietilditiocarbamato de prata (I) (AgDTC)

No seu estado fundamental, a prata tem uma configuração  $ns^2np^1$  e pode apresentar vários estados de oxidação sendo as mais comuns  $Ag^0$  e  $Ag^{+1}$ . Quimicamente, devido à sua configuração electrónica, a prata consegue ligações bastante fortes com o enxofre  $S^{2-}$ , estando descritos na literatura, a caracterização de um elevado número de complexos de prata (I) com ligandos dadores de enxofre<sup>14</sup>.

Em particular, encontra-se descrito na bibliografia uma variedade de complexos de prata (I) coordenada a ligandos bidentados de tamanho reduzido, como por exemplo ditiocarbamatos, ditiofosfinatos ou ditiocarbonatos<sup>14</sup>. Os ditiocarbamatos são os produtos da reacção entre aminas primárias ou secundárias e dissulfureto de carbono em meio básico, normalmente utilizados na indústria, agricultura, química e medicina como por exemplo no tratamento de doenças, tais como tuberculose, cancro e sida. As propriedades complexantes dos ditiocarbamatos estão directamente ligadas à presença de átomos de enxofre dadores de electrões, originando quelatos com vários metais<sup>15</sup>.

O complexo de prata (I) foi preparado pela mistura de nitrato de prata ( $AgNO_3$ ) e dietilditiocarbamato de sódio ( $NaDTC$ ) à temperatura ambiente sob agitação. Todos os procedimentos experimentais necessários à realização deste trabalho encontram-se descritos detalhadamente no capítulo 5. O AgDTC foi caracterizado por técnicas várias tal como a seguir se descreve.

Tipicamente os complexos do tipo  $[M(S_2CNEt_2)]$ , quando analisados por espectroscopia vibracional (tabela 2.1), apresentam uma banda forte situada na região  $1450-1550\text{ cm}^{-1}$  atribuída à elongação da ligação C-N, sendo-lhe por isso atribuído um carácter intermédio entre o da ligação dupla e a de ligação simples<sup>16</sup>. Na região  $960-1000\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma única banda forte, típica da elongação da ligação C-S em complexos contendo o ligando bidentado ditiocarbamato<sup>16</sup>.

Os resultados de espectroscopia de infravermelho e de Raman do complexo de prata (I) mostram um comportamento idêntico ao descrito na bibliografia<sup>14,16</sup>. Nos espectros de Raman, observa-se também, uma banda a 136 cm<sup>-1</sup> atribuída à deformação angular entre Ag-S e uma banda a 320 cm<sup>-1</sup> correspondente à elongação da ligação Ag-S<sup>16</sup>.

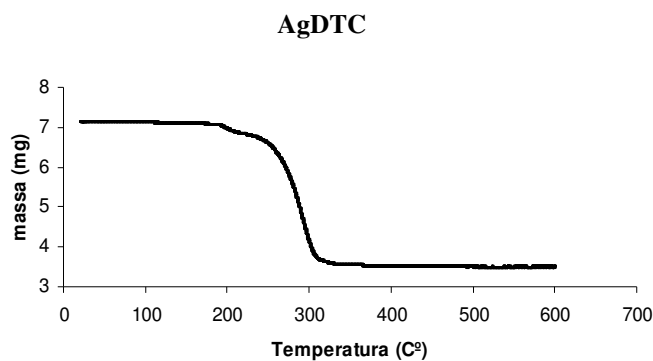
Os resultados obtidos por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H para o complexo de prata (I) estão representados na tabela 2.1. A composição química do AgDTC preparado, foi confirmada por recurso à análise elementar do sólido obtido. Os resultados desta análise são também demonstrados na tabela 2.1 e encontram-se de acordo com os calculados para a fórmula molecular Ag(S<sub>2</sub>CNEt<sub>2</sub>). Ao analisar em conjunto todos os resultados espectroscópicos verifica-se que estes são coerentes com a obtenção de um composto AgDTC.

O AgDTC decompõe-se num único passo sob N<sub>2</sub>, resultando como produto final o Ag<sub>2</sub>S (Figura 2.1). O composto obtido, de cor cinzento-escuro, foi analisado por difracção de raios X de pós, concluindo-se que correspondia ao Ag<sub>2</sub>S (acantite). A perda de massa associada à análise termogravimétrica serviu para confirmar a identidade do complexo analisado (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1** Caracterização do complexo AgDTC por várias técnicas.

Infravermelho (cm <sup>-1</sup> )	Raman (cm <sup>-1</sup> )	RMN de <sup>1</sup> H (δ/ppm [intensidade, multiplicidade <sup>a</sup> , atribuição])	Análise elementar (%) <sup>b</sup>				Comportamento térmico (%)				
			v [C-N]	v [C-S]	v [C-N]	v [C-S]	C	N	H	S	Δm <sub>exp</sub>
1486    973	1430    903	[2H, q, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ]    [2H, t, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ]			20.8 (23.43)	5.76 (5.47)	3.24 (3.93)	21.63 (25.04)	51.0	51.6	229-302

v: elongação;<sup>a</sup>: t – triplo; q – quarteto; <sup>b</sup>: valores calculados dentro de parênteses



**Figura 2.1** Termograma do complexo AgDTC.



### 2.2.2 Sílica amorfa (SiO<sub>2</sub>)

#### Síntese de nanopartículas de SiO<sub>2</sub>

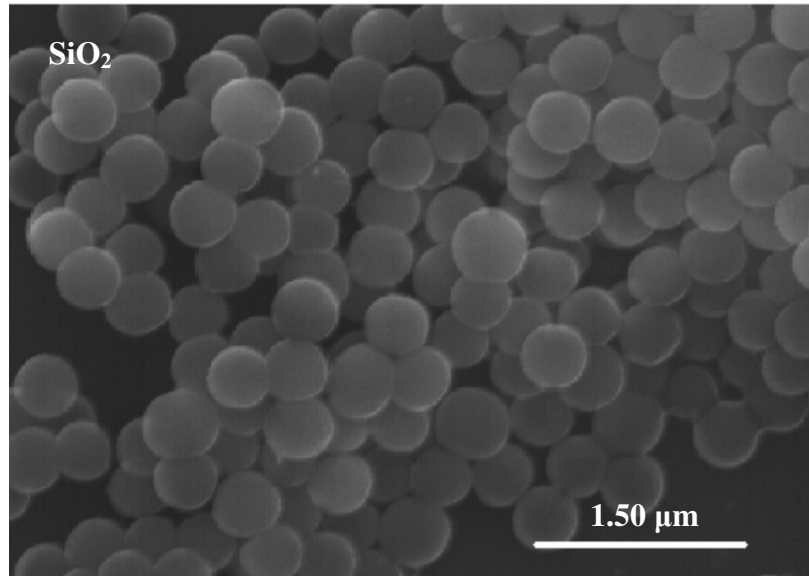
Em 1968 Stöber e colaboradores<sup>17</sup> descreveram um método para preparar nanopartículas esféricas de SiO<sub>2</sub>, com uma distribuição de tamanhos estreita, que permite controlar as dimensões das esferas, variando os parâmetros da reacção. Este método consiste na hidrólise e condensação a partir de precursores inorgânicos, por exemplo o TEOS, na presença de um catalisador (amónia), e é considerado um processo sol – gel<sup>18</sup>. Neste trabalho preparou-se nanopartículas esféricas de SiO<sub>2</sub> com tamanhos variados utilizando o método acima descrito, variando apenas as concentrações de etanol absoluto e amónia (método experimental descrito detalhadamente no capítulo 5). Uma vez preparadas, as partículas esféricas de SiO<sub>2</sub>, foram sujeitas a um tratamento térmico, a 700°C durante 4 horas com a finalidade de aumentar a sua reactividade química.

#### Caracterização das nanopartículas esféricas de SiO<sub>2</sub>

As partículas de SiO<sub>2</sub>, quando analisadas por espectroscopia vibracional, apresentaram uma banda típica forte na região 400-500 cm<sup>-1</sup> atribuída à elongação da ligação Si-O. Na região 1000-1150 cm<sup>-1</sup> observa-se uma única banda fraca, típica da deformação angular da ligação O-Si-O.

A imagem de SEM mostra nanopartículas morfologicamente uniformes, sem aglomeração (Figura 2.2). Nesta imagem, a distribuição de tamanho das nanopartículas de SiO<sub>2</sub> é estreita com um tamanho médio aproximado dos 300 nm.

A variação da concentração de etanol absoluto e da amónia demonstra um efeito significativo no tamanho e distribuição de tamanhos das partículas. No entanto, há outros parâmetros a considerar como a temperatura, tempo de reacção e o reagente utilizado nas lavagens.



**Figura 2.2** Imagem de SEM das partículas de SiO<sub>2</sub> preparadas (cortesia de M. C. Neves).

### **Determinação do potencial zeta ( $\zeta$ )**

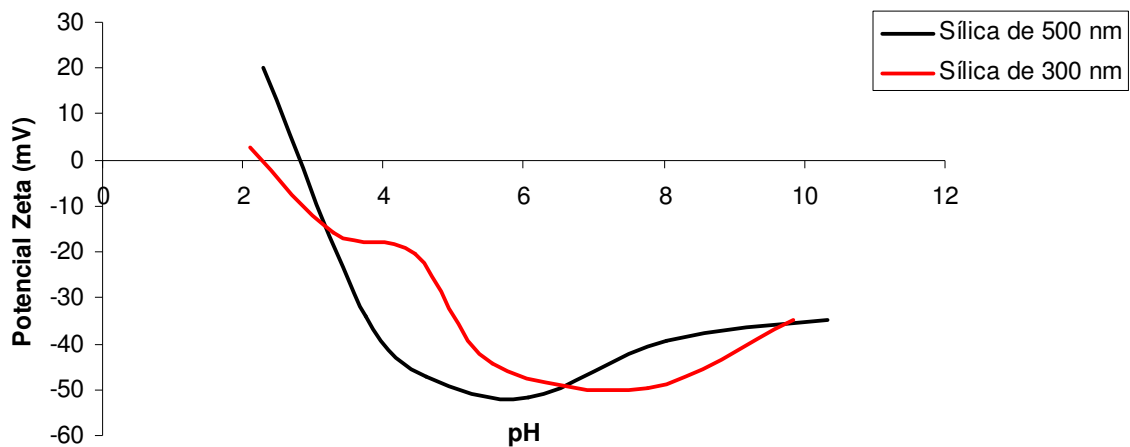
Quase todos os materiais macroscópicos ou microscópicos em contacto com um líquido adquirem uma carga eléctrica na sua superfície. Esta carga deve-se, por exemplo, à dissociação de grupos ionizados na superfície da partícula, adsorção diferencial de iões da solução na superfície da partícula, entre outras<sup>19</sup>.

Num campo eléctrico, como em microelectroforese, cada partícula e os seus iões mais fortemente ligados movem-se como uma unidade, e o potencial no plano de contacto entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial zeta. Quando uma camada de macromoléculas é adsorvida na superfície da partícula, esta move o plano de contacto para longe da superfície e altera o potencial zeta. Desta forma, o potencial zeta está relacionado com a carga superficial da partícula

Este potencial pode ser determinado experimentalmente e, como reflecte a carga efectiva nas partículas, correlaciona-se com a repulsão electrostática entre as cargas e a estabilidade da suspensão, sendo também usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais<sup>19</sup>.

Para uma superfície de SiO<sub>2</sub>, o potencial zeta aproxime-se do ponto isoelétrico na vizinhança de pH = 2. Observando os resultados electroforéticos apresentados na figura 2.3, pode-se afirmar que, tanto o ponto isoelétrico da SiO<sub>2</sub> com 500 nm de diâmetro como o ponto isoelétrico da SiO<sub>2</sub> com 300 nm de diâmetro, se situa entre pH 2 e 3.

Para sistemas de partículas muito pequenas, estima-se que a região de maior estabilidade seja a pH aproximadamente 7.0 e aumente com ele. Analisando a figura acima, a estabilidade das partículas de SiO<sub>2</sub> preparadas encontra-se entre os valores 5 e 8 de pH. Contudo, para pH aproximadamente 8, observa-se um aumento do valor do potencial zeta devido à compressão da dupla camada eléctrica resultante do aumento da força iónica.



**Figura 2.3** Potencial Zeta de nanopartículas esféricas de sílica com tamanhos diversos em função do pH

### Análise de tamanhos de partículas de SiO<sub>2</sub>

Obtiveram-se partículas esféricas de SiO<sub>2</sub> com diferentes tamanhos, com a simples variação da quantidade de etanol e amónia. Para uma determinação mais rigorosa desse tamanho, utilizaram-se dois métodos para calcular os seus diâmetros e compararam-se os métodos. A comparação foi feita entre os valores medidos por um programa de computador (image j) de imagens obtidas por SEM com os valores obtidos no instrumento

ZetaSizer, aparelho este que consegue medir diâmetros de partículas sólidas em suspensão. Neste segundo método, as partículas foram suspensas numa solução de KCl (0.1M) e dispersas. As médias com os respectivos desvios padrões do diâmetro das nanopartículas analisadas estão descritas na tabela 2.2.

**Tabela 2.2** Diâmetro das esferas de SiO<sub>2</sub> preparadas.

Diâmetro das partículas	Método Analítico (Análise por computador)			Método proposto (Análise pelo ZetaSizer)		
	Média	Desvio padrão	Tamanho da amostra	Média	Desvio padrão	Tamanho da amostra
Sílicas de 500 nm	479	30	n = 78	465	42	n = 40
Sílicas de 300 nm	348	36	n = 90	325	49	n = 40

Como foi dito no capítulo 1, para grandes amostras ( $n > 30$ ) de uma população, as médias amostrais terão distribuição normal mesmo que os dados originais não tenham distribuição normal. Como todas as amostras são superiores a 30, para se confirmar se os dois métodos, o método analítico e o método proposto, são ou não são significativamente diferentes, temos que realizar o teste Z para a comparação de duas médias. Se os métodos não forem significativamente diferentes quer dizer que o método proposto regista resultados coerentes e não significativamente diferentes do método analítico.

O primeiro passo é a construção de uma hipótese:

H<sub>0</sub>: Os métodos não são significativamente diferentes ( $\mu_1 = \mu_2$  quando  $\sigma^2$  é conhecido)

H<sub>1</sub>: Os métodos são significativamente diferentes ( $\mu_1 \neq \mu_2$ ).

Como as variâncias entre os métodos não são iguais, o teste Z é calculado pela equação 1.3. O valor de  $Z_{tab}$  é 1.96 com um  $\alpha$  de 0.05. Os resultados obtidos pelo teste Z estão descritos na tabela 2.3.

**Tabela 2.3** Resultados do teste Z aplicado na comparação do diâmetro das partículas de sílica por dois métodos diferentes

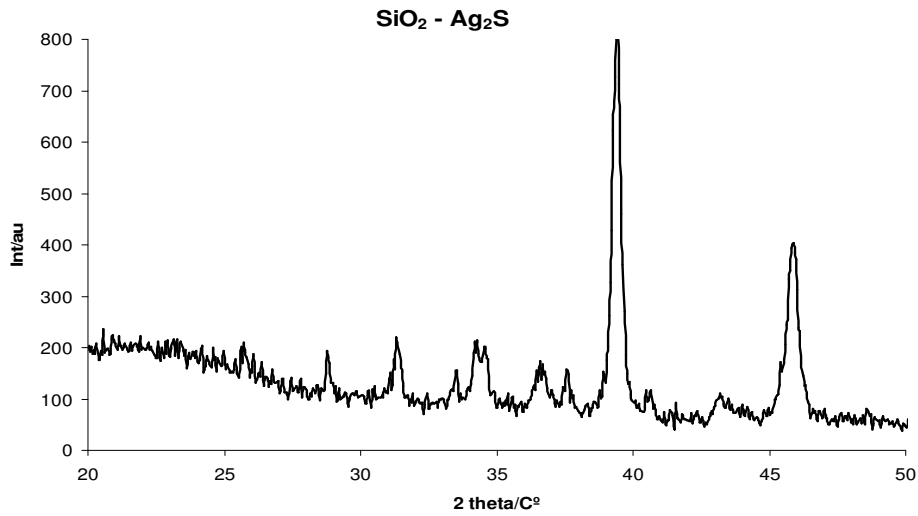
	<b>Teste Z</b>
<b>Sílica de 500 nm</b>	Não significativamente diferentes
<b>Sílica de 300 nm</b>	Significativamente diferentes

Observando a tabela, verificou-se que a hipótese do nulo é rejeitada para partículas de SiO<sub>2</sub> com 300 nm. Estes resultados sugerem que existem desvios pronunciados nos dois métodos quando as partículas são muito pequenas (300 nm).

### 2.3 Caracterização estrutural e morfológica dos nanocompósitos

O composto AgDTC foi usado como precursor unimolecular para a deposição de Ag<sub>2</sub>S sobre partículas de SiO<sub>2</sub>. Os nanocompósitos SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S resultaram da decomposição deste precursor e deposição do semicondutor sobre SiO<sub>2</sub>, em solução de acetona, na presença de 1,2 – diaminopropano, à temperatura de refluxo. Com o passar do tempo de reacção assistiu-se a uma mudança de cor da suspensão de amarela pálida para cinzento-escuro. O compósito preparado foi caracterizado por recurso a técnicas várias tal como se descreve a seguir.

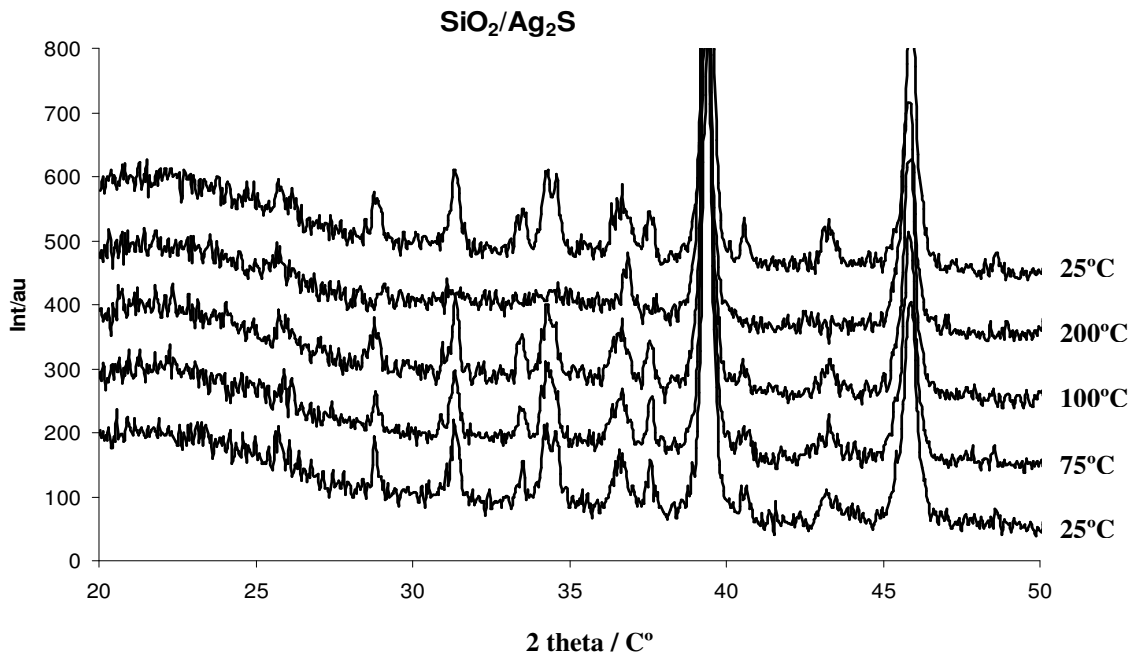
A Figura 2.4 mostra o difractograma de raios X de pós de uma amostra do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. O difractograma apresenta bandas para valores de 2θ de 26.3, 29.0, 31.5, 34.4, 36.6, 37.7 e 43.4, que se encontram de acordo com a presença de partículas de Ag<sub>2</sub>S. A banda larga localizada para valores de 2θ de 21.5 pertence à SiO<sub>2</sub> amorfa, presente como substrato.



**Figura 2.4** Difractograma de raios X de pós do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S.

O Ag<sub>2</sub>S existe principalmente em duas modificações polimorfas, a  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>S monocíclico (acantite) e  $\beta$ -Ag<sub>2</sub>S cúbica de corpo centrado (argentite). A distinção da fase do Ag<sub>2</sub>S (acantite ou argentite) por difracção de raios X não é leal embora o modelo de raios X de pós observados na Figura 2.4 seja consistente com a presença de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>S, que é o polimorfo esperado a temperaturas até 178 °C<sup>20</sup>.

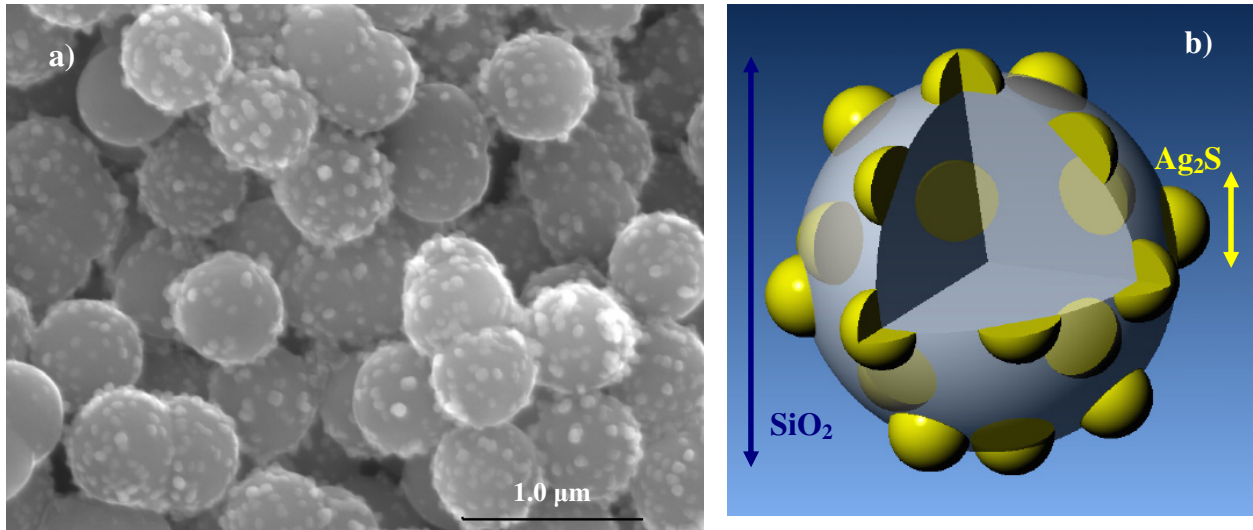
O difractograma de raios X de pós em função da temperatura do nanocompósito de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S ajudou na conclusão de qual a fase presente (Figura 2.5). Com o aumento da temperatura para 200 °C observa-se o desaparecimento de alguns picos (31.5, 34.4, 37.7 e 43.4), de acordo com o desaparecimento tendencial do polimorfo  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>S.



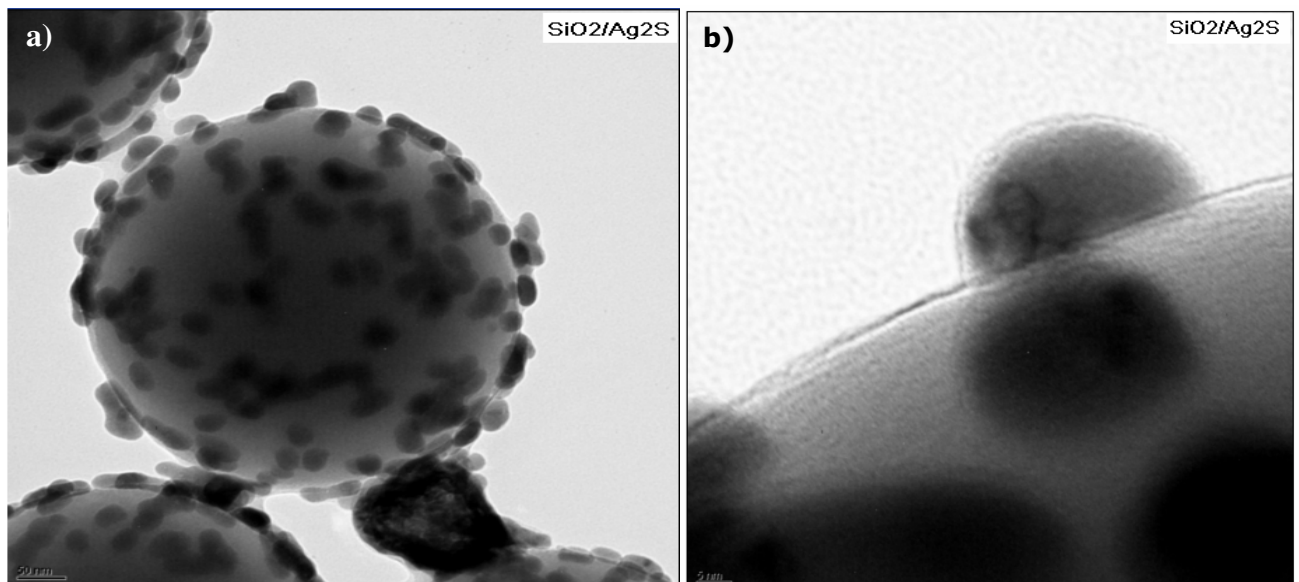
**Figura 2.5** Difractograma de raios X de pós em função da temperatura para o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S

A Figura 2.6 mostra uma imagem de SEM e um esquema de como está estruturado morfologicamente o nanocompósito de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, ao fim de um tempo de reacção de 8 horas. A imagem de SEM indica que as ilhas de Ag<sub>2</sub>S se formaram sobre a superfície das partículas de SiO<sub>2</sub> sem a cobrir totalmente. A análise de EDS executada na superfície dos nanocompósitos mostraram picos de S e Ag, bem como de Si do substrato.

A figura 2.7 a) mostra uma imagem de TEM de uma partícula do nanocompósito de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S onde se considera que as ilhas são constituídas por aglomerados de pequenos nanocristais de semiconductor. A presença de ilhas de Ag<sub>2</sub>S sobre as partículas de SiO<sub>2</sub> foi confirmada recorrendo-se a uma imagem de TEM mais ampliada (figura 2.7 b)).



**Figura 2.6** a) Imagem de SEM do nanocompósito  $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$ , ao fim de 8 horas de reacção (cortesia de, M. C Neves); b) esquema do nanocompósito de  $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  (cortesia de M. Martins).



**Figura 2.7** a) Imagem de TEM do nanocompósito de  $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  demonstrando a formação de ilhas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  na superfície da sílica; b) grande ampliação de uma ilha de uma nanopartícula de  $\text{Ag}_2\text{S}$  (cortesia de M. C. Neves).



Como a análise por microscopia electrónica não quantifica a quantidade de prata existente em cada um dos nanocompósitos preparados, recorreu-se à análise por ICP para calcular o teor de prata. Os resultados indicam 1.99 e, 5.99 % (w/w) de prata para o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S de 500 nm e 300 nm, respectivamente. Ou seja, a deposição foi mais intensa para partículas de menores dimensões, o que pode ser explicado por uma maior reactividade destas nanopartículas.

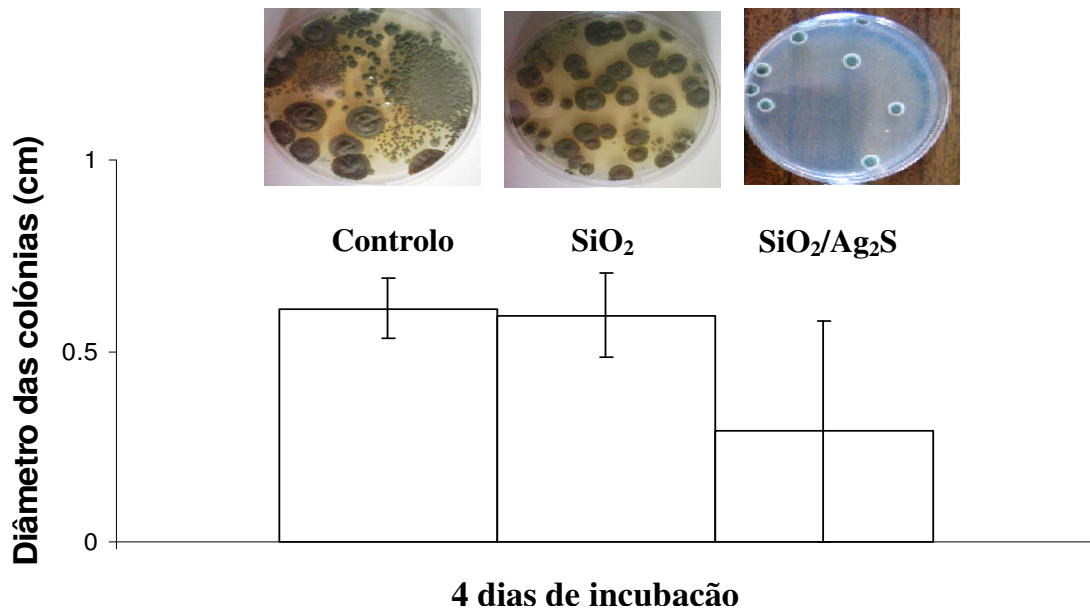
### 2.4 Efeito fungicida e tratamento estatístico de dados

Os fungos estão constantemente a interferir nas actividades diárias dos seres humanos. Hoje em dia são tão importantes que os processos que os inactivam estão a ser cada vez mais investigados<sup>21</sup>. Neste sub capítulo, a actividade antifúngica do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S foi investigada contra o *Aspergillus niger* e o *Penicillium sp*, fungos comuns em vegetais e frutas. Além disso, foi investigada a actividade antifúngica de fibras de celulose cobertas com o nanocompósito devido à sua possível importância em materiais de embalagem.

#### 2.4.1 Actividade antifúngica de nanopartículas de SiO<sub>2</sub> e do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S

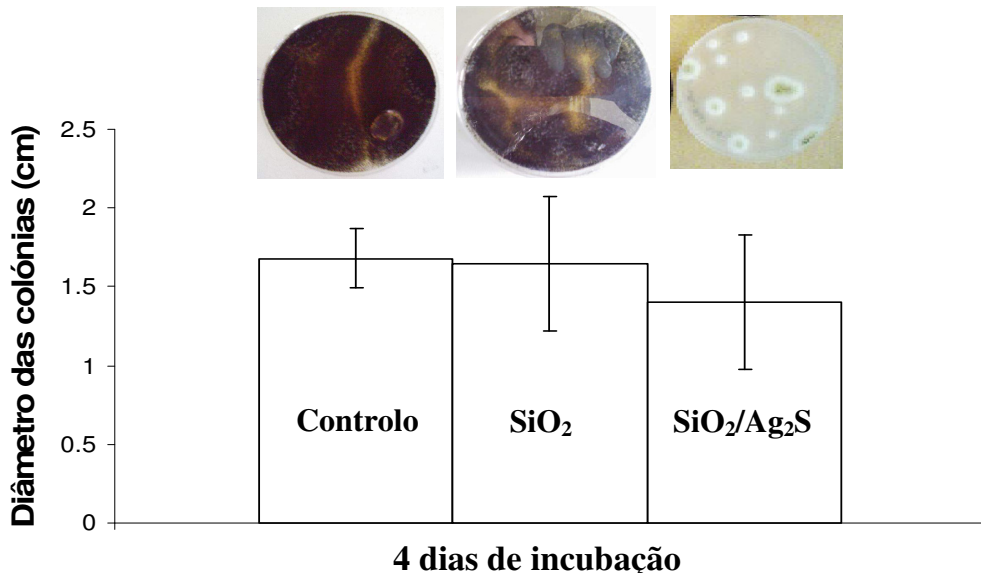
Como primeiro passo na investigação da actividade antifúngica do nanocompósito preparado, o *Aspergillus niger* e o *Penicillium sp* foram semeados em placas de petri com PDA (Potato dextrose Agar) na presença de nanopartículas de SiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (10 mg). As figuras 2.8 e 2.9 mostram fotografias e o crescimento médio das colónias dos dois fungos nas placas com PDA, depois de quatro dias de incubação numa estufa a 26.5 °C, na presença de SiO<sub>2</sub> amorfa (300 nm), o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (300 nm) e um teste de controlo, isto é, ausência de qualquer material inorgânico. Estes resultados demonstram claramente que o nanocompósito inibe o crescimento dos dois fungos e que este efeito não se deve às partículas de SiO<sub>2</sub> mas sim à presença de Ag<sub>2</sub>S.

***Penicillium sp***



**Figura 2.8** Efeito das nanopartículas de SiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S no crescimento médio do diâmetro das colónias do *Penicillium sp*

***Aspergillus niger***



**Figura 2.9** Efeito das nanopartículas de SiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S no crescimento médio do diâmetro das colónias do *Aspergillus niger*.

A equação 2.1, onde Cg é o crescimento médio (diâmetro das colónias ou número de colónias) do teste controlo e Tg é o crescimento médio (diâmetro das colónias ou número de colónias) do teste tratado, representa a percentagem de inibição (Pi) de um dado material inorgânico ao fungo estudado. Neste estudo temos 41.7 e 52.6 % de inibição do crescimento das colónias do *Aspergillus níger* e do *Penicillium sp* respectivamente, na presença do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. Conclui-se, portanto, que este nanocompósito tem um maior efeito na diminuição do tamanho das colónias de *Penicillium sp* do que nas de *Aspergillus Níger*.

$$P_i = \frac{(C_g - T_g) \times 100}{C_g} \quad (2.1)$$

Para se saber mais sobre o efeito inibidor do nanocompósito em estudo, recorreu-se a tratamentos estatísticos. Para a realização destes tratamentos estatísticos, utilizou-se a metodologia do teste F e do teste t para comparação de duas médias discutidas no capítulo 1. O primeiro passo efectuado foi a determinação das hipóteses alternativas e posteriormente à comparação do efeito inibidor do material em estudo em cada fungo e depois entre os dois fungos. É de salientar que esta metodologia foi utilizada em todos os teste microbiais e o nível de confiança determinado foi  $\alpha = 0.05$ .

### **Comparação do efeito inibidor da sílica e do nanocompósito em cada fungo**

H<sub>0</sub> = A inibição do diâmetro das colónias não é significativamente diferente logo os materiais estudados (SiO<sub>2</sub> e nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) têm o mesmo efeito inibidor para cada um dos fungos.

H<sub>1</sub> = A inibição do diâmetro das colónias é significativamente diferente logo os materiais estudados (SiO<sub>2</sub> e nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) não têm o mesmo efeito inibidor para cada um dos fungos.

**Tabela 2.4** Valores das médias dos diâmetros das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor da sílica e do SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S em cada fungo.

	<i>Penicillium sp</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	SiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	SiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S
<b>Cg</b>	0.612	0.612	1.68	1.68
<b>n</b>	7	7	8	8
<b>Tg</b>	0.593	0.290	1.65	0.980
<b>n</b>	7	7	8	8
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	1.58E-02	3.78E-03	1.35E-02	4.37E-02
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	3.21E-02	2.25E-01	6.46E-02	6.40E-02
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	4.81E-02	2.28E-01	7.85E-02	6.83E-02
<b>% Inibição</b>	3.10	52.6	1.81	41.7
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Significativamente diferentes		Significativamente diferentes	

Os resultados apresentados na tabela 2.4 sugerem que as inibições com SiO<sub>2</sub> e com o SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, para os dois fungos, são significativamente diferentes. Estes resultados eram previsíveis, uma vez que não houve inibição do crescimento das colónias quando os fungos foram tratados com SiO<sub>2</sub>.

**Comparação do efeito inibidor da sílica e do nanocompósito para os fungos**

H<sub>0</sub> = A inibição do diâmetro das colónias não é significativamente diferente nos dois fungos logo o composto estudado (SiO<sub>2</sub> ou o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos.

H<sub>1</sub> == A inibição do diâmetro das colónias é significativamente diferente nos dois fungos logo o composto estudado (SiO<sub>2</sub> ou o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) não tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos.

**Tabela 2.5** Valores das médias dos diâmetros das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor da sílica e do SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S nos dois fungos.

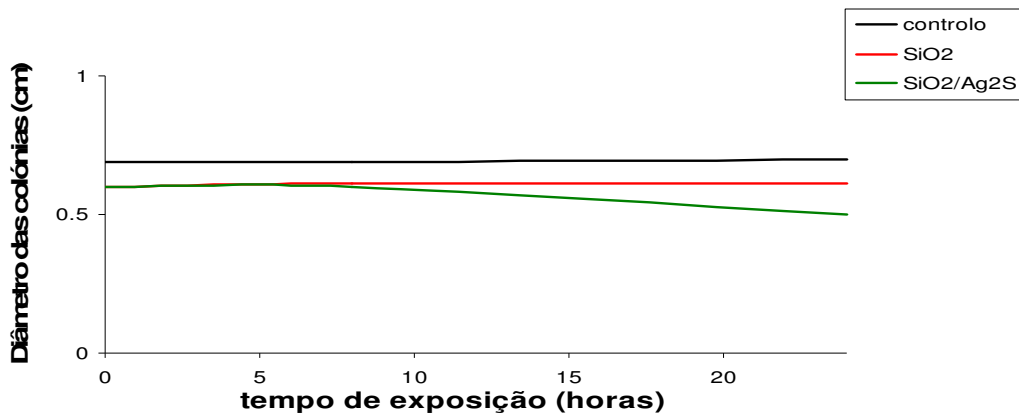
	SiO <sub>2</sub>		SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Cg</b>	0.612	1.68	0.612	1.68
<b>n</b>	7	8	7	8
<b>Tg</b>	0.593	1.65	0.290	0.980
<b>n</b>	7	8	7	8

$s_{Cg}^2$	1.58E-02	1.35E-02	3.78E-03	4.37E-03
$s_{Tg}^2$	3.21E-02	6.46E-02	2.25E-01	6.40E-02
$s_{Pi}^2$	4.81E-02	7.85E-02	2.28E-01	6.83E-02
<b>% Inibição</b>	3.10	1.81	52.6	41.7
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	

Os resultados da tabela mostram que tanto a inibição com a SiO<sub>2</sub> como a inibição com o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S não são significativamente diferentes para os dois fungos, logo aceita-se a hipótese do nulo. Estes resultados sugerem que a interacção dos materiais em estudo, tanto a SiO<sub>2</sub> como o nanocompósito, com os dois fungos não é significativamente diferente.

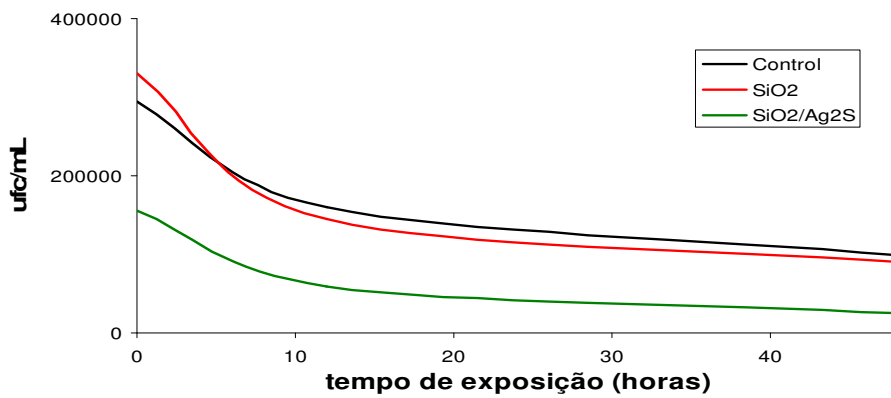
Para aprofundar a investigação sobre o efeito antifúngico do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, suspensões de fungos preparadas em soluto de Ringer foram expostas à SiO<sub>2</sub> ao nanocompósito durante 20 – 40 horas. Na figura 2.10 são apresentados os resultados obtidos para o diâmetro das colónias do *Penicillium sp* em tempos distintos de exposição (0, 8 e 24h). A figura 2.11 apresenta a densidade fúngica do *Aspergillus niger* ao longo do tempo de exposição (0, 12 e 48 h). Estes resultados confirmam os resultados prévios demonstrados anteriormente, ou seja, o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S mostra efeito antifúngico muito forte, tanto a nível do tamanho das colónias como no crescimento em comparação com as nanopartículas de SiO<sub>2</sub> e com o teste controlo.

***Penicillium sp***



**Figura 2.10** Efeito das partículas de SiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S no crescimento do *Penicillium sp* em função do tempo de exposição.

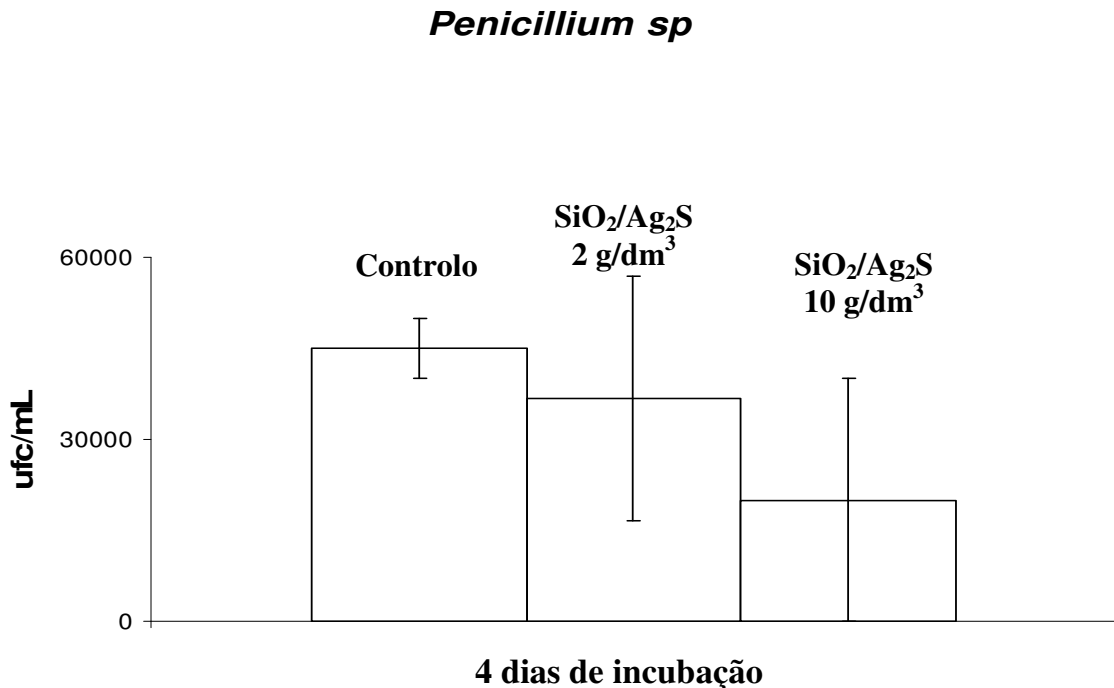
***Aspergillus niger***



**Figura 2.11** Efeito das partículas de SiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S no crescimento do *Aspergillus niger* em função do tempo de exposição (ufc – unidade formadora de colónias).

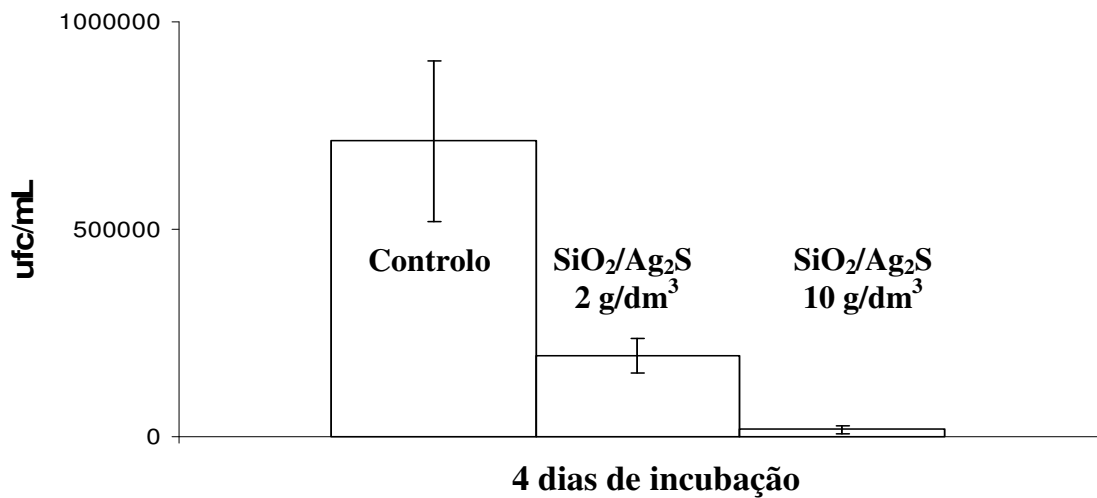
### 2.4.2 Efeito da concentração do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S na actividade antifúngica

Como demonstram os resultados anteriores, a actividade antifúngica do nanocompósito aumenta à medida que aumenta o período de exposição. O mesmo acontece quando se aumenta a quantidade de nanocompósito utilizado. À medida que se aumenta a concentração de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (300 nm) e o tempo de exposição, o efeito antifúngico também aumenta. As Figuras 2.12 e 2.13 mostram a diminuição da densidade fúngica nas placas quando se aumenta a quantidade de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (2 e 10 g/dm<sup>3</sup>) com um tempo de exposição de 48 horas.



**Figura 2.12** Efeito do aumento da concentração do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com um tempo de exposição de 48 horas no crescimento do *Penicillium sp*.



*Aspergillus niger*

**Figura 2.13** Efeito do aumento da concentração do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com um tempo de exposição de 48 horas no crescimento do *Aspergillus niger*.

Neste caso observa-se claramente uma maior actividade antifúngica do nanocompósito em estudo com o *Aspergillus niger* do que com o *Penicillium sp.* A percentagem de inibição do *Aspergillus niger* é de aproximadamente 72.6 e 97.5 % para as concentrações 2 g/dm<sup>3</sup> e 10 g/dm<sup>3</sup> de nanocompósito, respectivamente. Para o *Penicillium sp* a percentagem de inibição é menor, obtendo-se 18.5 e 55.6% para concentrações de 2 g/dm<sup>3</sup> e 10 g/dm<sup>3</sup>, respectivamente. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de existirem diferenças nas estruturas dos fungos e até mesmo nos esporos e também pelo modo como o nanocompósito em estudo interage com os mesmos.

**Comparação do efeito inibidor do nanocompósito de 2 g/dm<sup>3</sup> e 10 g/dm<sup>3</sup> em cada fungo**

H<sub>0</sub> = A inibição do número de colónias não é significativamente diferente logo 2 g/dm<sup>3</sup> do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e 10 g/dm<sup>3</sup> de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S têm o mesmo efeito inibidor em cada um dos fungos em estudo.

H<sub>1</sub> = A inibição do número de colónias é significativamente diferente logo 2 g/dm<sup>3</sup> do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e 10 g/dm<sup>3</sup> de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S não têm o mesmo efeito inibidor em cada um dos fungos em estudo.

**Tabela 2.6** Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor de 2 g/dm<sup>3</sup> de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e 10 g/dm<sup>3</sup> de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S em cada fungo.

	<i>Penicillium sp</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	2 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	10 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	2 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	10 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S
<b>Cg</b>	4.50E04	4.50E04	7.13E05	7.13E05
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>Tg</b>	3.76E04	2.00E4	1.95E05	1.75E04
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	2.50E7	2.50E7	3.78E10	3.78E10
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	4,08E8	4.00E8	1.80E9	3.68E5

$s_{Pi}^2$	2.10E-1	2.00E-01	9.12E-3	2.67E-04
% Inibição	18.5	55.6	72.6	97.5
Teste F	Não significativamente diferentes		Significativamente diferentes	
Teste t	Não significativamente diferentes		Significativamente diferentes	

Analisando os resultados da inibição do crescimento médio das colónias do *Penicillium sp*, pode-se afirmar que a inibição das suas colónias não é significativamente diferente quando se aumenta a concentração de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. Este resultado sugere que mesmo aumentando a quantidade de nanocompósito, a interação entre o SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e o *Penicillium sp* é a mesma. Observa-se exactamente o contrário para a inibição do crescimento de *Aspergillus niger*, ou seja, quando se aumenta a concentração do SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, a inibição do crescimento é significativamente diferentes, indicando que há medida que a quantidade de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S aumenta a interação com o fungo não é a mesma.

### Comparação do efeito inibidor do nanocompósito de 2 g/dm<sup>3</sup> e 10 g/dm<sup>3</sup> para os fungos

H<sub>0</sub> = A inibição do número de colónias não é significativamente diferente logo o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (2 g/dm<sup>3</sup> ou 10 g/dm<sup>3</sup>) têm o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.

H<sub>1</sub> = A inibição do número de colónias é significativamente diferente logo o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (2 g/dm<sup>3</sup> ou 10 g/dm<sup>3</sup>) não têm o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.

**Tabela 2.7** Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor de 2 g/dm<sup>3</sup> de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e 10 g/dm<sup>3</sup> de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S nos dois fungos.

	2 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S		10 g/dm <sup>3</sup> de SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Cg</b>	4.50E04	7.13E05	4.50E04	7.13E05
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>Tg</b>	3.76E04	1.95E05	2.00E4	1.75E04
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	2.50E7	3.78E10	2.50E7	3.78E10
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	4,08E8	1.80E9	4.00E8	3.68E5
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	2.10E-1	9.12E-3	2.00E-01	2.67E-04
<b>% Inibição</b>	18.5	72.6	55.6	97.5
<b>Teste F</b>	Significativamente diferentes		Significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	

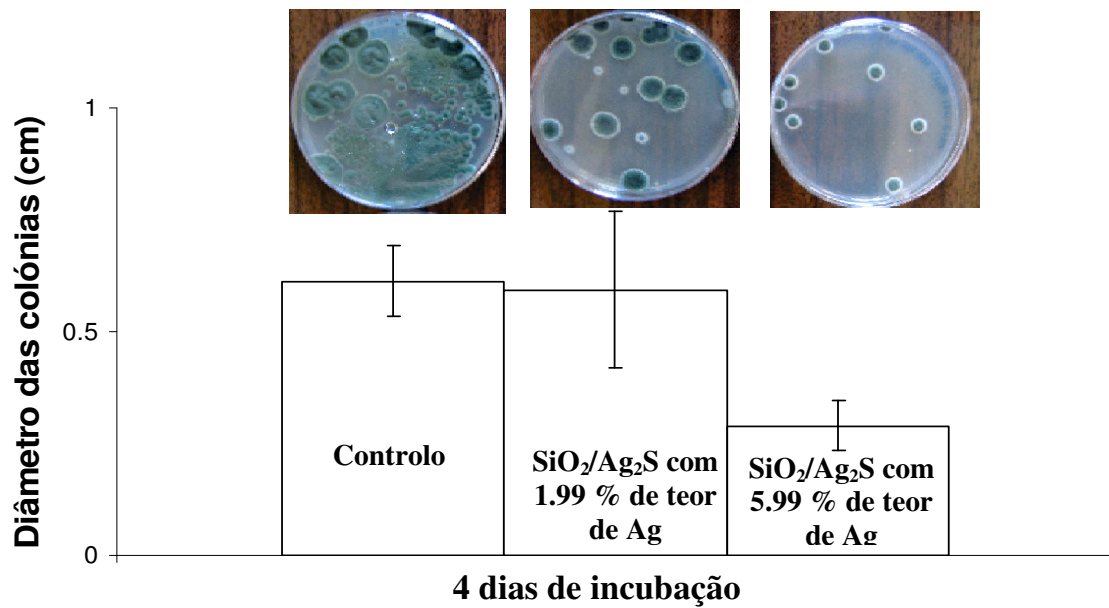
Estes resultados indicam que com o aumento da concentração do nanocompósito, a prata iónica presente no nanocompósito mostra uma inibição não significativamente diferente

para os dois fungos (*Penicillium sp* e *Aspergillus niger*). Ou seja, quando se utiliza concentrações baixas de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (2 g/dm<sup>3</sup>) observa-se uma diferença significativa entre a percentagem de inibição nos dois fungos, (maior inibição para o *Aspergillus niger*), pelo contrário, quando se aumenta a concentração, cinco vezes, observa-se que não há diferenças significativas na sua inibição. Estes resultados também sugerem que quando se utiliza concentrações elevadas de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (10 g/dm<sup>3</sup>) a interacção entre o Ag<sub>2</sub>S com os fungos não é significativamente diferente.

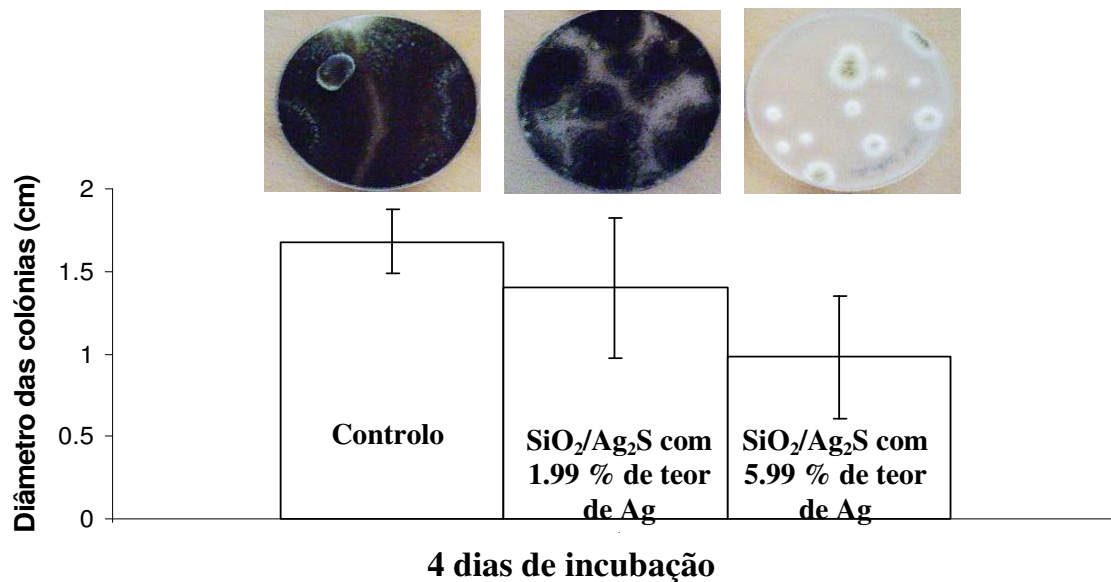
### **2.4.3 Actividade antifúngica do Ag<sub>2</sub>S depositado em SiO<sub>2</sub> com diferentes tamanhos.**

Os testes anteriores sugerem que a actividade antifúngica se deve à presença de Ag<sub>2</sub>S e não de SiO<sub>2</sub>. Os resultados de ICP indicam que o nanocompósito com sílicas de 500 nm tem menor teor de prata (1.99 % m/m de Ag) do que o nanocompósito preparado com sílicas de 300 nm (5.99 % m/m de Ag). Foi então testado qual dos dois materiais tinha maior efeito antifúngico para verificar se é realmente a quantidade de prata no nanocompósito que faz com que o poder inibidor seja maior ou menor. Obviamente que estes resultados devem ser analisados criticamente, pois o tamanho da partícula pode influenciar a actividade antifúngica.

As figuras 2.14 e 2.15 mostram os resultados da exposição, após 4 dias de incubação, dos fungos aos dois nanocompósito. As fotografias mostram a variação no tamanho das colónias e os gráficos a variação do crescimento para os dois fungos e para os respectivos controlos. Os resultados mostram claramente que o nanocompósito com maior teor de prata (SiO<sub>2</sub> de 300 nm) é o nanocompósito com maior actividade antifúngica

*Penicillium sp*

**Figura 2.14** Efeito da actividade antifúngica do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com diferentes tamanhos de sílicas no diâmetro das colónias do *Penicillium sp*.

*Aspergillus Niger*

**Figura 2.15** Efeito da actividade antifúngica do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com diferentes tamanhos de sílicas no diâmetro das colónias do *Aspergillus niger*.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios anteriores e neste, pode-se concluir que é a prata iónica que apresenta actividade antifúngica no nanocompósito em estudo e que quanto mais quantidade de Ag<sup>+</sup> os nanocompósitos tiverem, maior efeito inibidor se verificará.

A percentagem de inibição do *Aspergillus niger* é de aproximadamente 16.7 e 41.7% para os nanocompósitos com 1.99 e 5.99 % de m/m de Ag, respectivamente. Para o *Penicillium sp* o padrão de variação é semelhante, mas a percentagem de inibição, em relação ao *Aspergillus niger*, é menor para o nanocompósito com 1.99 % de m/m de Ag, (3.11%), e maior para o nanocompósito com 5.99 % m/m de Ag (52.5%).

### **Comparação do efeito inibidor do nanocompósito com 1.99 e 5.99 % m/m de Ag em cada fungo**

H<sub>0</sub> = A inibição do diâmetro das colónias não é significativamente diferente logo SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.99 % m/m de Ag e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 5.99 % m/m de Ag têm o mesmo efeito inibidor em cada um dos fungos em estudo.

H<sub>1</sub> = A inibição do diâmetro das colónias é significativamente diferente logo SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.99 % m/m de Ag e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 5.99 % m/m de Ag não têm o mesmo efeito inibidor em cada um dos fungos em estudo.

Para a inibição do diâmetro das colónias do *Penicillium sp*, os resultados da tabela 2.8 mostram que com o aumento da quantidade de prata, a inibição é significativamente diferente para os diferentes nanocompósitos, sugerindo que a interacção entre os dois nanocompósitos e o *Penicillium sp* é significativamente diferente. Por outro lado, os resultados da inibição do diâmetro das colónias do *Aspergillus niger* expressam o contrário, ou seja, para um aumento de teor de prata no nanocompósito, o efeito sobre o tamanho do diâmetro das colónias não é significativamente diferente para os dois compostos em estudo.

**Tabela 2.8** Valores das médias do diâmetro das colônias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.99% m/m de Ag e do SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 5.99% m/m de Ag em cada fungo.

	<i>Penicillium sp</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.99 % m/m de Ag	SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 5.99 % m/m de Ag	SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.99 % m/m de Ag	SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 5.99 % m/m de Ag
<b>Cg</b>	0.612	0.612	1.68	1.68
<b>n</b>	14	14	5	5
<b>Tg</b>	0.593	0.290	1.40	0.980
<b>n</b>	14	14	5	5
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	1.58E-02	3.78E-03	8.91E-03	4.37E-03
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	3.24E-02	3.14E-03	6.39E-02	4.80E-02
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	4.82E-02	6.92E-03	7.29E-02	5.24E-02
<b>% Inibição</b>	3.11	52.5	16.7	41.7
<b>Teste F</b>	Significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	



**Comparação do efeito inibidor do nanocompósito com 1.99 e 5.99 % m/m de Ag para os fungos**

H<sub>0</sub> = A inibição do diâmetro das colônias não é significativamente diferente logo o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (1.99 e 5.99 % de m/m de Ag) têm o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.

H<sub>1</sub> = A inibição do diâmetro das colônias é significativamente diferente logo o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (1.99 e 5.99 % de m/m de Ag) não têm o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.

**Tabela 2.9** Valores das médias do diâmetro das colônias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.99% m/m de Ag e do SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 5.99% m/m de Ag nos dois fungos.

	SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.99 % m/m de Ag		SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 5.99 % m/m de Ag	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>C<sub>g</sub></b>	0.612	1.68	0.612	1.68
<b>n</b>	14	5	14	5
<b>T<sub>g</sub></b>	0.593	1.40	0.290	0.980
<b>n</b>	14	5	14	5
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	1.58E-02	8.91E-03	3.78E-03	4.37E-03
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	3.24E-02	6.39E-02	3.14E-03	4.80E-02

<b>S<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	4.82E-02	7.29E-02	6.92E-03	5.24E-02
<b>% Inibição</b>	3.11	16.7	52.5	41.7
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	

Comparando os resultados do efeito dos nanocompósitos sobre o tamanho das colónias do *Penicillium sp* e do *Aspergillus niger*, pode-se concluir que o decréscimo do diâmetro das colónias não é significativamente diferente para os dois fungos, ou seja, utilizando o nanocompósito com menos teor de prata (SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S 500 nm) ou com maior teor de prata (SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S 300 nm), o decréscimo do diâmetro das colónias em ambos os fungos não é significativamente diferente.

#### 2.4.4 Actividade antifúngica do Ag<sub>2</sub>S preparado por diferentes métodos

Os testes anteriores sugerem que o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S só tem actividade antifúngica devido à presença do Ag<sub>2</sub>S (prata iónica). Tais resultados despertam outras dúvidas como qual a influência da natureza do Ag<sub>2</sub>S na actividade antifúngica ou qual a influência da prata iónica e da prata metálica no crescimento dos dois fungos estudados.

As Figuras 2.16 e 2.17 mostram a diferença de crescimento das colónias do *Penicillium sp* e do *Aspergillus niger* quando estes foram semeados em placas com PDA, na presença de Ag<sub>2</sub>S preparado por métodos diferentes (ver capítulo 5). Para a realização deste teste utilizou-se: i) Ag<sub>2</sub>S preparado pelo método convencional (precipitação directa); ii) Ag<sub>2</sub>S preparado pela decomposição térmica do AgDTC; iii) o próprio AgDTC; iv) nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S preparado por refluxo de uma solução de acetona com AgDTC na presença de uma amina; v) o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S.

***Penicillium sp***

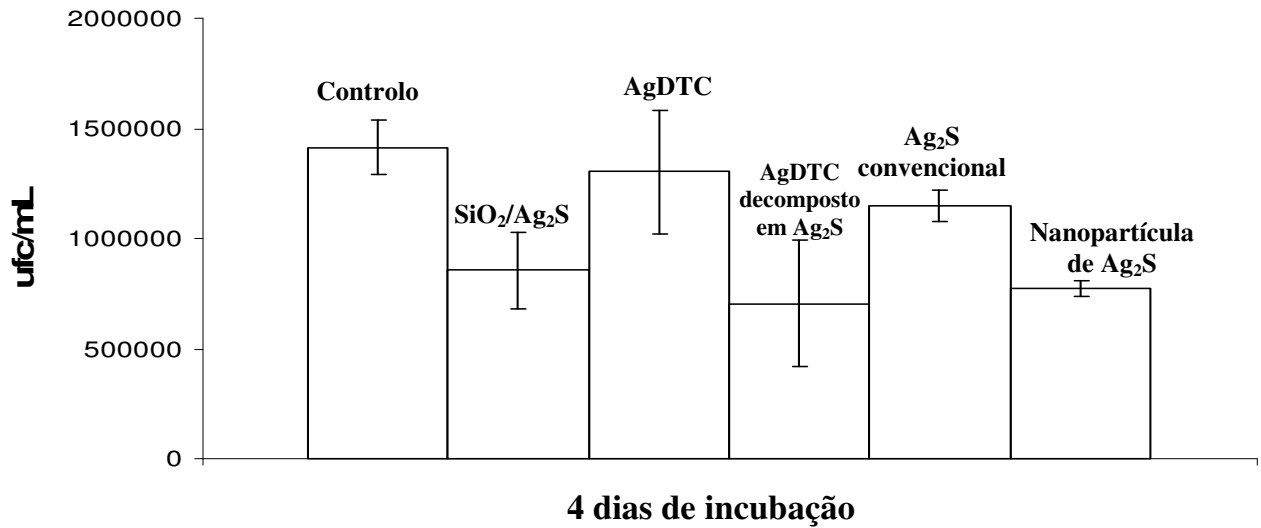


Figura 2.16 Efeito antifúngico do Ag<sub>2</sub>S preparado por métodos diferentes no crescimento das colónias de o *Penicillium sp*.

***Aspergillus niger***

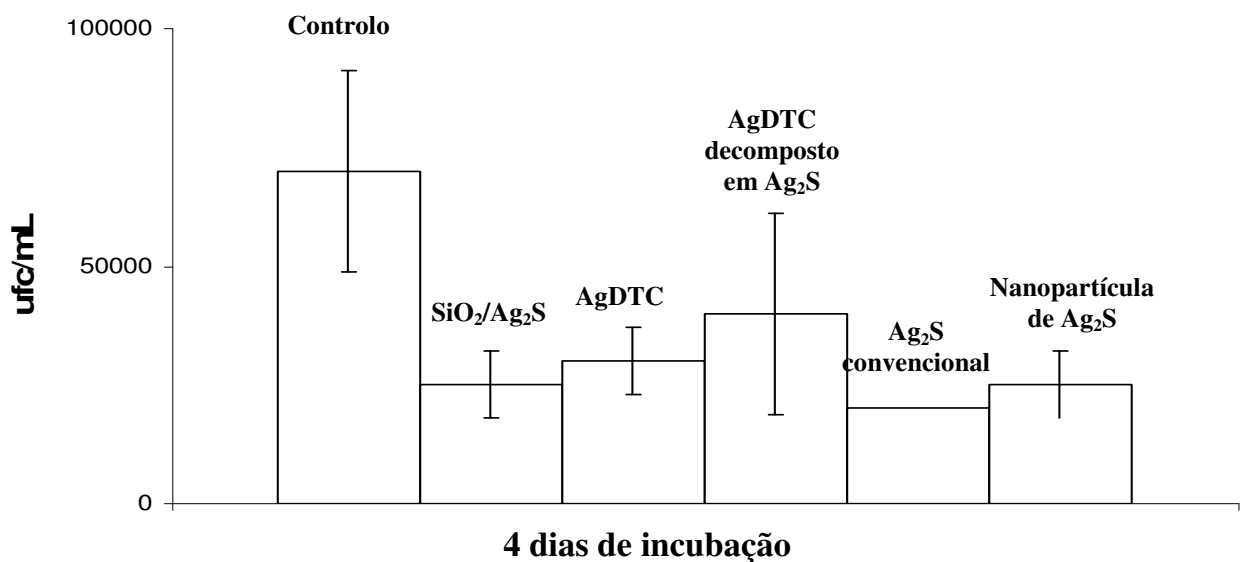


Figura 2.17 Efeito antifúngico do Ag<sub>2</sub>S preparado por métodos diferentes no crescimento das colónias de o *Aspergillus niger*.

O resultado deste teste indica que o Ag<sub>2</sub>S tem actividade antifúngica mesmo sendo preparado por métodos diferentes. Observa-se no entanto que alguns Ag<sub>2</sub>S apresentam maior actividade antifúngica que outros. O nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e as nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S apresentam maior taxa de inibição para os dois fungos.

Os outros tipos de Ag<sup>(I)</sup> (AgDTC, Ag<sub>2</sub>S preparado pela decomposição térmica do AgDTC e Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação directa) apresentam percentagens de inibição diferentes para os dois fungos (Tabela 2.10). Esta diferença de actividades antifúngicas pode dever-se às diferentes estruturas dos fungos e à forma de como a prata iónica (Ag<sub>2</sub>S) interage com o próprio fungo.

**Tabela 2.10** Percentagens (%) de inibição devido á presença de Ag<sup>(I)</sup> em diferentes materiais.

	SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	Agdtc	Agdtc decomposto em Ag <sub>2</sub> S	Ag <sub>2</sub> S convencional	Nanopartículas Ag <sub>2</sub> S
<i>Penicillium sp</i>	39.5	7.79	50.1	18.6	39.8
<i>Aspergillus niger</i>	64.3	42.9	57.2	71.4	64.3

**Comparação do efeito inibidor dos vários compostos com Ag<sub>2</sub>S para os dois fungos.**

H<sub>0</sub> = A inibição do número de colónias não é significativamente diferentes logo o material com Ag<sub>2</sub>S (Agdtc, Agdtc decomposto termicamente em Ag<sub>2</sub>S, SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação e Ag<sub>2</sub>S nanométrico) tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.

H<sub>1</sub> = A inibição do número de colónias é significativamente diferentes logo o material com Ag<sub>2</sub>S (Agdtc, Agdtc decomposto termicamente em Ag<sub>2</sub>S, SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação e Ag<sub>2</sub>S nanométrico) não tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.

**Tabela 2.11** Valores das médias do número de colônias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor diferentes materiais com Ag<sub>2</sub>S nos dois fungos.

	SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S		Agdte – Ag <sub>2</sub> S		Agdte	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Cg</b>	1.41E06	7.00E04	1.41E06	7.00E04	1.41E06	7.00E04
<b>n</b>	3	4	3	4	3	4
<b>Tg</b>	8.55E05	2.50E04	7.05E05	3.00E04	1.30E06	4.00E-04
<b>n</b>	3	4	3	4	3	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	2.81E-03	1.17E-02	1.91E-03	1.69E-02	6.53E-03	3.00E-02
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	1.57E-02	1.02E-02	4.21E-02	1.02E-02	3.91E-03	9.19E-02
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	1.89E-02	2.19E-02	5.12E-02	2.71E-02	4.56E-02	1.22E-02
<b>% Inibição</b>	39.5	64.3	50.1	57.1	7.79	42.9
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes		Significativamente diferentes	

	Ag <sub>2</sub> S preparado por precipitação		Ag <sub>2</sub> S nanométrico	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Cg</b>	1.41E06	7.00E04	1.41E06	7.00E04
<b>n</b>	3	4	3	4
<b>Tg</b>	1.15E06	2.00E04	7.75E05	2.50E04
<b>n</b>	3	4	3	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	5.09E-03	7.10E-03	2.31E-03	1.17E-02
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	2.51E-03	0*	6.27E-04	1.02E-02
<b>s<sub>y</sub><sup>2</sup></b>	7.60E-03	7.50E-03	2.94E-03	2.19E-02
<b>% Inibição</b>	18.9	71.4	45.1	64.3
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	

\*sem réplicas (só uma única amostra)

Os resultados indicam que a inibição do crescimento dos dois fungos com o AgDTC e com Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação directa é significativamente diferente, sugerindo assim que a interacção destes dois compostos com os dois fungos é diferente.

Os outros compostos demonstram uma inibição não significativamente diferente quando em contacto com os dois fungos, sugerindo portanto, que a interacção dos materiais (Ag<sub>2</sub>S decomposto termicamente em Ag<sub>2</sub>S, SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e Ag<sub>2</sub>S nanométrico) com os dois fungos não é significativamente diferente.

O tratamento dos dados estatísticos deste teste sugere que a natureza da prata iónica e método de preparação são fundamentais na inibição dos dois fungos, *Penicillium sp* e *Aspergillus níger*.

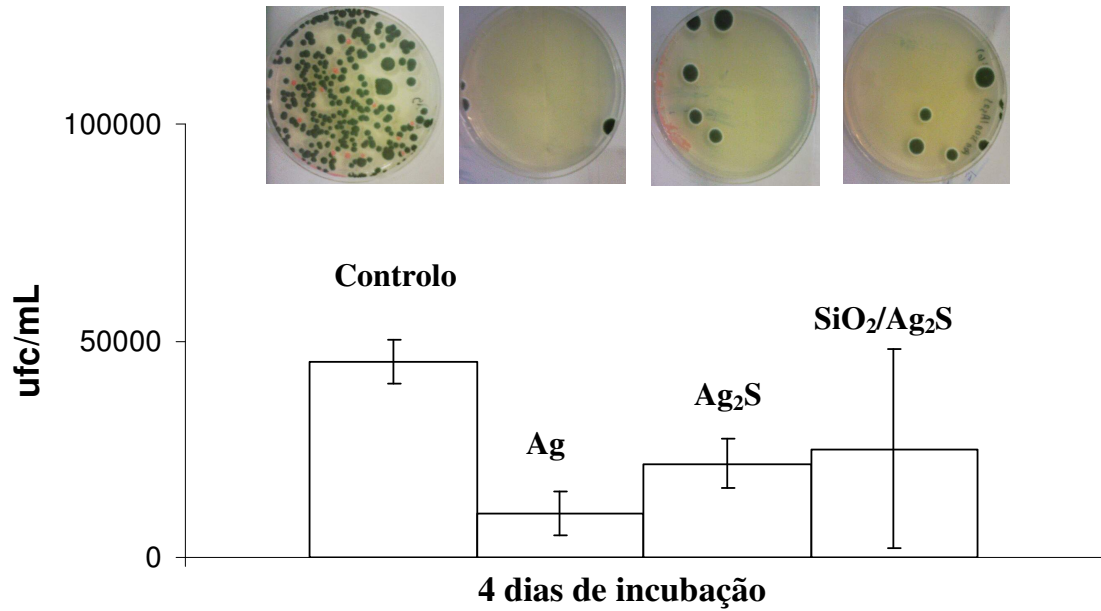
### 2.4.5 Actividade antifúngica da prata (metálica e iónica)

O resultado dos testes anteriores mostrou que a concentração de prata é crucial para a actividade antifúngica do nanocompósito. Por este motivo, a influência da prata em diferentes materiais foi investigada para os dois fungos em estudo. Nas figuras 2.18 e 2.19. são apresentadas fotografias das colónias do *Penicillium sp* e *Aspergillus níger*, respectivamente, em placas com PDA, depois de quatro dias de incubação a 26.5 °C, na presença de prata metálica, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação directa e o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, ambos com o mesmo número de moles de prata (1.58E-05 mol). São apresentadas também fotografias do teste controlo.

Estes testes mostram, claramente, que a prata metálica tem um maior efeito inibidor no crescimento de ambos os fungos do que a prata iónica, sendo a sua percentagem de inibição 77.8 e 79.3% para o *Penicillium sp* e *Aspergillus níger*, respectivamente. Contudo, quando se analisa os resultados dos compostos com Ag<sub>2</sub>S (Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação e o nanocompósito em estudo), verifica-se que o crescimento dos dois fungos não é muito diferente, ou seja, para o mesmo número de moles de prata a percentagem de inibição não é muito diferente. Para o *Penicillium sp* obteve-se 51.9 e 44.4 % para o Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação directa e o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, respectivamente.

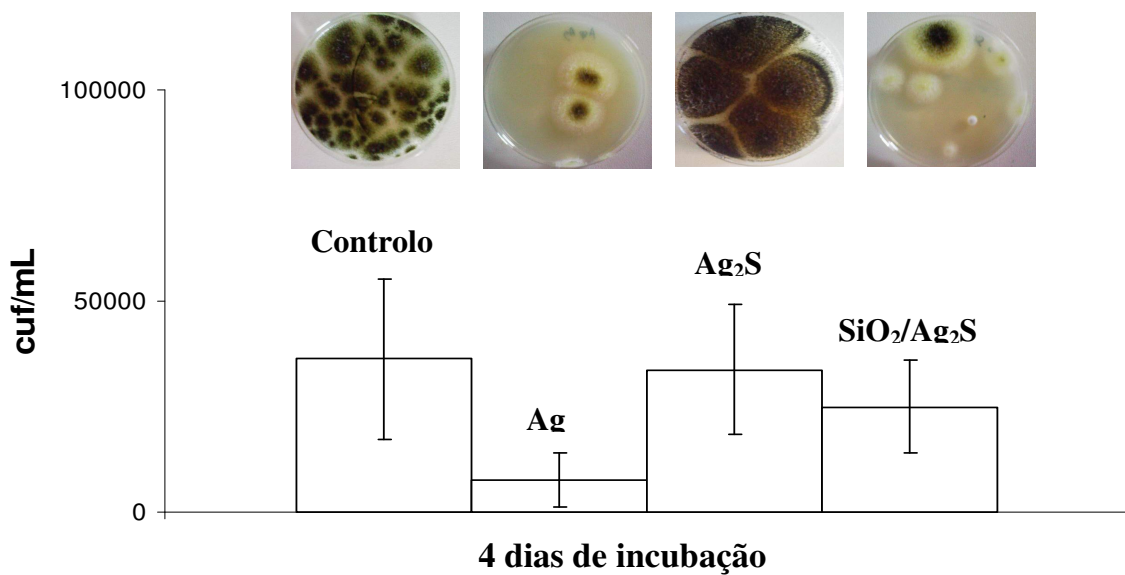
Para *Aspergillus níger* os resultados foram um pouco diferentes, pois obteve-se maior percentagem de inibição com o nanocompósito do que com o Ag<sub>2</sub>S (31.0 e 6.90 % respectivamente). Estes resultados podem dever-se ao diferente mecanismo de interacção dos fungos com a prata metálica e com a prata iónica.

***Penicillium sp***



**Figura 2.18** Efeito da mesma concentração de prata em diferentes compostos no crescimento das colónias do *Penicillium sp*.

***Aspergillus niger***



**Figura 2.19** Efeito da mesma concentração de prata em diferentes compostos no crescimento das colónias do *Aspergillus niger*.



**Comparação do efeito inibidor dos compostos com Ag (metálica e iónica) para os fungos**

H<sub>0</sub> = A inibição do crescimento de colónias não é significativamente diferente logo o material com prata (prata metálica, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.

H<sub>1</sub> = A inibição do crescimento de colónias é significativamente diferente logo o material com prata (prata metálica, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) não tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.

**Tabela 2.12** Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor da prata metálica, do Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação e o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S entre os fungos.

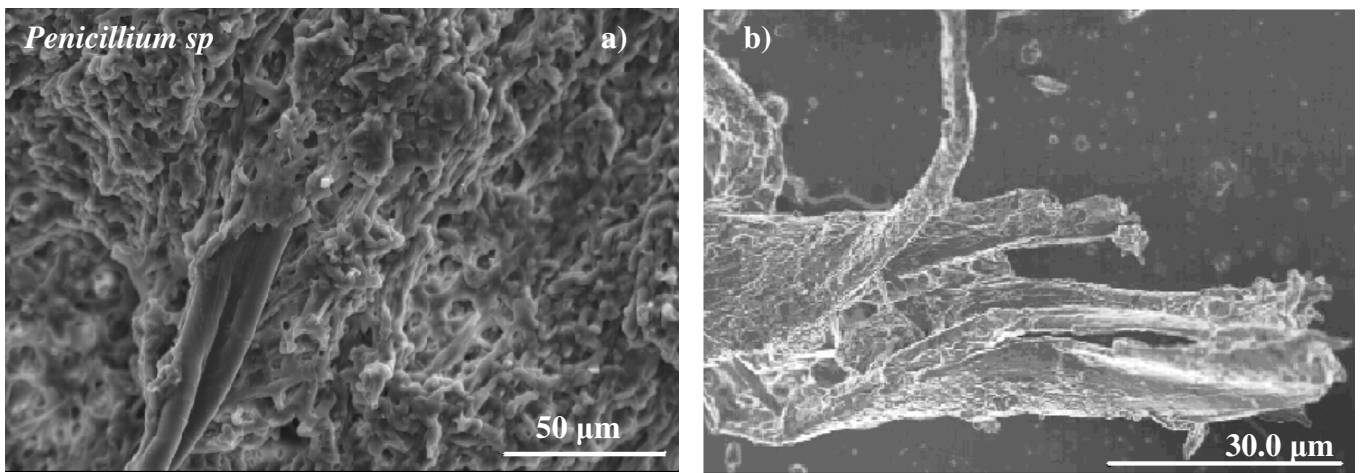
	Prata metálica		Ag <sub>2</sub> S preparado por precipitação		SiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>C<sub>g</sub></b>	4.50E04	3.63E04	4.50E04	3.63E04	4.50E04	3.63E04
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4
<b>T<sub>g</sub></b>	1.00E04	7.50E03	2.16E04	3.38E04	2.50E04	2.50E04
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	2.50E07	1.31E09	2.50E07	1.31E09	2.50E07	1.31E09
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	2.50E07	4.17E07	3.33E07	2.40E08	5.25E08	1.17E08

<b>SPi<sup>2</sup></b>	1.30E-02	4.33E-02	1.93E-02	4.17E-01	2.63E-01	2.18E-01
<b>% Inibição</b>	77.8	79.3	51.9	6.90	44.4	31.0
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Não significativamente diferentes		Significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	

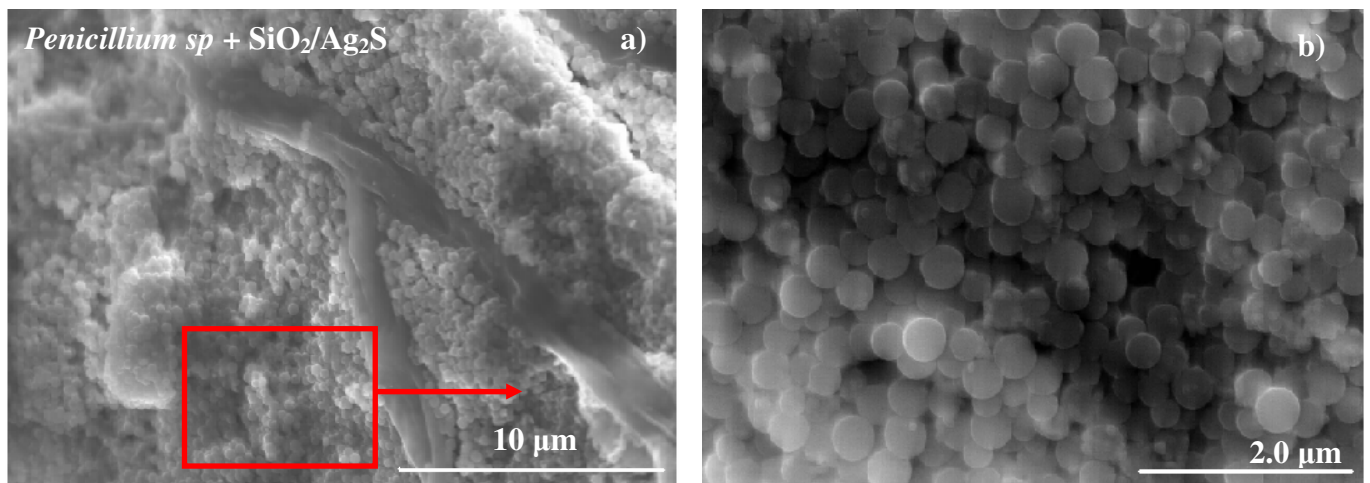
Os resultados apresentados na tabela 2.12 demonstram que a inibição do número de colónias de ambos os fungos quando tratados com prata metálica e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S não é significativamente diferente, sugerindo que a interação destes dois compostos não é significativamente diferente nos dois fungos. Observou-se o contrário quando os fungos são tratados com Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação. Como se observou na tabela anterior (Tabela 2.11), também estes resultados demonstram que a inibição é significativamente diferente nos dois fungos, sugerindo mais uma vez a diferente interação entre este composto e os dois fungos em estudo.

Embora os resultados anteriores demonstrem a eficiência do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S na inibição do crescimento do *Penicillium sp* e do *Aspergillus niger*, o mecanismo pelo qual este opera não é ainda conhecido. Na literatura é sugerido que a prata metálica ou a prata iónica interage com os grupos sulfídricos das enzimas respiratórias que se encontram nas membranas plasmáticas dos microrganismos<sup>22</sup>. A ligação da prata a estas enzimas respiratórias provoca alterações na permeabilidade das membranas, que causam alterações nas células, incluindo a perda de plasma através da parede celular. Outro modo possível de acção, que tem sido descrito na literatura, consiste na ligação da prata iónica ao material genético microbial<sup>23,24</sup>.

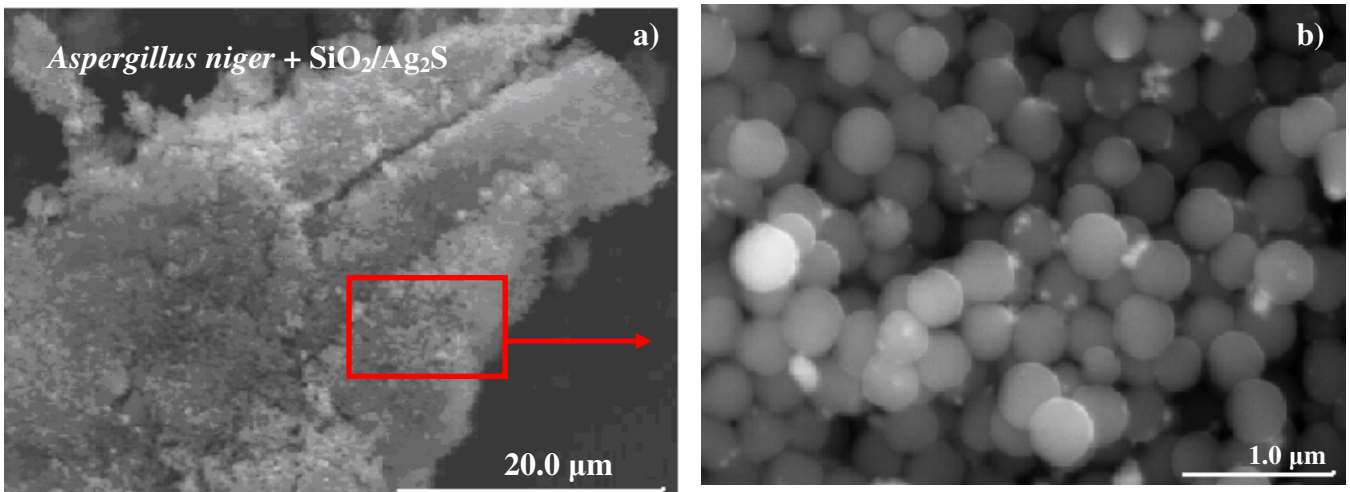
Imagens tiradas por SEM do *Penicillium sp* e do *Aspergillus niger* exposto ao nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S durante 2 dias mostram o nanocompósito a cobrir as hifas e esporos em ambos os fungos (Figura 2.21 e 2.22). A análise de EDS sobre a superfície dos fungos com o nanocompósito demonstrou picos característicos de prata, enxofre e silício. Estas imagens sugerem que o nanocompósito ao envolver as hifas, criam um manto compacto à sua volta, impedindo a produção de esporos e consequentemente a reprodução e crescimento do *Penicillium sp* e do *Aspergillus niger*.



**Figura 2.20** a) Imagem de SEM do fungo *Penicillium sp*; b) Imagem de SEM do fungo *Aspergillus niger*



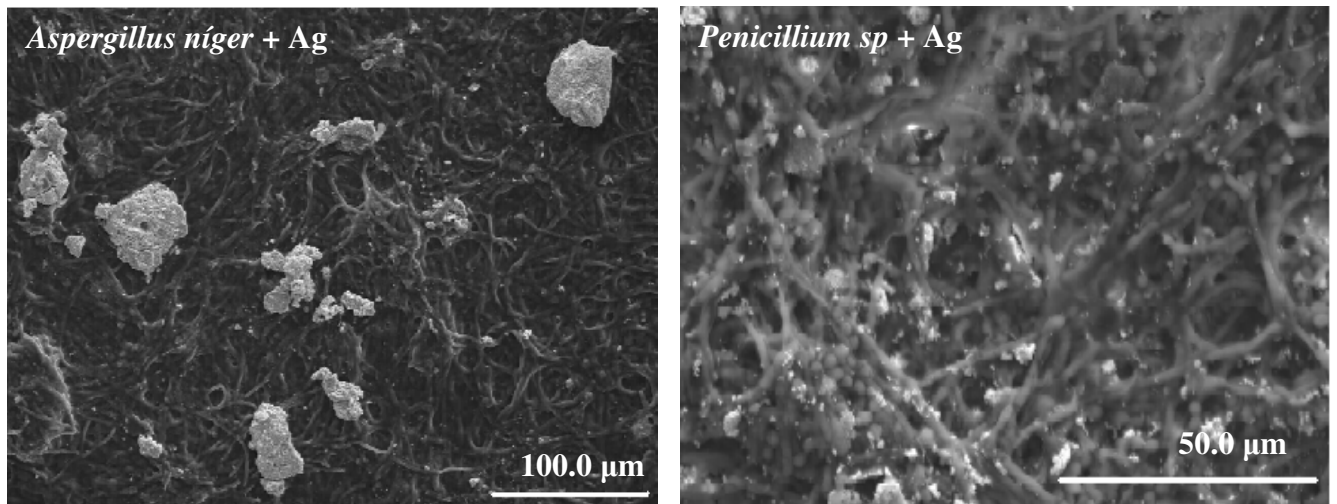
**Figura 2.21**; a) Imagem de SEM do *Penicillium sp* exposto ao nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S durante 48 horas; b) Imagem de SEM com maior ampliação das partículas de SiO<sub>2</sub> com Ag<sub>2</sub>S a cobrir todas as hifas do *Penicillium sp*.



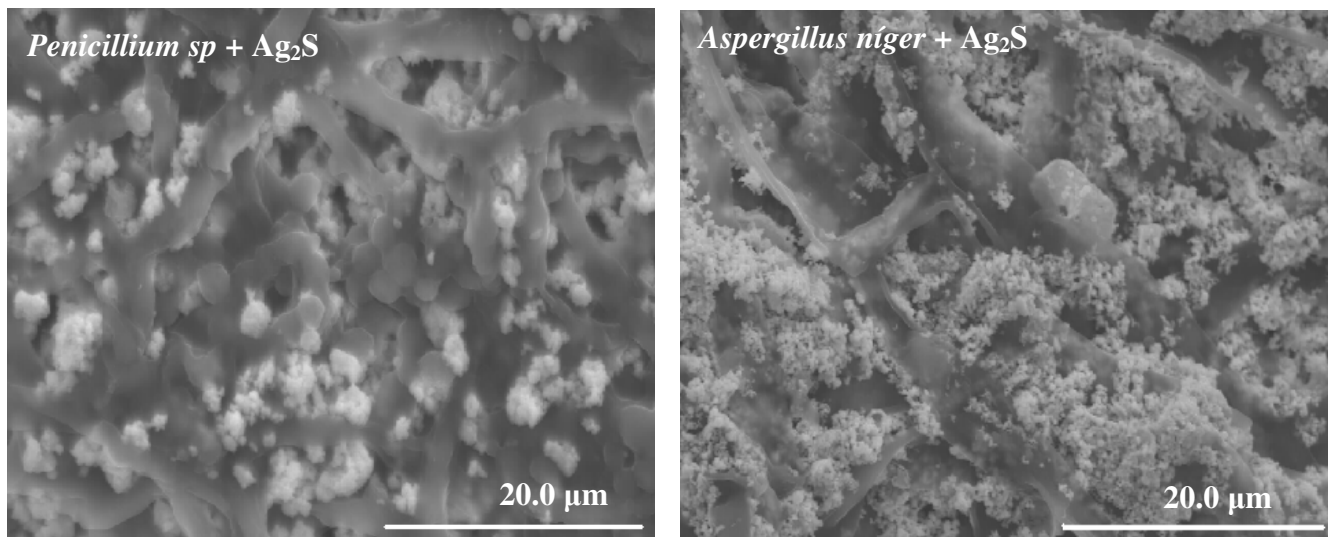
**Figura 2.22;** a) Imagem de SEM do *Aspergillus niger* exposto ao nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S durante 48 horas; b) Imagem de SEM com maior ampliação das partículas de SiO<sub>2</sub> com Ag<sub>2</sub>S a cobrir todas as hifas do *Aspergillus niger*.

O tratamento estatístico mostra que a interacção da prata metálica nos dois fungos não é significativamente diferente, mas o Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação directa tem uma interacção significativamente diferente. Para examinar a interacção da prata metálica e da prata iónica, os fungos em estudo (*Penicillium sp* e o *Aspergillus niger*) foram colocados numa solução de Ringer e expostos à prata metálica e à prata iónica (Ag<sub>2</sub>S) durante 48 horas.

As figuras 2.23 e 2.24 mostram imagens de SEM de ambos os fungos com prata metálica e com prata iónica. A análise de EDS na superfície dos fungos com Ag<sub>2</sub>S mostraram picos de enxofre e prata e a análise de EDS na superfície dos fungos com prata metálica mostraram picos exclusivamente da prata. As imagens de SEM não demonstram nem as semelhanças da interacção da prata metálica em ambos os fungos nem as diferenças da interacção da prata iónica, mostrando apenas a sua distribuição ao longo das hifas.



**Figura 2.23** Imagens de SEM do *Penicillium sp* e do *Aspergillus niger* expostos à prata metálica durante 48 horas.



**Figura 2.24** Imagens de SEM do *Penicillium sp* e do *Aspergillus niger* expostos à prata iônica (Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação) a durante 48 horas.

#### 2.4.6 Actividade antifúngica de fibras de celulose com SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S

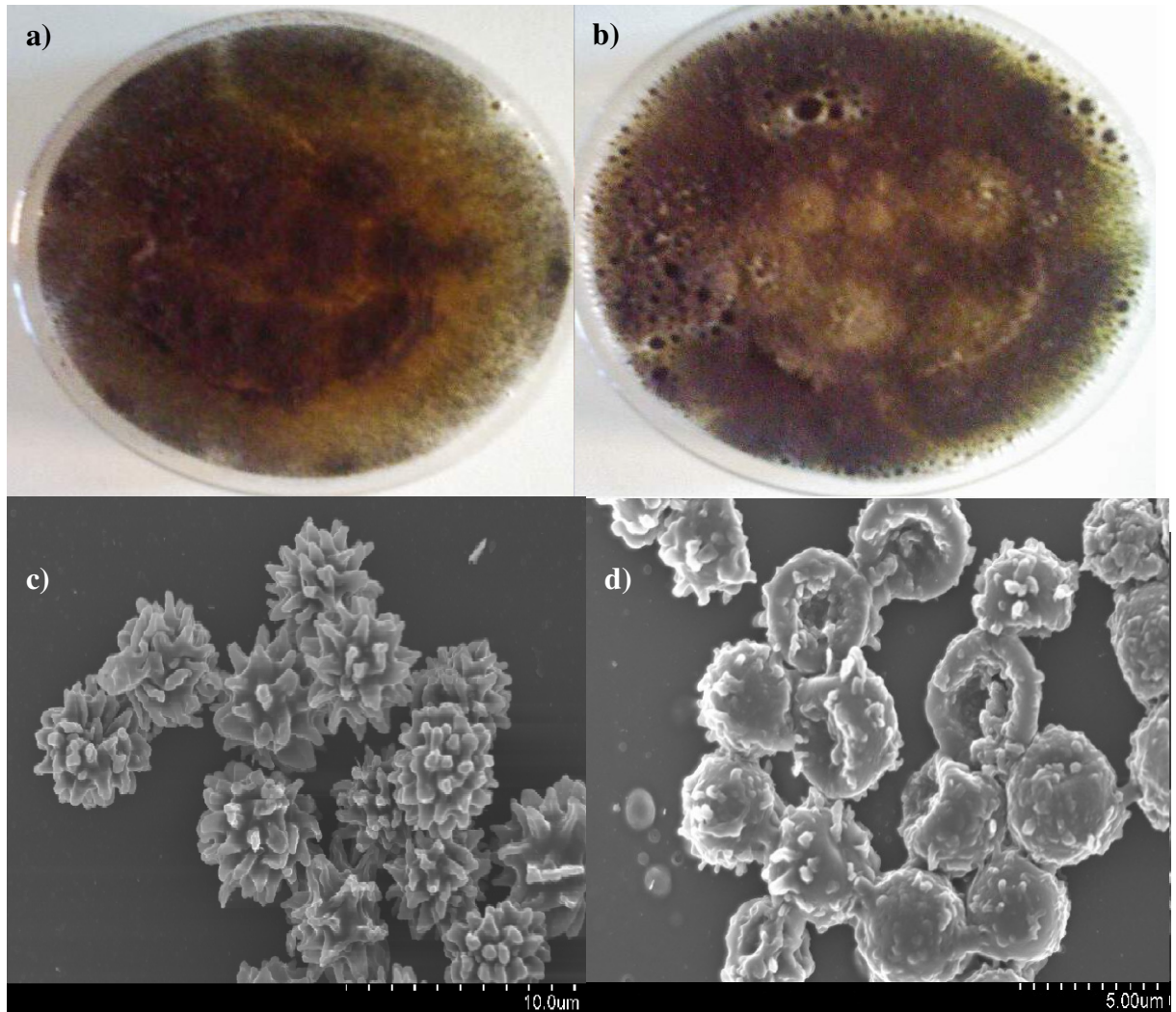
Uma das perspectivas futuras para este trabalho é colocar o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S em fibras de celulose para possível utilização em embalagens de papel para o transporte de fruta. Pelo que há interesse em investigar a actividade do nanocompósito quando este se encontra suportado em fibras de celulose.

Em primeiro lugar preparou-se folhas de papel, umas só com fibras de celulose, outras com SiO<sub>2</sub> suportada em fibras de celulose e ainda outras com SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S suportadas em fibras de celulose (ver capítulo 5). Os resultados de ICP demonstraram que as folhas de papel com nanocompósito continham 0.43 % (mlm) de Ag.

O *Penicillium sp* demonstrou ser bastante resistente a este tipo de estruturas e não apresentou qualquer tipo de inibição no crescimento das sua colónias quando na presença de fibras de celulose ou na presença de fibras de celulose com o nanocompósito. O *Aspergillus níger* também não demonstrou inibição de crescimento talvez devido à baixa quantidade de prata que se encontrava depositada nas folhas de fibras com SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. No entanto, passados oito dias de incubação na estufa a 26.5° C, observou-se a coloração de cinzento das colónias que cresceram em cima da folha de fibras de celulose com SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. O aparecimento de coloração indica a transferência do nanocompósito da folha para as colónias. Essa mesma coloração não foi observada nas folhas com fibras de celulose nem nas folhas com fibras de celulose e SiO<sub>2</sub>.

As imagens de SEM de amostras de colónias de *Aspergillus níger* crescidas na folha de fibras de celulose e na folha de celulose com o nanocompósito encontram-se na Figura 2.24. Estas imagens, quando analisadas por EDS, não mostraram a presença do nanocompósito, mas mostraram esporos adultos completamente destruídos, ou seja, a presença de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S provocou o reventamento dos esporos. Como os esporos são a forma de reprodução dos fungos, estes ao serem destruídos impedem a reprodução do fungo.





**Figura 2.25.** a) Fotografia de uma placa com PDA e uma folha de fibras de celulose no centro, com um crescimento com 8 dias de incubação (*Aspergillus niger*); b) Fotografia de uma placa com PDA e uma folha de fibras de celulose e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S no centro, com um crescimento com 8 dias de incubação; c) imagem de SEM de esporos adultos do *Aspergillus niger* na presença da folha de fibras de celulose; d) ) imagem de SEM de esporos adultos do *Aspergillus niger* na presença da folha de fibra de celulose e o nanocompósito.

Com estes resultados, pode-se concluir que o nanocompósito tem actividade antifúngica quando suportado em fibras de celulose, não sendo a resposta tão eficaz como quando este se encontra sozinho. No entanto, a quantidade de nanocompósito suportado nas fibras de celulose é substancialmente menor.

Posteriormente deve-se investigar estas folhas de papel (fibras de celulose e SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) com uma maior quantidade de prata. Possivelmente o seu efeito inibidor será maior e talvez se consiga observar o decréscimo do número de colónias tanto no *Penicillium sp* como no *Aspergillus níger*.

## 2.5 Conclusão

Em suma, a análise por SEM, TEM, bem como EDS confirmam a deposição do Ag<sub>2</sub>S na superfície das esferas de SiO<sub>2</sub>. Os nanocristais de Ag<sub>2</sub>S suportados em partículas amorfas de SiO<sub>2</sub> mostraram actividade antifúngica tanto no *Penicillium sp* como no *Aspergillus níger*. Esta actividade antifúngica está relacionada com a presença de Ag<sub>2</sub>S e depende de vários parâmetros: o tempo de exposição, concentração e quantidade de prata no nanocompósito. Neste capítulo pôde-se confirmar também que a prata metálica têm maior actividade antifúngica do que a prata iónica e que diferentes materiais com Ag<sub>2</sub>S apresentam diferenças na inibição no crescimento dos dois fungos. O modo de preparação dos compostos tem bastante influência na inibição dos fungos.

## 2.6 Referências

- 
- <sup>1</sup> Spanhel L.; Haase M.; Weller H.; Henglein A., *Journal Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 5649.
  - <sup>2</sup> Chang S.; Liu L.; Asher S. A., *Journal Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 6739.
  - <sup>3</sup> Monteiro O. C., Esteves A. C. C., Trindade T., *Chem Mater*, **2002**, 14, 2900.
  - <sup>4</sup> Neves M. C., Soares J., Hempelmann R., Monteiro T., Trindade T., *Journal of Chystal Growth*, **2005**, 279, 433.
  - <sup>5</sup> Hao E.; Sun H.; Zhou Z.; Yang B.; Shen J., *J. Chem Mater*, **1999**, 11, 3056.
  - <sup>6</sup> Zhou H. S.; Honma I.; komiyoma H.; Haus J. W., *Journal Phys. Chem*, **1993**, 97, 895.
  - <sup>7</sup> Dabbous B. O.; Rodriguez-Viejo J.; Mikulec F.V.; Heine J. R.; Mattoussi H.; Ober R.; Jensen K. F.; Bawendi M. G., *J. Phys. Chem B*, **1997**, 101, 9463.



- 
- <sup>8</sup> Talapin D. V.; Rogach A. L.; Kornowski A.; Haase M.; Weller H., *Nano Letter*, **2001**, 1, 207.
- <sup>9</sup> Peng X.; WSchalamp M. C.; Kadavanich A.V.; Alivisatos A. P. H., *J. Am. Chem Soc.*, **1997**, 119, 7019.
- <sup>10</sup> Petit C., Lixon P., Pileni M., *J. Am. Chem. Soc.* , **1993**, 97, 12974.
- <sup>11</sup> Pol V. G.; Srivastava D. N.; Palchik O.; Palchick V.; Slifkin M. A.; Weiss A. M.; Gedanken A., *Langmuir*, **2002**, 18, 3352.
- <sup>12</sup> Kobayashi Y.; Salgueiriño-Maceira V.; Liz-Marzan L. M., *Chem Mater*, **2001**, 13, 1630.
- <sup>13</sup> Wada Y., Kaneko M., Niinobe D., Tsukahara Y., *Chemestry letters* **2005**,12, 34.
- <sup>14</sup> Tong M. C., Chen W., Sun J., Ghosh D., Chen S., *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 19238.
- <sup>15</sup> Fateixa S.; *Desenvolvimento de nanopartículas de prata em suportes sólidos com acção fungicida*; Projecto de Final de Curso em Química Industrial e Gestão, Universidade de Aveiro **2006**.
- <sup>16</sup> Sánchez-Cortés S., Vasina M., Francioso O., García-Ramos J. V., *Vibrational Spectroscopy* **1998**, 17, 133.
- <sup>17</sup> Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E., *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, 26, 62.
- <sup>18</sup> Blute I., Pugh R. J., Pas J. v., Callaghan I.; *Journal of Colloid and Interface Science*, **2007**, 313, 645.
- <sup>19</sup> Bu K., Moudgil B. M., *Mater. Res. Soc. Symp. Proc*, **2005**, 867, W8.5.1.
- <sup>20</sup> Armelao L., Colombo P., Fabrizio M., gross S., tondello E., *J. Mater Chem*. **1999**, 9, 2893.
- <sup>21</sup> [www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR004.htm](http://www.ufv.br/dbg/trab2002/MELHOR/MHR004.htm) (26 - 08 - 07).
- <sup>22</sup> Semikina, A. L., Skulachev, V. P., *FEBS Letters*, **1990**, 269, 69.
- <sup>23</sup> Oh, S.; Lee, S.; Choi, S.; Lee, I.; Lee, Y; Chun, J.; Park, H., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. aspects*, **2006**, 275, 228.
- <sup>24</sup> Keleher, J.; Bashant, J.; Heldt N.; Johnson, L.; Li, Y., *World of microbiology & Biotechnology*, **2002**, 18, 133.

### *3 Capítulo*

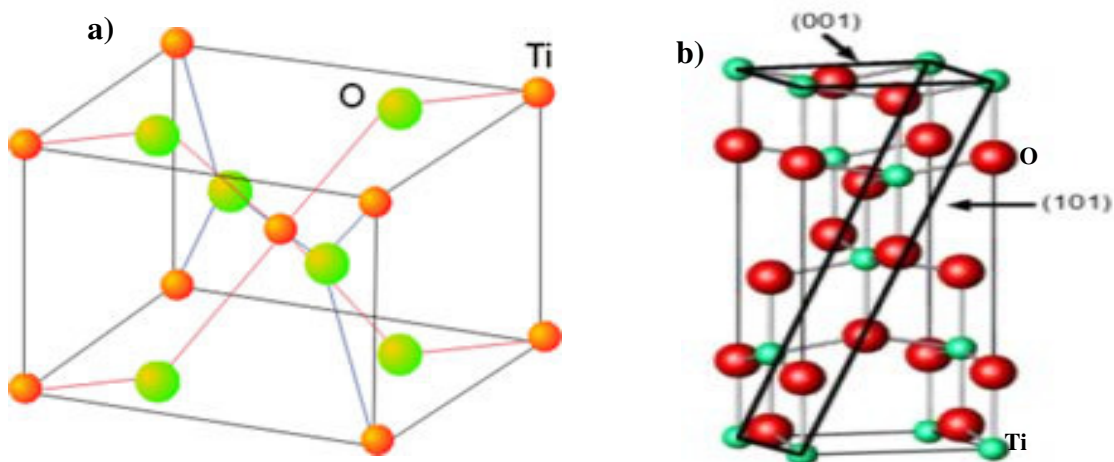
## *Nanoestructuras de $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$*

### 3.1 Introdução

Nos últimos anos, sistemas nanoestruturados ou nanocompósitos inorgânicos, tais como semicondutor/semicondutor<sup>1-6</sup>, semicondutor/metal<sup>7</sup>, metal/semicondutor<sup>8-10</sup>, metal/metal<sup>11,12</sup> e metal/óxido metálico<sup>13-15</sup>, têm vindo a ser objecto de um número crescente de estudos devido ao elevado interesse que lhes está associado. Um nanocompósito, como foi dito no capítulo anterior, é um material em que pelo menos um dos componentes tem dimensões nanométricas. Tal como acontece nos compósitos tradicionais, um dos componentes serve de matriz, na qual as partículas do segundo material se encontram dispersas<sup>16</sup>.

O dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), também conhecido por óxido de titânio (IV) ou titânia, é um semicondutor muito estudado, em várias aplicações, desde a pintura e protecção solar até como corante alimentar<sup>17,18</sup>. Quando é utilizado como pigmento, é normalmente designado por titânio branco, pigmento branco Pw – 6 ou CI 77891<sup>19</sup>.

O TiO<sub>2</sub> cristaliza normalmente em dois tipos de estruturas: o rútilo (tetragonal de hábito prismático) e a anátase (tetragonal de hábito actaédrico)<sup>20</sup>. As estruturas destas duas formas cristalinas do TiO<sub>2</sub> estão representadas na figura 3.1



**Figura 3.1** a) Esquema representativo da forma do rútilo<sup>21</sup>; b) esquema representativo da forma da anátase<sup>22</sup>.

Na maioria dos sistemas envolvendo reacções fotocatalíticas com o TiO<sub>2</sub>, a fase anátase apresenta maior actividade do que a fase rútilo<sup>23</sup>. No entanto, tem sido demonstrado na literatura que a fase rútilo é muito mais eficiente na catálise de decomposição do gás H<sub>2</sub>S do que a anátase, quando ambas as fases se encontram em forma de pó cristalino com aproximadamente a mesma área superficial<sup>24</sup>.

O TiO<sub>2</sub> tem sido muito investigado em aplicações fotocatalíticas. Recentemente tem vindo a ser utilizado como matriz em nanocompósitos. Por exemplo, partículas de metais nobres, tais como Pt, Au e Ag, e semicondutores como o Ag<sub>2</sub>S, CdS e CdSe têm sido dispersas em matrizes de TiO<sub>2</sub> pois estas melhoram a actividade fotocatalítica<sup>7,18</sup>.

Há muito tempo que se documenta as propriedades de esterilização fotocatalítica do TiO<sub>2</sub><sup>25-28</sup>. O primeiro trabalho de investigação sobre o efeito antimicrobiano de reacções fotocatalíticas do TiO<sub>2</sub> foi feito com a bactéria *Escherichia coli*<sup>25</sup> e, posteriormente, conduzido a um vasto número de organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, algas e células cancerígenas<sup>29,30</sup>.

Na última década, o TiO<sub>2</sub> tem vindo a ser utilizado como um material de limpeza e esterilização de muitos utensílios clínicos, tais como utensílios sanitários, utensílios de cozinha e material de utilidade hospitalar<sup>31</sup>. Recentemente, foi aprovado pela “*American Food and Drug Administration*”(FDA) o uso do TiO<sub>2</sub> em drogas, cosméticos e como componente em materiais que estão em contacto com alimentos<sup>31</sup>.

Ao longo dos anos, tem vindo a ser descrito na literatura inúmeras aplicações no controlo e prevenção de microrganismos em alimentos. A inactivação da *Escherichia coli* e a decomposição das suas endotoxinas foi observada na presença de TiO<sub>2</sub> sobre a forma de pós, em colóides e filmes<sup>25,27,32-34</sup>. Quando exposto à luz solar ou luz ultra violeta, o TiO<sub>2</sub> também exhibe actividade antimicrobiana devido às suas fortes propriedades oxidativas.

Em 1999, Maness e colaboradores explicaram que, quando partículas irradiadas de TiO<sub>2</sub> estão em contacto com micróbios, por exemplo, a superfície microbiana é o primeiro alvo do ataque oxidativo inicial. Espécies com oxigénio reactivo, tais como radicais hidroxilos, aniões superóxidos, e peróxido de hidrogénio, criados na superfície das partículas irradiadas de TiO<sub>2</sub>, promovem, inicialmente, a peroxidação de compostos polinsaturados

fosfolipídicos dos lípidos dos microrganismos<sup>27</sup>. Uns anos mais tarde, Kuhn e colaboradores mostraram através de observações por SEM que a destruição microbiana se devia a danos directos na parede celular, causados por radicais hidroxilos (OH·)<sup>35</sup>.

Apesar da actividade antimicrobiana do TiO<sub>2</sub> puro, alguns investigadores aperceberam-se dos efeitos notáveis que fases metálicas ou semicondutoras têm no melhoramento da sua fotoactividade. Como é bem conhecido, a prata metálica e os iões prata apresentam elevada actividade antimicrobiana<sup>36</sup>. Aliás, os iões prata são uma componente efectiva na maior parte dos agentes antibacterianos inorgânicos. Assim, a introdução de iões prata na superfície do TiO<sub>2</sub> conduza uma melhoria na actividade antimicrobiana do TiO<sub>2</sub><sup>36</sup>.

Neste capítulo investigou-se o efeito antifúngico do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, utilizando uma metodologia análoga à descrita no capítulo anterior em dois fungos que contaminam alimentos.

## 3.2 Síntese do nanocompósito

### 3.2.1 Dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>)

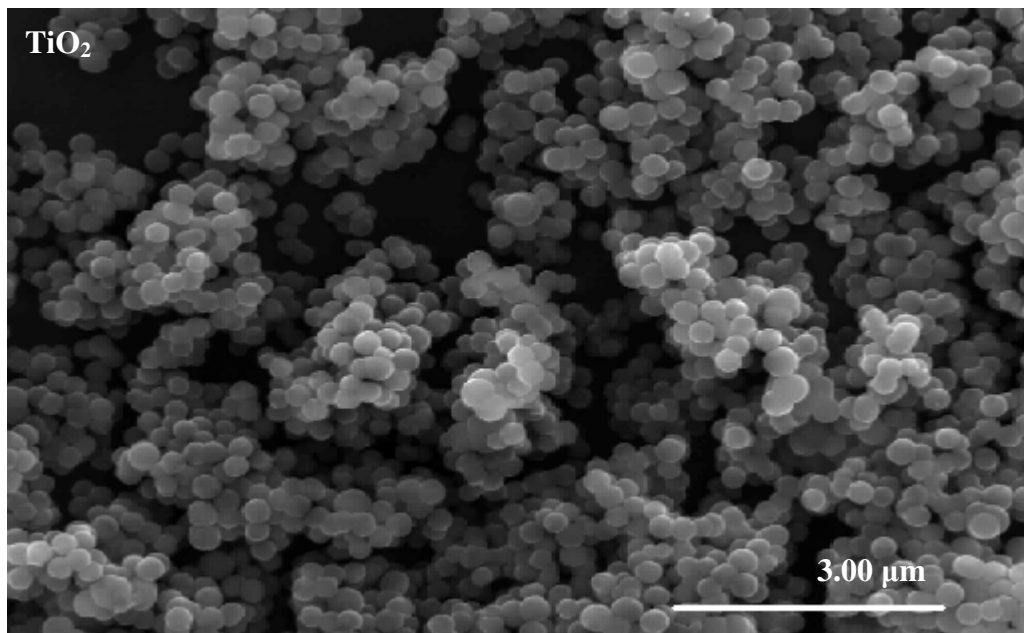
#### Síntese do TiO<sub>2</sub>

Produzir partículas com tamanho e morfologia específica é um dos aspectos primários para o desenvolvimento de novos materiais. Eiden – Assmann e colaboradores<sup>37</sup>, em 2003, descreveram um método para preparar nanopartículas esféricas bem definidas de TiO<sub>2</sub>, com boa distribuição de tamanhos e que, ao variar os parâmetros de reacção, permite controlar as dimensões das esferas. Este método consiste em reacções de hidrólise e condensação a partir de precursores inorgânicos (tetraetóxido de titânio) na presença de um sal (KCl) com etanol. Neste trabalho preparou-se nanopartículas esféricas de TiO<sub>2</sub> utilizando o método acima descrito, variando apenas a concentração do sal usado (método experimental descrito mais detalhadamente no capítulo 5).

Antes de utilizadas, as partículas esféricas de TiO<sub>2</sub> amorfo, foram sujeitas a um tratamento térmico, a 500°C e durante 4 horas, com a finalidade de obter a fase cristalina anátase. Após a calcinação, as esferas de TiO<sub>2</sub> foram caracterizadas por SEM e os resultados electroforéticos foram obtidos pela análise do potencial zeta. Para analisar o diâmetro das partículas utilizou-se a técnica instrumental potencial zeta (ZetaSizer) e SEM.

### Caracterização das nanopartículas esféricas de TiO<sub>2</sub>

A imagem de SEM ilustra perfeitamente que nanopartículas uniformes de TiO<sub>2</sub> com uma morfologia esférica sem aglomeração podem ser obtidas pela adição de um sal, como por exemplo o KCl. A figura 3.2 apresentada abaixo mostra as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> com morfologia uniforme e um tamanho médio aproximado de 300 nm.



**Figura 3.2** Imagem de SEM de partículas de TiO<sub>2</sub> (cortesia de M. C. Neves).

A variação da concentração do sal KCl tem um efeito significativo no tamanho e distribuição de tamanhos das partículas. Pode-se também variar o tamanho e a distribuição

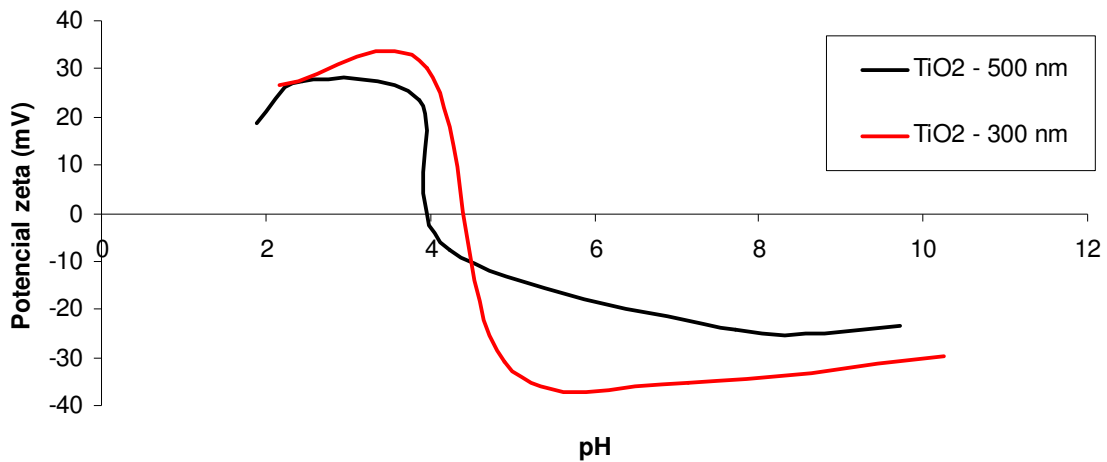
das nanopartículas, adicionando um agente estabilizador polimérico à solução de etanol com o tetraetóxido de titânio. Contudo, a utilização deste polímero só proporciona tamanhos de partículas entre 700 a 1200 nm enquanto que a utilização de um sal como o KCl, com diferentes concentrações, proporciona tamanhos de partículas entre 50 a 900 nm<sup>37</sup>.

### Determinação do potencial zeta ( $\zeta$ )

O tamanho e a distribuição de tamanhos das partículas do TiO<sub>2</sub> são de extrema importância pois afectam as propriedades deste colóide, tais como a reologia e a área superficial. Contudo, para impedir a agregação de partículas pequenas em unidades maiores, outros passos devem ser tomados para prevenir que partículas se juntem (agregação) devido às colisões inter – partículas em meio líquido. A solução passa pela criação de uma barreira energética eléctrica e/ou “steric” inter – partículas, variando, por exemplo, a força iónica do meio<sup>38</sup>.

Como já foi dito no capítulo anterior, a força da barreira eléctrica da partícula, em termos de um potencial eléctrico, é denominada por potencial zeta. O potencial zeta deve ser medido em condições específicas, por exemplo, não diluir previamente a amostra pois, com a diluição, a quantidade de iões adsorvidos à superfície da partícula pode variar, alterando o potencial zeta<sup>38</sup>. A posição do ponto isoeléctrico é uma importante característica da superfície da partícula e depende de vários factores tais como o tipo de ligação do óxido, o tipo de estrutura cristalina da partícula, o tipo de fase (rútilo (pH = 6) ou anátase (pH = 4)) e do nível de impurezas ou de outras espécies ligadas à superfície da partícula, neste caso, na superfície do TiO<sub>2</sub>.

A Figura 3.3 representa o potencial zeta de nanopartículas pequenas de TiO<sub>2</sub> de diferentes tamanhos (500 e 300 nm) em função do pH. Os sistemas de TiO<sub>2</sub> estudados têm um potencial zeta igual a zero (ponto isoeléctrico) a rondar o pH = 4.0, como era de esperar já que estamos na presença de TiO<sub>2</sub> na fase anátase (calcinação do TiO<sub>2</sub> a 500°C por 4 horas).



**Figura 3.3** Potencial Zeta de nanopartículas esféricas de TiO<sub>2</sub> em função do pH.

Uma informação importante que se pode retirar a partir do gráfico é que estes sistemas de TiO<sub>2</sub> são instáveis e agregam-se facilmente na região de pH = 3 a pH = 5 para ambas as amostras de TiO<sub>2</sub>. Pela figura 3.3 observa-se que a região de estabilidade coloidal é a pH aproximadamente 6.0 ou superior. Nada se pode concluir sobre a variação do potencial zeta para valores de pH superiores ou iguais a 10.0 pois não se obteve valores de potencial zeta para esses valores de pH.

### **Comparação de métodos de análise de diâmetros de partículas á escala nanométrica**

No capítulo anterior compararam-se os valores dos diâmetros das partículas de SiO<sub>2</sub> preparadas, obtidos por tratamento de imagem com um programa de computador (Image J) e pelo instrumento ZetaSizer. Nesta secção comparou-se os valores dos diâmetros das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> pelos mesmos métodos. As médias com os respectivos desvios padrões do diâmetro das nanopartículas analisadas estão descritas na tabela 3.1.



Tabela 3.1 Diâmetro das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> preparadas.

Diâmetro das partículas	Método Analítico (Análise por computador)			Método proposto (Análise pelo ZetaSizer)		
	Média	Desvio padrão	Tamanho da amostra	Média	Desvio padrão	Tamanho da amostra
TiO <sub>2</sub> de 500 nm	502	100	n = 123	509	98	n = 40
TiO <sub>2</sub> de 300 nm	303	70	n = 90	325	42	n = 40

Como foi dito no capítulo anterior, se tivermos grandes amostras ( $n > 30$ ) de uma população, as médias amostrais terão distribuição normal mesmo que os dados originais não tenham distribuição normal. Como todas as amostras são superiores a 30, para a comparação dos dois métodos utilizou-se novamente o teste Z. Se as médias não forem significativamente diferentes quer dizer que o método proposto registra resultados coerentes e não significativamente diferentes do método analítico

Neste caso, as hipóteses a formalizar são:

H<sub>0</sub>: Os métodos não são significativamente diferentes ( $\mu_1 = \mu_2$  quando  $\sigma^2$  é conhecido)

H<sub>1</sub>: Os métodos são significativamente diferentes ( $\mu_1 \neq \mu_2$ ).

Como as variâncias entre os métodos não são iguais, o teste Z é calculado pela equação 1.3. O valor de  $Z_{tab}$  é 1.96 com um  $\alpha$  de 0.05. Os resultados obtidos pelo teste Z estão descritos na tabela 3.2.

Tabela 3.2 Resultados do teste Z na comparação das médias dos diâmetros das partículas de TiO<sub>2</sub> por dois métodos distintos

	Teste Z
TiO <sub>2</sub> de 500 nm	Não significativamente diferentes
TiO <sub>2</sub> de 300 nm	Significativamente diferentes

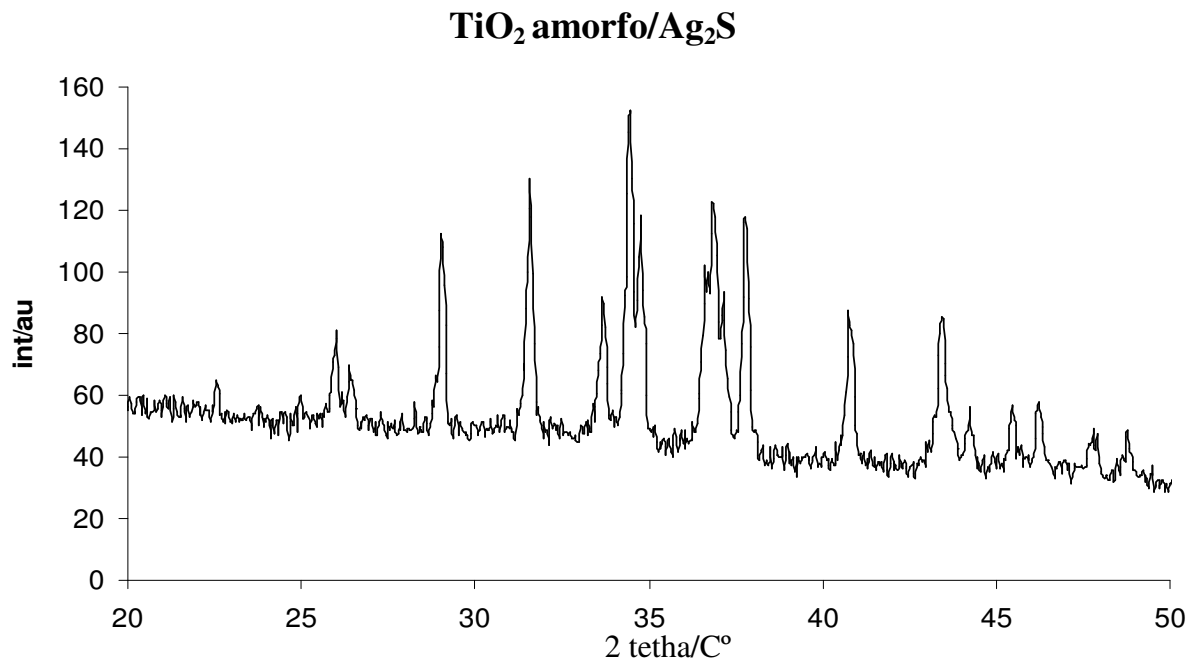
Estes resultados só vieram reforçar o que foi dito no capítulo anterior, ou seja, só se observou, novamente, a rejeição da hipótese do nulo para partículas de TiO<sub>2</sub> com tamanhos de 300 nm. Uma explicação possível para este caso reside no facto de em suspensão, poder ocorrer a formação de agregados. Portanto, com este teste, pode-se concluir que as medidas obtidas pelo instrumento ZetaSizer são coerentes com os resultados obtidos por SEM, para as nanopartículas de 500 nm.

### 3.3 Caracterização estrutural e morfológica dos nanocompósitos

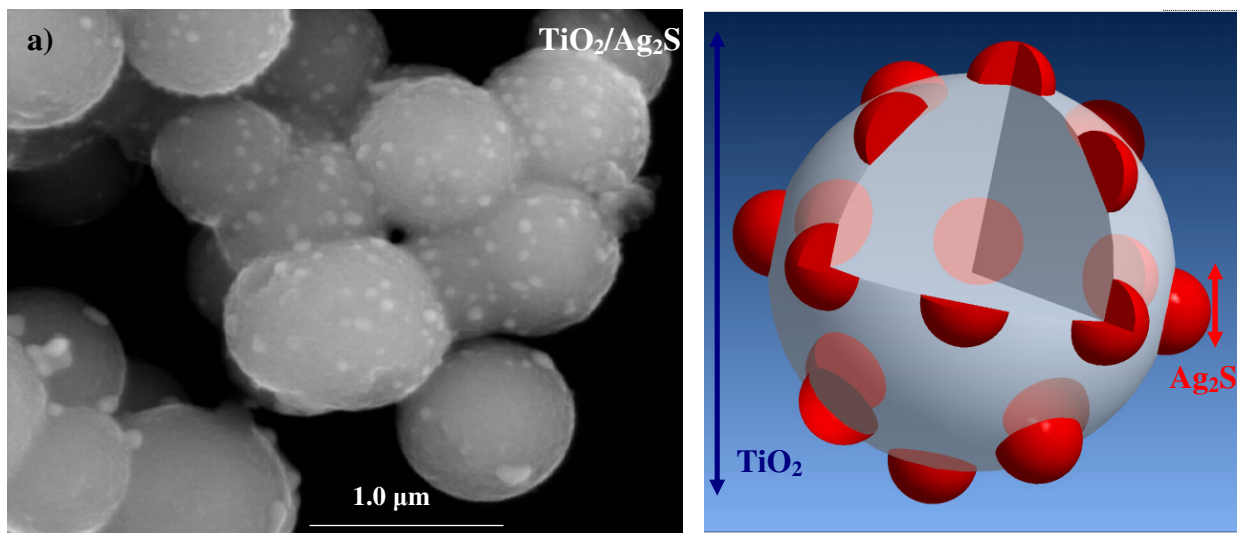
O precursor unimolecular utilizado para a deposição de Ag<sub>2</sub>S sobre partículas de TiO<sub>2</sub> foi o composto Ag[S<sub>2</sub>CNEt<sub>2</sub>]. A decomposição deste precursor e posterior deposição do semicondutor sobre as partículas de TiO<sub>2</sub>, em solução de acetona, na presença de 1,2 – diaminopropano, à temperatura de refluxo, resultou nos nanocompósitos TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. Com o passar do tempo de reacção, assistiu-se a uma mudança de cor da suspensão de amarela pálida para cinzento-escuro. Os compósitos preparados foram centrifugados e lavados abundantemente com acetona e posteriormente caracterizados por várias técnicas instrumentais de análise de entre as quais se destacam a difracção de raios X de pós, análises por ICP e Potencial Zeta, SEM e TEM associadas a análises por EDS.

A Figura 3.4 mostra o difractograma de raios X de pós de uma amostra do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. O difractograma apresenta picos para valores de 2θ de 26.3, 29.0, 31.5, 34.4, 36.6, 37.7 e 43.4, como já era de esperar, e que se encontram de acordo com a presença de partículas de Ag<sub>2</sub>S (acantite). O TiO<sub>2</sub> não foi calcinado nesta amostra presente como substrato para que se pudesse observar os picos da fase Ag<sub>2</sub>S sem interferências do substrato.

O estudo da morfologia das nanoestruturas preparadas foi realizado por SEM e TEM. A figura 3.5 mostra uma imagem de SEM e um esquema onde se pode observar a estrutura morfológica dos compostos de TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, após um tempo de reacção de 8 horas. As imagens de SEM indicam que as ilhas de Ag<sub>2</sub>S se formaram sobre a superfície das partículas do TiO<sub>2</sub> sem as cobrir totalmente. As análises de EDS executadas na superfície dos nanocompósitos mostraram picos de S e Ag, bem como de Ti devido ao substrato.

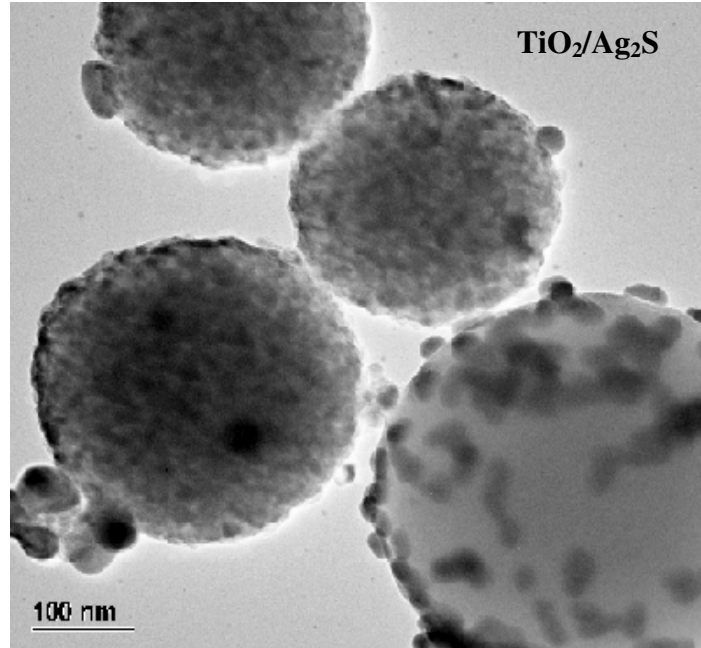


**Figura 3.4** Difractograma de raios X de pós do nanocompósito  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$ .



**Figura 3.5** a) Imagem de SEM do nanocompósito  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$ , ao fim de 8 horas de reacção; b) esquema da estrutura do nanocompósito de  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  (cortesia de M. Martins).

A figura 3.6 mostra uma imagem de TEM de partículas do nanocompósito de  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  onde se observam ilhas constituídas por aglomerados de pequenos nanocristais do semicondutor  $\text{Ag}_2\text{S}$  à superfície do  $\text{TiO}_2$ .



**Figura 3.6** Imagem de TEM do nanocompósito  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$ , ao fim de 8 horas de reacção (cortesia de M. C. Neves).

A microscopia electrónica não nos fornece dados concretos sobre o teor de prata contido nos nanocompósitos preparados com diferentes tamanhos de partículas de  $\text{TiO}_2$  (500 e 300 nm). Para a obtenção de valores concretos da quantidade de prata presente nos nanocompósitos preparados, recorreu-se à análise de ICP, que indicou 1.69 e 2.64 % m/m de prata para os nanocompósitos  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  de 500 nm e 300 nm, respectivamente.

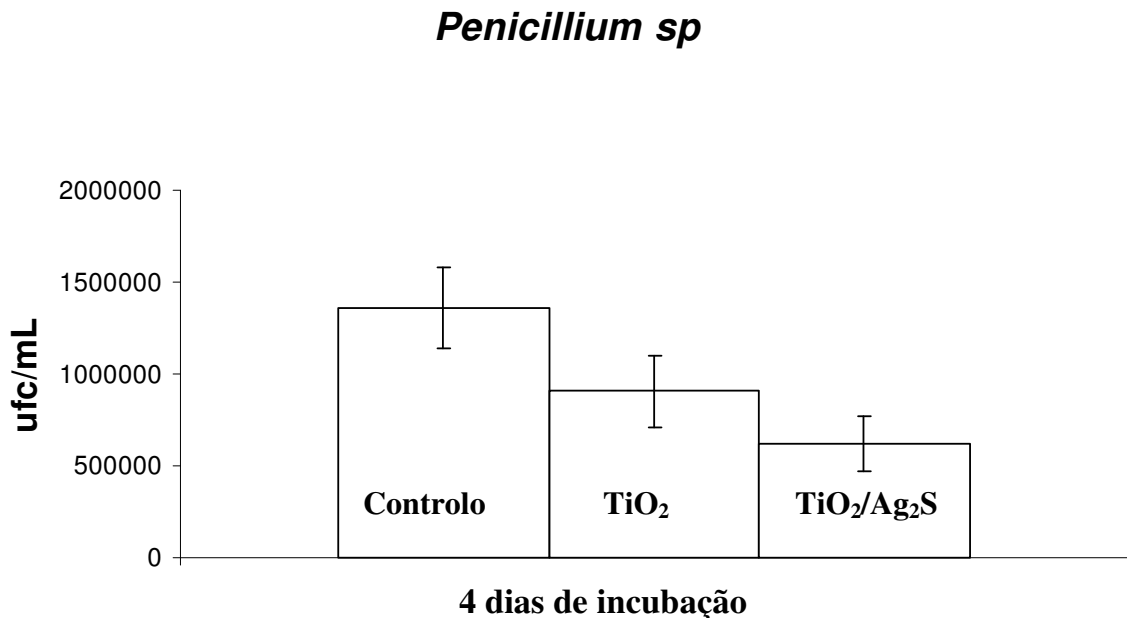
### 3.4 Efeito fungicida e tratamento estatístico de dados

Nesta secção estudou-se a actividade antifúngica do  $\text{TiO}_2$  e do  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  em fungos que contaminam alimentos (*Penicillium sp* e *Aspergillus niger*). Foi estudado o efeito da dimensão das partículas de  $\text{TiO}_2$  e da quantidade de prata no nanocompósito. Também se

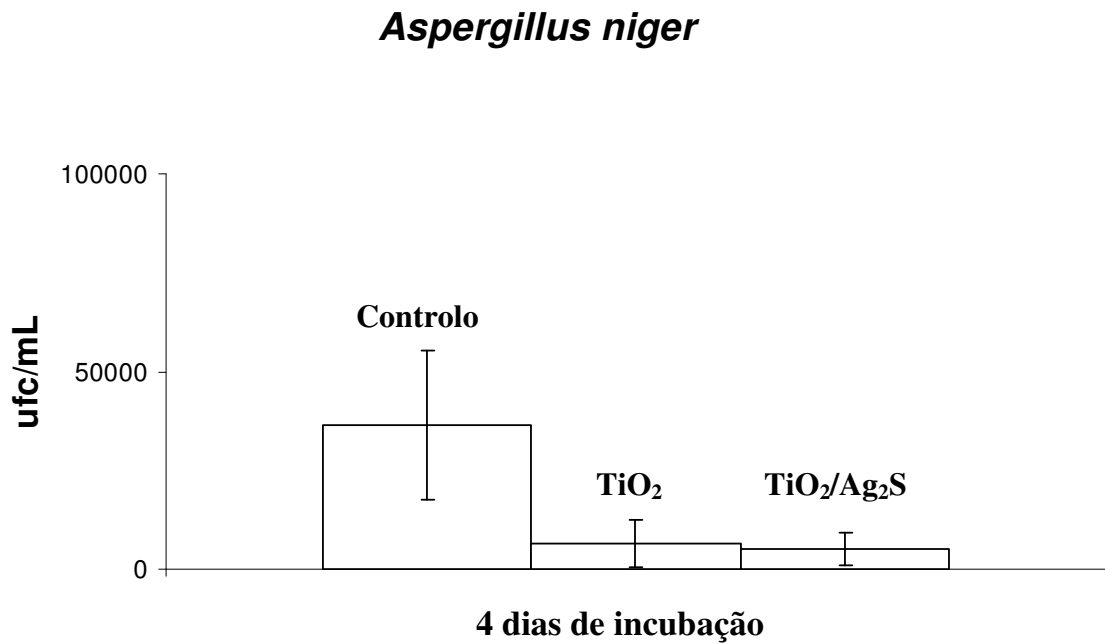
estudou a actividade antifúngica do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S comparando-o com a prata metálica e a prata iónica (Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação directa).

### 3.4.1 Actividade antifúngica de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S

Em primeiro lugar, investigou-se, em simultâneo, a actividade antifúngica do TiO<sub>2</sub> (300 nm) e do TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (300 nm). O *Aspergillus niger* e o *Penicillium sp* foram semeados em placas de petri com PDA na presença de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (10 mg). A figura 3.7 e 3.8 mostram a densidade fúngica dos dois fungos nas placas com PDA depois de quatro dias de incubação numa estufa a 26.5 °C, na presença de TiO<sub>2</sub>, do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S e um teste de controlo. Estes resultados demonstram claramente que o TiO<sub>2</sub> tem actividade antifúngica mas que esta é ligeiramente menor do que a do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. Estes resultados sugerem portanto que a deposição de nanocristais de Ag<sub>2</sub>S proporcionam um aumento na actividade antifúngica do TiO<sub>2</sub>.



**Figura 3.7** Efeito das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e de TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S no crescimento das colónias do *Penicillium sp*.



**Figura 3.8** Efeito das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e de TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S no crescimento das colónias do *Aspergillus niger*.

A equação 2.1, como foi explicado no capítulo 2, representa a percentagem de inibição (Pi) do fungo ao material inorgânico estudado. Neste ponto temos 33.3 e 54.4 % de inibição do crescimento das colónias do *Penicillium sp* com TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, respectivamente. Para o *Aspergillus niger* observa-se 82.8 e 86.2 % de inibição para o TiO<sub>2</sub> e para o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, respectivamente. Conclui-se, portanto, que o nanocompósito tem um maior efeito na diminuição do crescimento dos fungos do que o TiO<sub>2</sub> e que a inibição parece ser diferente para os dois fungos, sendo maior para o caso do *Aspergillus niger*.

Todos os testes microbianos efectuados foram submetidos a um tratamento estatístico, tal como no capítulo 2. Para a realização deste tratamento estatístico, utilizou-se novamente a metodologia do teste F e do teste t para comparação de duas médias discutidas no capítulo 1. O primeiro passo efectuado foi a determinação das hipóteses alternativas e posteriormente à comparação do efeito inibidor do material em estudo em cada fungo e

depois entre os dois fungos. É de salientar que esta metodologia foi utilizada em todos os teste microbiais e o nível de confiança determinado foi  $\alpha = 0.05$ .

**Comparação do efeito inibidor do TiO<sub>2</sub> e do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S em cada fungo**

H<sub>0</sub> = A inibição do crescimento não é significativamente diferente logo os materiais estudados (TiO<sub>2</sub> e o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) têm o mesmo efeito inibidor para cada um dos fungo.

H<sub>1</sub> = A inibição do crescimento é significativamente diferente logo os materiais estudados (TiO<sub>2</sub> e o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) não têm o mesmo efeito inibidor para cada um dos fungo.

**Tabela 3.3** Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do TiO<sub>2</sub> e do TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S em cada fungo.

	<i>Penicillium sp</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S
<b>Cg</b>	1.36E06	1.36E06	3.63E04	3.63E04
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>Tg</b>	9.06E05	6.20E05	6.25E03	5.00E03
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	4.81E10	4.81E10	3.56E08	3.56E08

$s_{Tg}^2$	3.78E10	2.35E10	5.63E07	1.67E07
$s_{Pi}^2$	3.20E-02	1.82E-02	5.09E-02	1.78E-02
<b>% Inibição</b>	33.3	54.4	82.8	86.2
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	

Os resultados apresentados na tabela 3.3 confirmam que a inibição do crescimento dos dois fungos com TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S não é significativamente diferente. Este resultado pode estar relacionados com o facto do TiO<sub>2</sub> apresentar efeito inibidor forte tanto no *Penicillium sp* e no *Aspergillus niger*. Ao adicionar Ag<sub>2</sub>S, o nanocompósito resultante terá um efeito inibidor maior, contudo a interação dos dois materiais com os fungos não vai ser significativamente diferente.

#### **Comparação do efeito inibidor do TiO<sub>2</sub> e do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S para os fungos**

H<sub>0</sub> = A inibição do número de colónias não é significativamente diferente nos dois fungos logo o composto estudado (TiO<sub>2</sub> ou o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos.

H<sub>1</sub> = A inibição do número de colónias é significativamente diferente nos dois fungos logo o composto estudado (TiO<sub>2</sub> ou o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) não tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos.



**Tabela 3.4** Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do TiO<sub>2</sub> e do TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S nos dois fungos.

	TiO <sub>2</sub>		TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Cg</b>	1.36E06	3.63E04	1.36E06	3.63E04
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>Tg</b>	9.06E05	6.25E03	6.20E05	5.00E03
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	4.81E10	3.56E08	4.81E10	3.56E08
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	3.78E10	5.63E07	2.35E10	1.67E07
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	3.20E-02	5.09E-02	1.82E-02	1.78E-2
<b>% Inibição</b>	33.3	82.8	54.4	86.2
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Significativamente diferentes		Significativamente diferentes	

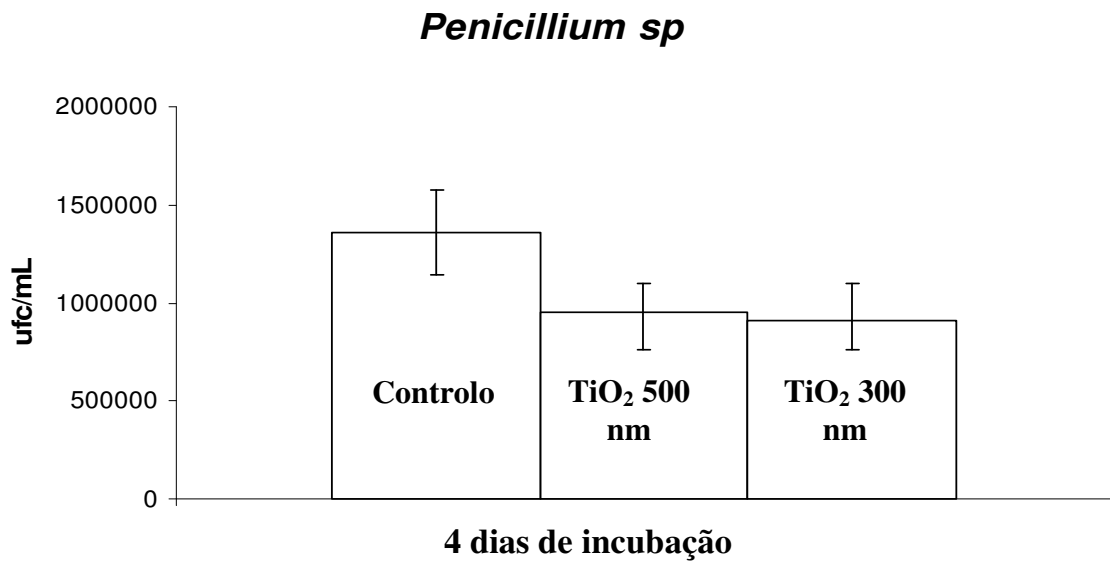
Os resultados da tabela 3.4 mostram que, tanto a inibição com TiO<sub>2</sub> como a inibição com o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, são significativamente diferentes para os dois fungos, logo rejeita-se a hipótese do nulo. Estes resultados sugerem que a interacção entre os materiais estudados (TiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) não é a mesma para os dois fungos.

### **3.4.2 Actividade antifúngica de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> de diferentes tamanhos**

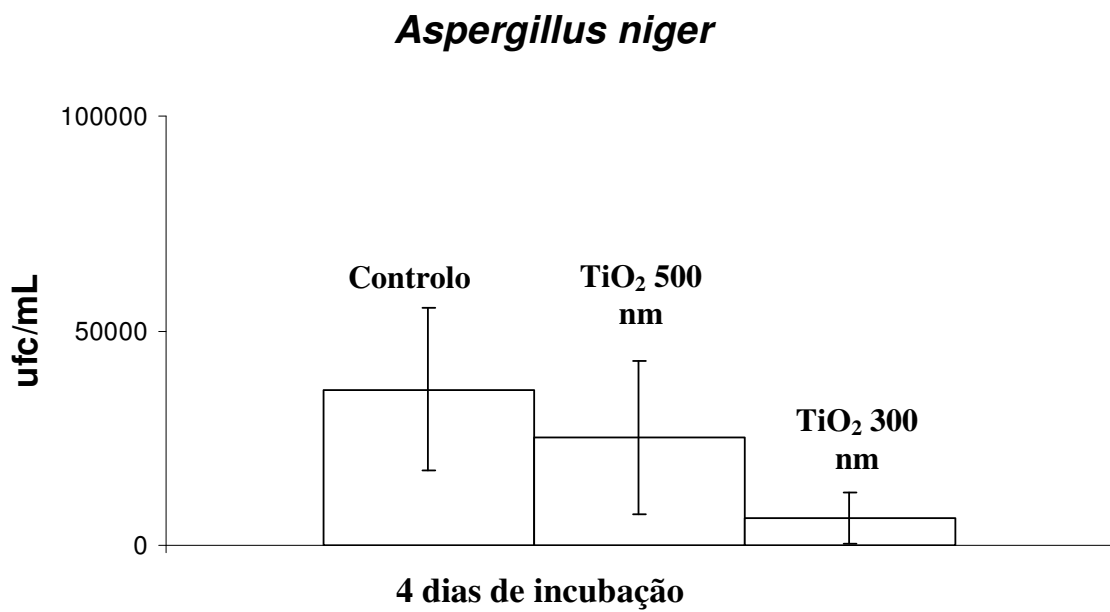
Os fungos, *Aspergillus niger* e *Penicillium sp*, foram semeados em placas de petri com PDA na presença de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> com diferentes tamanhos (500 nm e 300 nm de diâmetro). As placas foram incubadas a 26.5°C durante 4 dias.

As figuras 3.9 e 3.10 mostram o crescimento de *Penicillium sp* e de *Aspergillus niger* com 4 dias de incubação na presença de TiO<sub>2</sub> com tamanho de partículas de 300 e 500 nm e do teste controlo. Estes resultados sugerem que o tamanho da partícula de TiO<sub>2</sub> não provoca uma diferença significativa na actividade antifúngica quando se usa o *Penicillium sp*, mas tem influência na inibição do crescimento de *Aspergillus niger*. Estes resultados sugerem, mais uma vez, que a interacção do TiO<sub>2</sub> nos dois fungos é significativamente de diferente, dependendo se se trata de *Aspergillus niger* ou *Penicillium sp*.

Para o *Penicillium sp*, a percentagem de inibição das suas colónias com as partículas de TiO<sub>2</sub> de 500 e 300 nm foi de 29.6 e 33.3%, respectivamente. As percentagens de inibição das colónias do *Aspergillus niger* quando tratado com TiO<sub>2</sub> de 500 e 300 nm foi de 31.0 e 82.8 %, respectivamente.



**Figura 3.9** Efeito das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro no crescimento das colónias do *Penicillium sp*



**Figura 3.10** Efeito das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro no crescimento das colónias do *Aspergillus níger*.

**Comparação do efeito inibidor do TiO<sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro em cada fungo**

H<sub>0</sub> = A inibição do crescimento não é significativamente diferente logo TiO<sub>2</sub> de 500 nm e TiO<sub>2</sub> de 300 nm têm o mesmo efeito inibidor em cada um dos fungos em estudo.

H<sub>1</sub> = A inibição do crescimento é significativamente diferente logo TiO<sub>2</sub> de 500 nm e TiO<sub>2</sub> de 300 nm não têm o mesmo efeito inibidor em cada um dos fungos em estudo.

**Tabela 3.5** Valores das médias do diâmetro das colônias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor de partículas de TiO<sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro em cada fungo.

	<i>Penicillium sp</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	TiO <sub>2</sub> 500 nm	TiO <sub>2</sub> 300 nm	TiO <sub>2</sub> 500 nm	TiO <sub>2</sub> 300 nm
<b>Cg</b>	1.36E06	1.36E06	3.63E04	3.63E04
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>Tg</b>	9.56E05	9.06E05	2.50E04	6.25E03
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	4.81E10	4.81E10	3.56E08	3.56E08
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	2.03E10	3.78E10	3.17E08	5.63E07
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	2.39E-02	3.20E-02	3.70E-01	5.09E-02

<b>% Inibição</b>	29.6	33.3	31.0	82.8
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	

Os resultados mostram que com o aumento do tamanho das esferas de TiO<sub>2</sub>, a inibição não é significativamente diferente, sugerindo que a interação entre os dois materiais (TiO<sub>2</sub> de 300 e 500 nm) e o *Penicillium sp* é idêntica. O mesmo se observa para a inibição do crescimento de *Aspergillus niger*, os resultados mostram que com o aumento do tamanho das esferas de TiO<sub>2</sub>, a inibição do número de colónias não é significativamente diferente para os dois compostos, sugerindo também, uma interação idêntica entre os dois compostos e o *Aspergillus niger*.

**Comparação do efeito inibidor do TiO<sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro nos dois fungos**

H<sub>0</sub> = A inibição do crescimento não é significativamente diferente logo as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> de 500 ou 300 nm têm o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo

H<sub>1</sub> = A inibição do crescimento é significativamente diferente logo as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> de 500 nm ou 300 nm não têm o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo

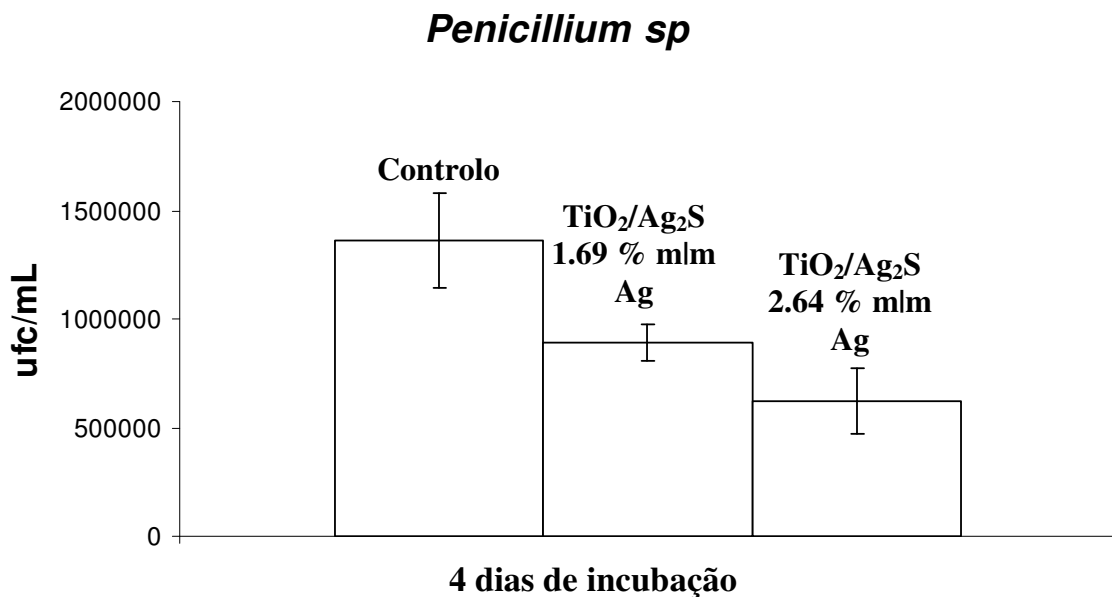
Os resultados na tabela 3.6 mostram que com a diminuição do tamanho das esferas de TiO<sub>2</sub> a inibição do crescimento é significativamente diferente, sugerindo que a interação entre os dois fungos e o TiO<sub>2</sub> com 300 nm não é a mesma. O mesmo não se pode afirmar para a inibição do crescimento dos dois fungos com o TiO<sub>2</sub> de 500nm. Os resultados mostram que com o aumento do tamanho das esferas de TiO<sub>2</sub>, a inibição do crescimento não é significativamente diferente para os dois fungos, sugerindo, uma interação não significativamente diferente entre os dois fungos e as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> de 500 nm

**Tabela 3.6** Valores das médias do diâmetro das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor de partículas de TiO<sub>2</sub> com 500 nm e 300 nm de diâmetro nos dois fungos.

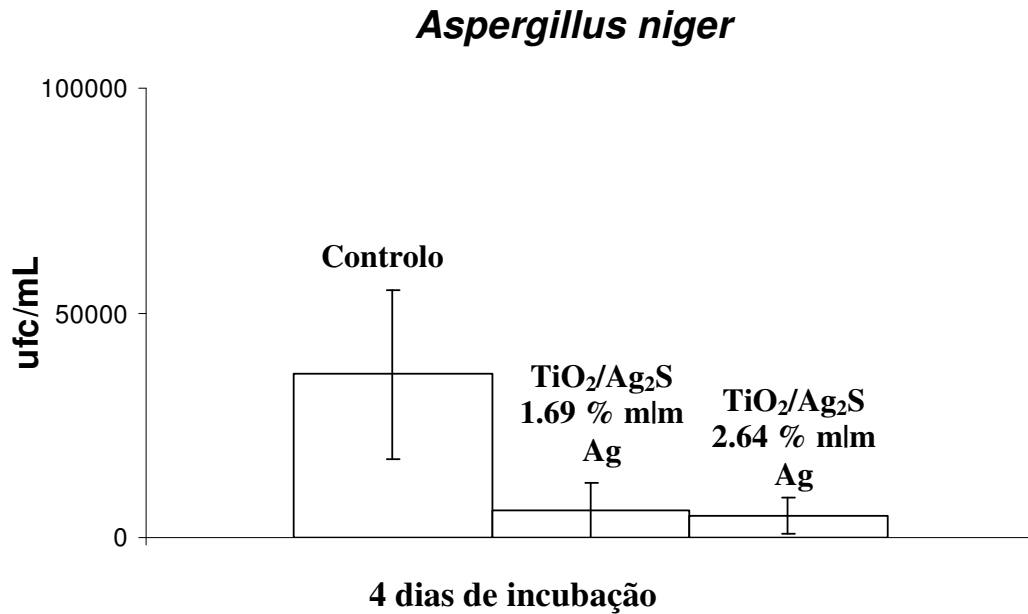
	TiO <sub>2</sub> 500 nm		TiO <sub>2</sub> 300 nm	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Cg</b>	1.36E06	3.63E04	1.36E06	3.63E04
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>Tg</b>	9.56E05	2.50E04	9.06E05	6.25E03
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	4.81E10	3.56E08	4.81E10	3.56E08
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	2.03E10	3.17E08	3.78E10	5.63E07
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	2.39E-02	3.70E-01	3.20E-02	5.09E-02
<b>% Inibição</b>	29.6	31.0	33.3	82.8
<b>Teste F</b>	Significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste T</b>	Não significativamente diferentes		Significativamente diferentes	

### 3.4.3 Actividade antifúngica do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com diferentes tamanhos de TiO<sub>2</sub>

Os primeiros testes sugerem que a actividade antifúngica é maior para o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S do que para o TiO<sub>2</sub> devido à presença de Ag<sub>2</sub>S. Os resultados de ICP indicam que o nanocompósito com TiO<sub>2</sub> de 500 nm tem menor teor de prata (1.69 % m/m de Ag) do que o nanocompósito preparado com TiO<sub>2</sub> de 300 nm (2.64 % m/m de Ag). Estes dois materiais foram testados para se avaliar se é realmente a quantidade de prata que faz com que o nanocompósito tenha mais poder inibidor do que o TiO<sub>2</sub> nos dois fungos. Assim, o *Aspergillus niger* e o *Penicillium sp* foram semeados em placas de petri com PDA na presença do TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69 e 2.64 % de teor de prata. As figuras 3.11 e 3.12 mostram os resultados obtidos nas contagens do número de colónias das placas para as culturas de *Penicillium sp* e *Aspergillus niger* com 4 dias de incubação na presença de TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. Os resultados mostram claramente que o nanocompósito com maior teor de prata (I) (TiO<sub>2</sub> de 300 nm) é o nanocompósito com maior actividade antifúngica.



**Figura 3.11** Efeito de nanocompósitos TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69 e 2.64 % m/m de prata no crescimento das colónias do *Penicillium sp*.



**Figura 3.12** Efeito de nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69 e 2.64 % m/m de prata no crescimento das colónias do *Aspergillus niger*.

Com este teste pode-se sugerir que a prata iónica faz com que o nanocompósito tenha maior actividade antifúngica e que quanto maior a quantidade de prata (I) nos nanocompósitos, maior será esse efeito inibidor.

#### **Comparação do efeito inibidor do TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69 e 2.64% m/m de prata em cada fungo**

H<sub>0</sub> = A inibição do número de colónias não é significativamente diferente logo TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69% m/m de prata e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 2.64% m/m de prata têm o mesmo efeito inibidor em cada um dos fungos em estudo.

H<sub>1</sub> = A inibição do número de colónias é significativamente diferente logo TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69% m/m de prata e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 2.64% m/m de prata não têm o mesmo efeito inibidor em cada um dos fungos em estudo.



**Tabela 3.7** Valores das médias do diâmetro das colônias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69 e 2.64 % de m/m de prata em cada fungo.

	<i>Penicillium sp</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.69 % m/m de Ag	TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 2.64 % m/m de Ag	TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.69 % m/m de Ag	TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 2.64 % m/m de Ag
<b>Cg</b>	1.36E06	1.36E06	3.63E04	3.63E04
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>Tg</b>	8.93E05	6.20E05	6.13E03	5.00E03
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	4.81E10	4.81E10	3.56E08	3.56E08
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	6.89E09	2.35E10	5.51E07	1.67E07
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	1.50E-02	1.82E-02	4.96E-02	1.78E-02
<b>% Inibição</b>	34.3	54.4	83.1	86.2
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	

Os resultados apresentados na tabela 3.7 mostram que, para o *Penicillium sp*, o aumento da quantidade de prata iónica não aumenta a inibição. O mesmo se pode afirmar para o *Aspergillus niger*, ou seja, comparando a inibição dos nanocompósitos com diferentes quantidades de prata a inibição não é significativamente diferente. Estes resultados sugerem que a interacção entre os nanocompósitos com mais e menos teor de prata e o fungo, tanto o *Penicillium sp* como o *Aspergillus niger*, é a mesma.

### **Comparação do efeito inibidor do TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69 e 2.64% m/m de prata nos dois fungos**

H<sub>0</sub> = A inibição do crescimento não é significativamente diferente logo os nanocompósitos TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (com 1.69 ou 2.64% de m/m de prata) têm o mesmo efeito inibidor nos dois fungos.

H<sub>1</sub> = A inibição do crescimento é significativamente diferente logo os nanocompósitos TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (com 1.69 ou 2.64% de m/m de prata) não têm o mesmo efeito inibidor nos dois fungos.

Comparando os resultados da inibição do crescimento do *Penicillium sp* e do *Aspergillus niger* na tabela 3.8, pode-se concluir que a diminuição do crescimento é significativamente diferente para os dois fungos, ou seja, quando se trata os fungos com o nanocompósito com menor teor de prata (TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69% de teor de prata) ou com maior teor de prata (TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 2.64% de teor de prata), o decréscimo de crescimento para os dois fungos é significativamente diferente, sugerindo, novamente, que a interacção do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S é significativamente diferente para os dois fungos

**Tabela 3.8** Valores das médias do diâmetro das colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com 1.69 e 2.64 % de m/m de prata nos dois fungos

	TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 1.69% de m/m de Ag		TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S com 2.64% de m/m de Ag	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>Cg</b>	1.36E06	3.63E04	1.36E06	3.63E04
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>Tg</b>	8.93E05	6.13E03	6.20E05	5.00E03
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	4.81E10	3.56E08	4.81E10	3.56E08
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	6.89E09	5.51E07	2.35E10	1.67E07
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	1.50E-02	4.96E-02	1.82E-02	1.78E-02
<b>% Inibição</b>	34.3	83.1	54.4	86.2
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	
<b>Teste t</b>	Significativamente diferentes		Significativamente diferentes	

### 3.4.4 Actividade antifúngica da prata (metálica e iónica)

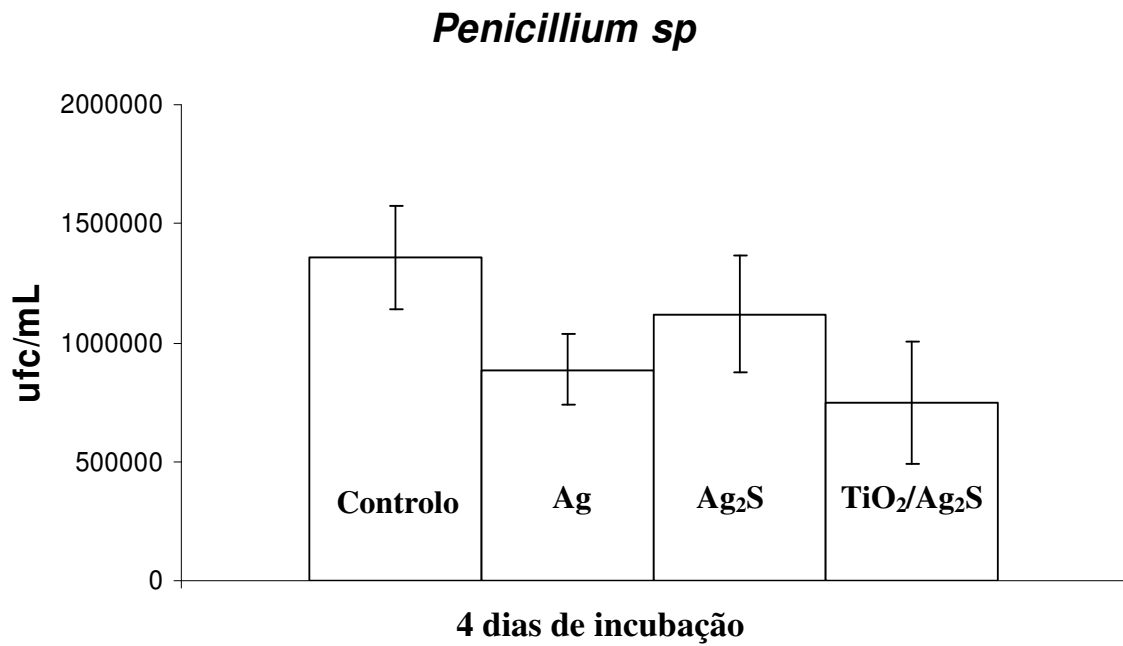
Para finalizar este sub capítulo, investigou-se o efeito da prata em diferentes materiais mas com a mesma quantidade. Para isso, semeou-se tanto o *Penicillium sp* como o *Aspergillus niger* em placa com PDA, na presença de prata metálica, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação directa e o nanocompósito em estudo TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S para a mesma quantidade de prata (1.58E-05 mol). As contagens das colónias foram efectuadas após 4 dias de incubação a 26.5°C e são apresentadas nas figuras 3.13, 3.14.

Este último teste sugere que o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S tem um efeito inibidor ligeiramente superior à prata metálica para os dois fungos. Neste teste obteve-se uma inibição de 45.0% quando o *Penicillium sp* é tratado com o nanocompósito e 40.0% quando este é tratado com prata metálica. O mesmo sucede com o *Aspergillus niger*, ou seja, quando este é tratado com TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S a percentagem de inibição é de 80.1% e quando é tratado com prata metálica a percentagem de inibição é de 78.4%. Contudo, quando se compara a percentagem de inibição entre a prata metálica e o Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação, os resultados são similares ao que foi descrito no capítulo 2. Observou-se um maior efeito inibidor no crescimento para ambos os fungos quando estes são tratados com prata metálica relativamente ao Ag<sub>2</sub>S. As percentagens de inibição do *Penicillium sp* e do *Aspergillus niger* quando tratados com Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação foram 17.6 e 69.3 %, respectivamente.

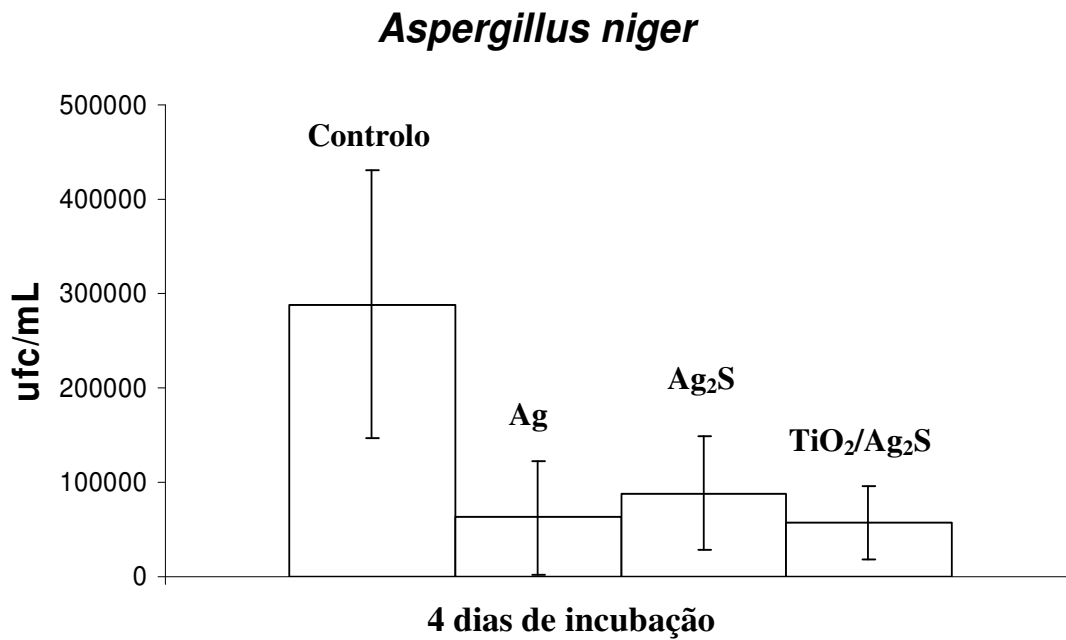
#### **Comparação do efeito inibidor dos compostos com a mesma quantidade de prata para os dois fungos**

H<sub>0</sub> = A inibição do número de colónias não é significativamente diferente logo o material com prata (prata metálica, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.

H<sub>1</sub> = A inibição do número de colónias é significativamente diferente logo o material com prata (prata metálica, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S) não tem o mesmo efeito inibidor nos dois fungos em estudo.



**Figura 3.13** Efeito da mesma concentração de prata em diferentes materiais no crescimento das colónias do *Penicillium sp.*



**Figura 3.14** Efeito da mesma concentração de prata em diferentes materiais no crescimento das colónias do *Aspergillus niger*.

**Tabela 3.9** Valores das médias do número de colónias e respectivas variâncias, juntamente com os resultados do teste F e do teste t na comparação do efeito inibidor da prata metálica, do Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação e o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S nos dois fungos.

	Prata metálica		Ag <sub>2</sub> S preparado por precipitação		TiO <sub>2</sub> /Ag <sub>2</sub> S	
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>C<sub>g</sub></b>	1.36E06	2.89E05	1.36E06	2.89E05	1.36E06	2.89E05
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4
<b>T<sub>g</sub></b>	8.16E05	6.25E04	1.12E06	8.88E04	7.48E05	5.75E04
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4
<b>s<sub>Cg</sub><sup>2</sup></b>	4.81E10	1.98E10	4.81E10	1.98E10	4.81E10	1.98E10
<b>s<sub>Tg</sub><sup>2</sup></b>	2.20E10	5.47E09	5.93E10	3.66E09	6.48E10	1.54E09
<b>s<sub>Pi</sub><sup>2</sup></b>	2.93E-02	7.68E-02	4.98E-02	6.63E-02	4.54E-02	2.79E-02
<b>% Inibição</b>	40.0	78.4	17.6	69.3	45.0	80.1
<b>Teste F</b>	Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes		Não significativamente diferentes	

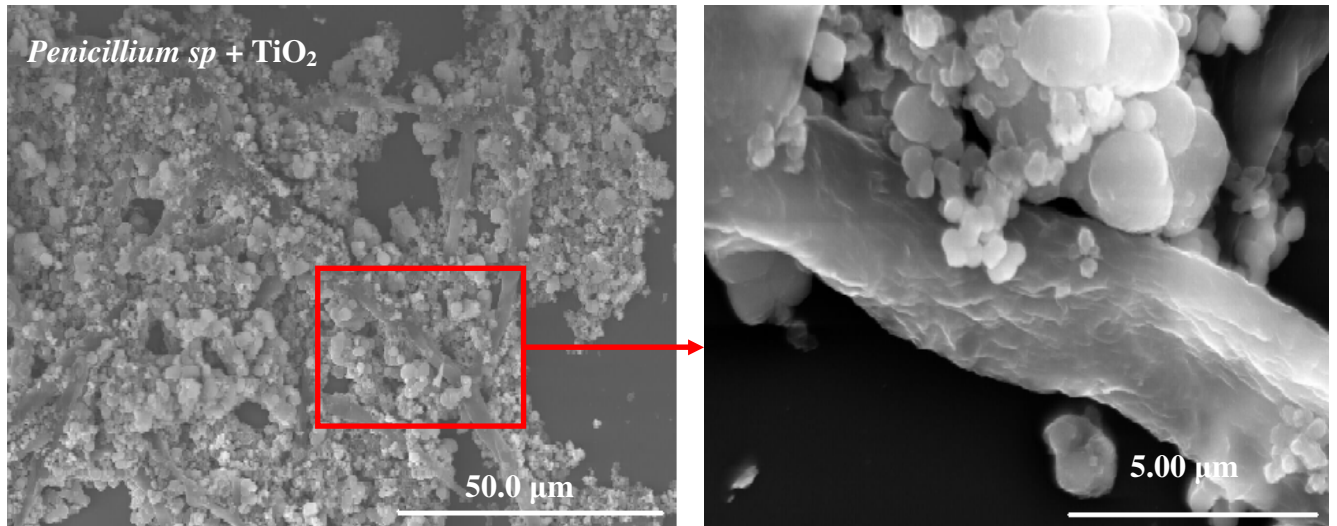
<b>Teste t</b>	Não significativamente diferentes	Significativamente diferentes	Significativamente diferentes
----------------	-----------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

Como foi observado no capítulo 2, os resultados apresentados na tabela 3.9 também indicam que a inibição do crescimento para os dois fungos quando tratados com prata metálica não é significativamente diferente, sugerindo que a interacção destes dois compostos é idêntica nos dois fungos. O contrário se observa na comparação de inibição do crescimento quando os fungos são tratados com Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação (observado também no capítulo 2) e pelo nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S. Como se observou na tabela de comparação de inibições com TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, também estes resultados demonstram que a inibição é significativamente diferente para os dois fungos, sugerindo mais uma vez a diferente interacção entre este materiais e os dois fungos em estudo.

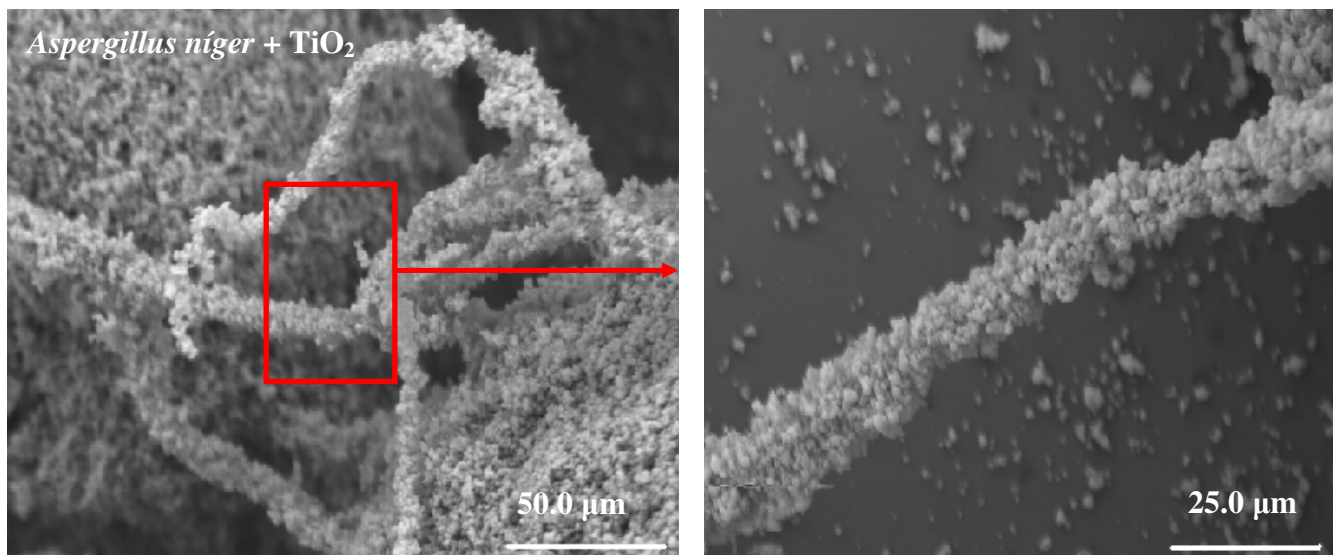
Embora os resultados anteriores demonstrem a eficiência das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S na inibição do crescimento tanto do *Penicillium sp* como do *Aspergillus niger*, o mecanismo pelo qual este opera não é ainda conhecido. A literatura sugere que a destruição microbiana por nanopartículas de TiO<sub>2</sub> é devido ao dano directo das paredes celulares, danos estes causados por radicais hidroxilos (OH·).<sup>35</sup> Em relação ao nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, a literatura, como foi dito no capítulo 2, sugere que a prata metálica ou a prata iónica interage com os grupos sulfídricos das enzimas respiratórias que se encontram nas membranas plasmáticas dos microrganismos<sup>39</sup> ou liga-se ao material genético microbiano<sup>40,41</sup>.

Imagens de SEM de *Penicillium sp* e de *Aspergillus niger* exposto a nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (Figura 3.15 e 3.16) e ao nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (Figura 3.17 e 3.18), durante 2 dias, mostram tanto as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> como o nanocompósito a cobrir as hifas e esporos em ambos os fungos. A análise de EDS sobre a superfície dos fungos com o nanocompósito demonstrou picos característicos de Ag, S, bem como de Ti e a análise de EDS sobre a superfície dos fungos com as esferas de TiO<sub>2</sub> demonstrou um pico

característico para o Ti. Estas imagens sugerem que, tanto as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> como o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S ao envolverem as hifas, criam um filme compacto à volta destas, inibindo assim a formação de esporos e consequentemente a sua reprodução.

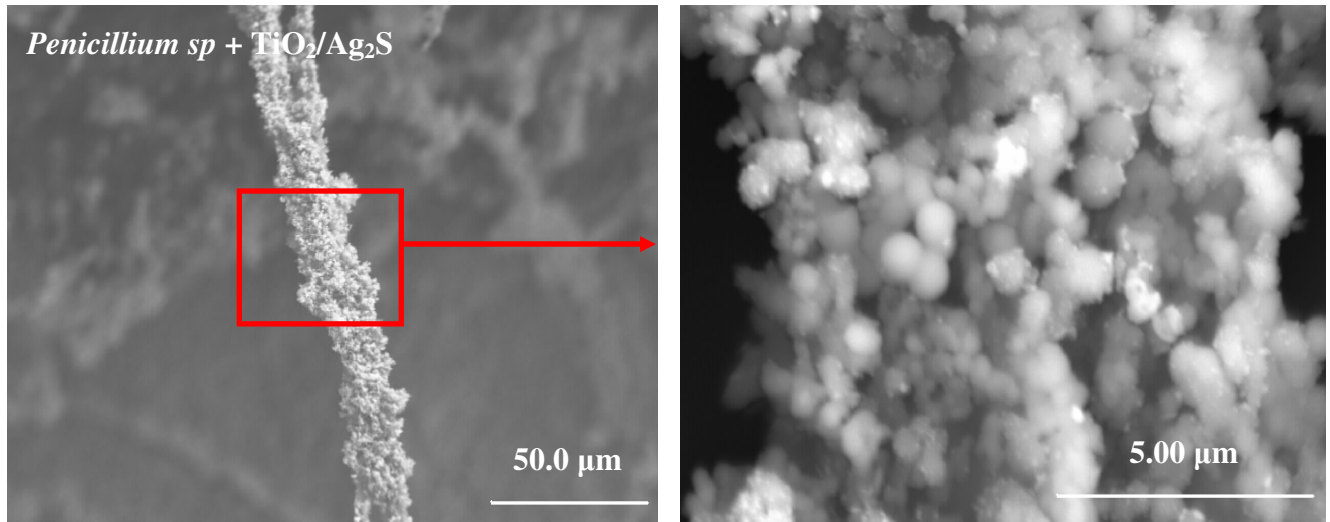


**Figura 3.15** A imagem em cima á esquerda mostra uma imagem de SEM do *Penicillium sp* exposto a nanopartículas esféricas de TiO<sub>2</sub> durante 48 horas; a imagem á direita mostra uma imagem de SEM com maior ampliação das partículas de TiO<sub>2</sub> a cobrirem uma hifa do *Penicillium sp*.

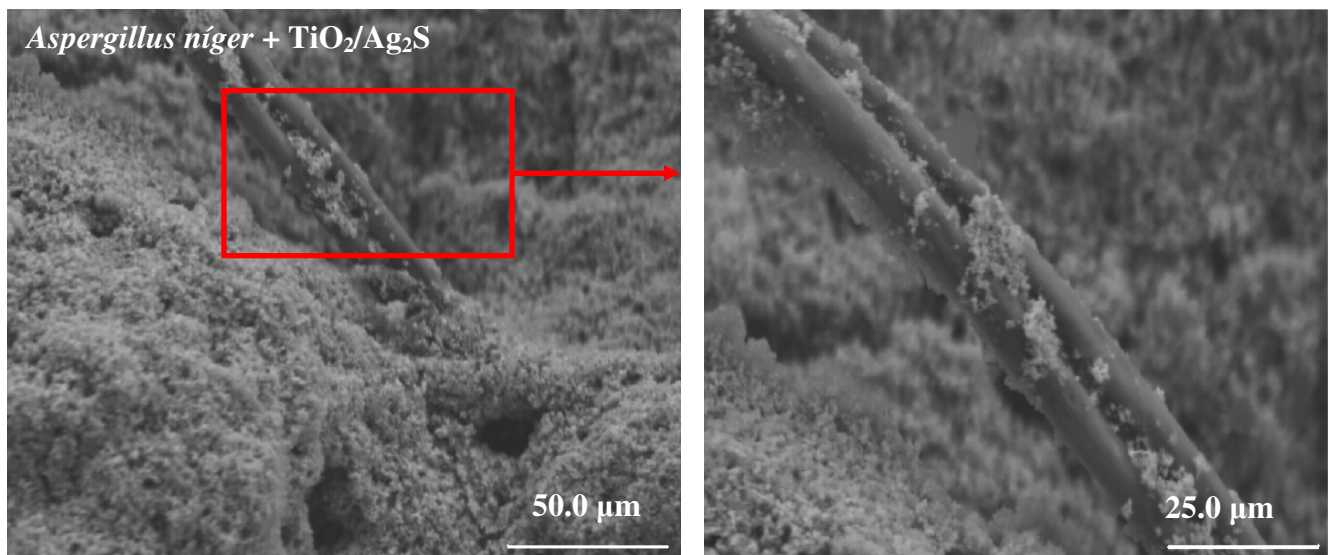


**Figura 3.16** A imagem em cima á esquerda mostra uma imagem de SEM do *Aspergillus niger* exposto a nanopartículas esféricas de TiO<sub>2</sub> durante 48 horas; a imagem á direita mostra uma imagem de SEM com maior ampliação das partículas de TiO<sub>2</sub> a cobrirem uma hifa do *Aspergillus niger*.





**Figura 3.17** A imagem em cima á esquerda mostra uma imagem de SEM do *Penicillium sp* exposto ao nanocompósito  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  durante 48 horas; a imagem á direita mostra uma imagem de SEM com maior ampliação do nanocompósito  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  a cobrirem uma hifa do *Penicillium sp*.



**Figura 3.18** A imagem em cima á esquerda mostra uma imagem de SEM do *Aspergillus niger* exposto ao nanocompósito  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  durante 48 horas; a imagem á direita mostra uma imagem de SEM com maior ampliação do nanocompósito  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  a cobrirem uma hifa do *Aspergillus niger*.

### 3.5 Conclusão

Em suma, análises por SEM, TEM, bem como EDS confirmam a deposição Ag<sub>2</sub>S na superfície das esferas de TiO<sub>2</sub>. Tanto as esferas de TiO<sub>2</sub> como os nanocristais de Ag<sub>2</sub>S suportados nas partículas TiO<sub>2</sub> mostraram actividade antifúngica tanto para *Penicillium sp* como para *Aspergillus niger*. Observou-se uma maior inibição do crescimento dos dois fungos quando estes são tratados com o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, estando esta actividade antifúngica relacionada com a presença de Ag<sub>2</sub>S nas esferas de TiO<sub>2</sub>.

### 3.6 Referências

- <sup>1</sup> Kamat, P. V., Meisel, D.; *Physical, Chemical and Catalytic Aspects*, **1997**, 237.
- <sup>2</sup> Ocana, M., Hsu, W. P., Matijevic, E.; *Langmuir*, **1991**, 7, 2911.
- <sup>3</sup> Haesselbarth, A., Eychmueller, A., Eichberger, R., Giersig M, Mews, A., Weller H.; *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 5333.
- <sup>4</sup> Bedja, I., Kawat, P. V.; *J. Phys. Chem*, **1999**, 99, 9182.
- <sup>5</sup> Kamalov, V. F., Little, R., Logunov, S.L., El – Sayed, M. A.; *J. Phys. Chem*, **1996**, 100, 6381.
- <sup>6</sup> Mews, A., Kadavanich, A. V., Bonin, U., Alivisatos, A. P.; *Phys. Rev.*, **1996**, B57, R13242.
- <sup>7</sup> Kraeutler, B., Bord, A. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 4317.
- <sup>8</sup> Shanghav, B., Kamat, P. V.; *J. Phys. Chem.B.*, **1997**, 101, 7675.
- <sup>9</sup> Pastoriza – Santos, I., Koktysh, D. S., Mamedov, A. A., Giersig, M., Kotov, N. A., Liz – Marzan, L. M.; *Langmuir*, **2000**, 16, 2731.
- <sup>10</sup> Schreder, B., Schwidt, T.,Ptatsachek, V., Materny, A., Umbach, E., Lerch, M., Müller, G., Kiefer, W., Spanhel, L.; *J. Phys. Chem. B.*, **2000**, 104, 1677.
- <sup>11</sup> Henglein, A.; *J. Phys. Chem*, **1996**, 100, 718.
- <sup>12</sup> Mariguier, J. L., Belloni, J., Delcourt, M. O., Chevalier, J. P; *Nature*, **1985**, 317, 344.
- <sup>13</sup> Lawless, D., Kapoor, S., kennepohl, P., Meisel, D., Serpore, N.; *J. Phys. Chem.* , **1994**, 98, 9619.
- <sup>14</sup> Liz – Marzón, L. M., giersig, M., mulvaney, P.; *Langmuir*, **1996**, 12, 4329.
- <sup>15</sup> Hardikak, V., Matijevic, E.; *J. Coll. Interf. Sci.*, **2000**, 221, 133.

- 
- <sup>16</sup> Esteves, A. C., Barros – Timmos, A., Trindade, T.; *Quim. Nova*, **2004**, 27, 798.
- <sup>17</sup> Neto, B. C., *Propriedades estruturais e vibracionais de nanocristais de TiO<sub>2</sub> dispersos em matriz vítrea porosa*; Mestrado de Física; Universidade federal do Ceará; **2006**.
- <sup>18</sup> Yan, W e tal; *J. Phys. Chem. B.*; **2004**, 108, 2793.
- <sup>19</sup> Wikipédia – A Enciclopédia livre – (05 – 09 - 2007).
- <sup>20</sup> Bersani, D., Iottici, P. P., Ding, X. Z.; *Applied Physics Letters*, **1998**, 72, 73.
- <sup>21</sup> [www.textoscientificos.com/quimica/inorganica/enlace-ionico/solidos-ionicos](http://www.textoscientificos.com/quimica/inorganica/enlace-ionico/solidos-ionicos) (05 - 09 - 2007).
- <sup>22</sup> <http://people.bath.ac.uk/msi20/> (05 – 09 - 2007).
- <sup>23</sup> Busca G. e tal; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, 90, 3181.
- <sup>24</sup> Beck, D. D., Siegel, R. W.; *Journal of Physical Research*, **1992**, 7, 2840.
- <sup>25</sup> Matsunaga, t., Tomada, R., Nakajima, T., Wake, H.; *FEMS Microbiology Letters*, **1985**, 29, 211.
- <sup>26</sup> Horie, Y., taya, M., Tone, S.; *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **1998**, 31, 577.
- <sup>27</sup> Maness, P. C., smolinski, S., Blake, D. M., Huang, Z., Wolfrum, E. J, Jacoby, W. A.; *Applied and Environmental Microbiology*, **1999**, 65, 4094.
- <sup>28</sup> Fujishima. A., Rao, T. N., Tryk, D. A.; *journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **2000**, 1, 1.
- <sup>29</sup> Blake, D., Maness, P. C., Huang, Z., Wolfrum, E., Huang, J., Jacoby, W.; *Separation and Purification Methods*, **1999**, 28, 1.
- <sup>30</sup> Makowski, A., Wardas, W.; *Current Topics in Biophysics*, **2001**, 25, 19.
- <sup>31</sup> Maneerat, C., Hayata, Y.; *International Journal of Food Microbiology*, **2006**, 107, 99.
- <sup>32</sup> Wei, C., Lin, W. Y., Zaina, Z., Williams, N. E., Zhu, K., Kruzic, A. P., Smith, R. L., Rajeshwar, K.; *Environmental Science and Technology*, **1994**, 28, 934.
- <sup>33</sup> Kikuchi, Y., Sunada, K., Iyoda, T., Hashimoto, K., Fujishima, A.; *Journal of Photochemistry and Photobiology. A, Chemistry*, **1997**, 106, 51.
- <sup>34</sup> Choi, Y. S., Kim, B. W.; *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2000**, 75, 1145.
- <sup>35</sup> Kuhn, K.P., Chaberny, I. F., Masholder, K., Stickler, M., Benz, V. W., Sonntag, H. G., Erdinger, L.; *Chemosphere*, **2003**, 53, 71.
- <sup>36</sup> Liu, Y., Liu, C., Rong, Q., Zhang, Z.; *Applied Surface Science*, **2003**, 220, 7.
- <sup>37</sup> Eiden – Assmann, S., widoniak, J., Maret, G.; *Chem. Mater.*, **2003**, 5,2

---

<sup>38</sup> www.azonano.com (*Zeta Potential – The Importance of Zeta Potential, The Electroacoustic Method and Case Studies Involving Titanium Dioxide and Silicon Dioxide*) (10 – 09 – 07).

<sup>39</sup> Semikina, A. L., Skulachev, V. P., *FEBS Letters*, **1990**, 269, 69.

<sup>40</sup> Oh, S.; Lee, S.; Choi, S.; Lee, I.; Lee, Y.; Chun, J.; Park, H., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. aspects*, **2006**, 275, 228.

<sup>41</sup> Keleher, J.; Bashant, J.; Heldt N.; Johnson, L.; Li, Y., *World of microbiology & Biotechnology*, **2002**, 18, 133.

## *4 Capítulo*

*Conclusões gerais e perspectivas  
de trabalho futuro*

## Conclusões gerais e perspectivas de trabalho futuro

Neste trabalho foram preparados e caracterizados nanocompósitos inorgânicos ( $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  e  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$ ), usando a decomposição do precursor unimolecular: AgDTC. Este método permitiu a formação de uma fase semicondutora ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ) sobre nanopartículas esféricas de  $\text{SiO}_2$  e de  $\text{TiO}_2$ , permitindo a preparação de nanoestruturas com morfologia uniforme.

Tal como referido na introdução desta dissertação, poucos têm sido os estudos sobre a actividade antimicrobiana do  $\text{Ag}_2\text{S}$ , muito menos da actividade antimicrobiana de nanocompósitos com  $\text{Ag}_2\text{S}$ . No trabalho aqui apresentado estudou-se a actividade antifúngica destes materiais em fungos que contaminam alimentos (*Penicillium sp* e *Aspergillus niger*), variando parâmetros, como a quantidade de  $\text{Ag}_2\text{S}$  nos nanocompósitos, o tempo de exposição, o teor de Ag nos materiais e o tamanho de partícula (substrato).

O estudo efectuado no capítulo 2 com o nanocompósito  $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  mostrou a deposição do  $\text{Ag}_2\text{S}$  na superfície das esferas de  $\text{SiO}_2$  sob a forma de ilhas nanométricas. Testes realizados com este nanocompósito demonstraram actividade antifúngica, verificando-se que a actividade antifúngica está neste caso relacionada com a presença de  $\text{Ag}_2\text{S}$ .

A análise estatística realizada aos resultados dos vários testes mostrara que o nanocompósito apresenta uma inibição do crescimento significativamente diferente quando é exposto aos dois fungos, sugerindo uma diferente interacção entre o nanocompósito e *Penicillium sp* ou *Aspergillus niger*.

Uma outra vertente explorada no capítulo 2 foi o estudo da actividade antimicrobiana do  $\text{Ag}_2\text{S}$  preparado por diferentes métodos de síntese. Este estudo mostrou que há maior inibição do crescimento de ambos os fungos quando estes são expostos a materiais como o  $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  e  $\text{Ag}_2\text{S}$  de tamanho nanométrico. O  $\text{Ag}_2\text{S}$  preparado por precipitação directa mostrou uma percentagem de inibição significativamente diferente para ambos os fungos. Por outro lado, testes microbianos com materiais com o mesmo teor de prata, tais como a prata metálica,  $\text{Ag}_2\text{S}$  preparado por precipitação e o nanocompósito  $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  mostraram maior inibição do crescimento para os dois fungos, quando estes são expostos à prata metálica. Os dados estatísticos sugerem que a prata metálica não tem uma interacção significativamente diferente no *Penicillium sp* e no *Aspergillus niger*.

## Conclusões gerais e perspectivas de trabalho futuro

Investigaram-se nanocompósitos de  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$ , em que as análises de SEM e TEM confirmaram a formação de ilhas de  $\text{Ag}_2\text{S}$  sob a superfície das partículas de  $\text{TiO}_2$ , quando se utiliza um método de síntese de decomposição baseada no precursor unimolecular:  $\text{AgDTC}$ . Tanto as partículas de  $\text{TiO}_2$  como as do nanocompósito  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  mostraram actividade antifúngica contra o *Penicillium sp* e o *Aspergillus niger*. Os testes microbianos mostraram maior actividade antifúngica no  $\text{TiO}_2$  quando este se encontra revestido com  $\text{Ag}_2\text{S}$  e que aumentando a quantidade de  $\text{Ag}_2\text{S}$  no nanocompósito esta actividade aumenta. Os dados estatísticos recolhidos sugerem que a interacção do  $\text{TiO}_2$  e do  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  com os dois fungos é significativamente diferente.

Testes antimicrobianos com a prata metálica,  $\text{Ag}_2\text{S}$  preparado por precipitação directa e  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  indicam que o material com maior capacidade de inibição fúngica foi o nanocompósito, provavelmente devido à actividade antifúngica conjunta do  $\text{TiO}_2$  e do  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Apesar do  $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  ser o material com maior efeito inibidor, observou-se maior actividade antifúngica para a prata metálica quando comparada com o  $\text{Ag}_2\text{S}$  preparado por precipitação directa, de acordo com as conclusões retiradas no capítulo 2.

Investigou-se ainda a actividade do nanocompósito  $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  quando este está suportado em fibras de celulose. Este teste antimicrobiano revelou-se mais importante do que o esperado porque revelou a resistência do *Penicillium sp* à folha de papel, mas não a do *Aspergillus niger*. Apesar de ter havido crescimento do *Aspergillus niger*, observou-se uma alteração de cor das colónias, ou seja, as colónias, passado oito dias de incubação, passaram de preto (cor normal) para cinzento escuro (cor do nanocompósito). A observação destas amostras por SEM permitiu ver uma ruptura dos esporos do *Aspergillus niger*, sugerindo que o nanocompósito  $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  suportado em fibras de celulose consegue inibir o crescimento do fungo através da inactivação dos esporos. No entanto, este tópico terá de ser aprofundado futuramente, por exemplo, aumentando o teor de  $\text{Ag}_2\text{S}$  nas fibras ou utilizando fibras celulósicas previamente modificadas.

Estudos futuros, nesta área, deverão prosseguir no sentido de compreender os mecanismos de interacção do  $\text{Ag}_2\text{S}$  e da  $\text{Ag}$  com os microrganismos. Esta investigação pode também ser alargada a testes microbianos com leveduras e com bactérias, já que não há estudos descritos na literatura sobre a actividade antimicrobiana do  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Neste caso seria importante depositar o  $\text{Ag}_2\text{S}$  noutras matrizes e investigar a sua actividade antimicrobiana.

## **Conclusões gerais e perspectivas de trabalho futuro**

Um último aspecto que se deve ser salientado é o facto de que estes novos materiais poderão vir a ser interessantes para a indústria, como por exemplo, em materiais de embalagens para a conservação de alimentos.



## *5 Capítulo*

### *Procedimento experimental*

### 5.1 Reagentes químicos utilizados

- Acetona p.a. ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) – Aldrich
- Acido clorídrico min. 37% ( $\text{HCl}$ ) – Aldrich
- Ágar de dextrose de batata (PDA – potato dextrose agar) puro - Merk
- Citrato de sódio puro ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) – BDH AnalaR
- Cloreto de potássio puro ( $\text{KCl}$ ) – Aldrich
- Cloreto de sódio puro ( $\text{NaCl}$ ) - Aldrich
- Dietilditiocarbamato de sódio (NaDTC) puro ( $((\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NCSNa} \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ ) – Divisione Chimica industriale – Milano
- Etanol p.a. ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) – Aldrich
- Nitrato de prata puro ( $\text{AgNO}_3$ ) – José M. Vaz Pereira, Lda
- Soluto de Ringer puro - Merk
- Sulfureto de sódio puro ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) – Aldrich
- Tetraetoxissilano (TEOS) puro ( $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$ ) – Aldrich
- Tetraetóxido de titânio puro ( $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Ti}$ ) - Aldrich
- 1,2-diaminopropano puro ( $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{N}_2$ ) – Aldrich

### 5.2 Procedimento experimental – sínteses químicas

Devido à toxicidade e cheiro de alguns reagentes e produtos envolvidos nas sínteses químicas, as montagens experimentais foram sempre realizadas numa *hotte* bem ventilada.

#### 5.2.1 Precursor unimolecular: dietilditiocarbamato de prata (I) (AgDTC)

Este complexo de prata (I) foi preparado pela mistura de 20.0 mL de  $\text{AgNO}_3$  (0.5M) e 20.0 mL de NaDTC (0.5M). A solução foi colocada sob agitação á temperatura ambiente durante 30 minutos. O composto final, de tonalidade amarela, foi filtrado e lavado várias vezes com água destilada e colocado num exsiccador.

O complexo de prata (I) foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho, Raman e espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN, por termogravimetria e por análise elementar.

### 5.2.2 Preparação de nanocompósitos por decomposição térmica do dietilditiocarbamato de prata (I)

Para preparar os nanocompósitos foi necessário proceder previamente à síntese de nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ .

#### Síntese de $\text{SiO}_2$ amorfa

As partículas de  $\text{SiO}_2$  (500 e 300 nm) foram preparadas pelo método de Stöber<sup>1</sup>: 2.25 mL de tetraetoxissilano (TEOS) foi adicionado a uma solução aquosa de etanol absoluto contendo 13,5 mL de água destilada e amónia a 25 %. As partículas de sílica com diferentes tamanhos foram obtidas pela variação das quantidades de etanol absoluto e amónia 25% e estão descritas na tabela 5.1.

**Tabela 5.1** Volumes usados para preparar partículas de  $\text{SiO}_2$  com diferentes tamanhos

	<b>Etanol absoluto (mL)</b>	<b>Amónia 25% (mL)</b>
<b><math>\text{SiO}_2</math> 500 nm</b>	39.5	7.75
<b><math>\text{SiO}_2</math> 300 nm</b>	41.7	1.5

As partículas de  $\text{SiO}_2$  formaram-se depois de cinco horas de reacção, sob agitação à temperatura ambiente. O colóide obtido foi centrifugado e lavado abundantemente com água e etanol e as partículas tratadas termicamente a  $700^\circ\text{C}$  durante 4 horas, numa estufa. A  $\text{SiO}_2$  preparada foi caracterizada por várias técnicas tais como infravermelho, SEM, EDS e ZetaSizer (potencial zeta e dimensão das partículas).

### Síntese de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S

Foi preparada uma mistura, em acetona (25.0 mL), contendo 0.25 mmol do precursor, AgDTC, e 0.125 g de SiO<sub>2</sub>. A esta mistura foi adicionado, sob agitação, 1.5 mL de 1,2-diaminopropano. A suspensão foi mantida em refluxo, sob atmosfera de azoto, durante oito horas. Após as oito horas, o sólido cinzento obtido foi isolado por centrifugação, depois de arrefecido, e lavado várias vezes com acetona. O sólido foi seco e guardado num exsicador.

Os nanocompósitos preparados foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho e Raman, por ICP, raios X de pós e TEM, SEM e EDS.

### Síntese de TiO<sub>2</sub>

As partículas de TiO<sub>2</sub> de diferentes tamanhos (500 e 300 nm) foram preparadas seguindo o procedimento descrito na bibliografia<sup>2</sup>: Uma solução de 100 mL de etanol absoluto e cloreto de potássio é colocada em agitação, seguido da adição de 1.7 mL de tetraetóxido de titânio. A suspensão é colocada sob atmosfera de azoto durante duas horas. A variação do tamanho das partículas de TiO<sub>2</sub> foi conseguida pela variação da concentração do sal.

O colóide obtido foi centrifugado e lavado abundantemente com etanol e depois com água destilada. As partículas de TiO<sub>2</sub> foram tratadas termicamente a 500°C durante 4 horas. O TiO<sub>2</sub> preparado foi caracterizado por SEM, EDS e ZetaSizer (potencial zeta e dimensão das partículas).

### Síntese de TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S

Foi preparada uma mistura, em acetona (25.0 mL), contendo 0.25 mmol do precursor, AgDTC, e 0.125 g de TiO<sub>2</sub>. A esta solução foi adicionado, sob agitação, 1.5 mL de 1,2-diaminopropano. A suspensão foi mantida em refluxo, sob atmosfera de azoto, durante oito horas. Após as oito horas, o sólido cinzento obtido foi isolado por centrifugação, depois de

arrefecido, e lavado várias vezes com acetona. O sólido foi seco e guardado num exsiccador.

Os nanocompósitos preparados foram caracterizados por raios X de pós, SEM, TEM, EDS e ICP.

### 5.2.3 Preparação de folhas de papel

#### Folhas de papel de fibras de celulose

Uma solução contendo água destilada (500 mL) e fibras de celulose (250 mg) é colocada numa trituradora. Depois de bem triturada, a solução é dividida em pequenas porções de 100 mL e filtrada a vácuo. O filtro, juntamente com a folha de papel é prensado e colocado a secar numa estufa a 80°C. Depois de 24 horas na estufa a 80°C, a folha de fibras de celulose está pronta para ser separada do papel de filtro.

#### Folhas de papel de fibras de celulose com SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S

Uma solução contendo água destilada (500 mL), fibras de celulose (250 mg) e fibras de celulose com SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S é colocada numa trituradora. Depois de bem triturada, a solução é dividida em pequenas porções de 100 mL e filtrada a vácuo. O filtro, juntamente com a folha de papel é prensado e colocado a secar numa estufa a 80°C. Depois de 24 horas na estufa a 80°C, a folha de fibras de celulose está pronta para ser separada do papel de filtro.

### 5.2.4 Preparação de Ag<sub>2</sub>S puro

Este ponto descreve as sínteses de Ag<sub>2</sub>S puro efectuadas para comparar o efeito antifúngico do Ag<sub>2</sub>S preparado por diferentes métodos nos fungos utilizados.

### **Síntese de Ag<sub>2</sub>S por precipitação directa**

Foi preparada uma solução de 50 mL de AgNO<sub>3</sub> (1.0 M) e uma solução de 50 mL de Na<sub>2</sub>S (0.5 M). As duas soluções foram misturadas, observando-se precipitação espontânea do Ag<sub>2</sub>S. O sólido de cor cinzento escuro foi filtrado a vácuo e lavado abundantemente com água destilada e por fim guardado num exsiccador sob vazio.

### **Síntese de Ag<sub>2</sub>S por decomposição térmica do dietilditiocarbamato (Ag(S<sub>2</sub>CNEt<sub>2</sub>))**

Colocaram-se 20 mg do complexo de prata (I), AgDTC, numa barca de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e posteriormente introduzida no forno tubular durante 2 horas a 400 °C, sob N<sub>2</sub>. O sólido de cor cinzento escuro foi guardado num exsiccador

### **Síntese de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S por decomposição térmica do dietilditiocarbamato (Ag(S<sub>2</sub>CNEt<sub>2</sub>))**

Foi preparada uma solução, em acetona (25 mL), contendo 0.25 mmol do precursor, AgDTC. A esta solução foi adicionado, sob agitação, 1.5 mL de 1,2-diaminopropano. A suspensão foi mantida em refluxo, sob atmosfera de N<sub>2</sub>, durante oito horas. Após as oito horas, o sólido cinzento obtido foi isolado por centrifugação, depois de arrefecido, e lavado várias vezes com acetona. O sólido, uma vez seco, foi guardado num exsiccador sob vazio.

#### **5.2.5 Preparação de um colóide de prata**

Uma solução contendo água destilada (100 mL) e nitrato de prata (90 mg) foi colocado sob agitação, a uma temperatura de 100°C. Após 10 minutos em ebulição, adicionou-se (gota-a-gota) 10 mL de uma solução de citrato de sódio a 1% (1g de citrato de sódio/100 g de água destilada). Após a adição do sal, a solução fica em refluxo durante 45 minutos. Terminado o refluxo, o colóide de cor verde escura é arrefecido e a prata isolada por centrifugação.

### 5.3 Procedimento experimental – testes microbianos

#### 5.3.1 Preparação de meios de cultura

O meio de cultura utilizado nos testes de inibição de fungos foi o PDA (Potato Dextrose Agar). Para preparar suspensões de fungos, o meio de cultura sólido foi filtrado para retirar o ágar e usado como meio líquido

Os meios de cultura foram, depois de preparados, autoclavado (15 minutos a 121 °C). Depois de autoclavado, o meio foi distribuído em placas de petri e guardado num frigorífico a 4° C até ser utilizado.

#### 5.3.2 Preparação de suspensão de fungo

Para ramificar o fungo foi feita uma sementeira em meio líquido. Uma pequena porção de fungo foi retirada de uma placa com uma ansa bem esterilizada à chama e colocada num frasco com meio líquido. A cultura foi incubada a 26.5 °C durante dois dias.

#### 5.3.3 Diluição do fungo

Antes da sementeira em placa, o fungo foi diluído em Solutio de Ringer até  $10^{-3}$ .

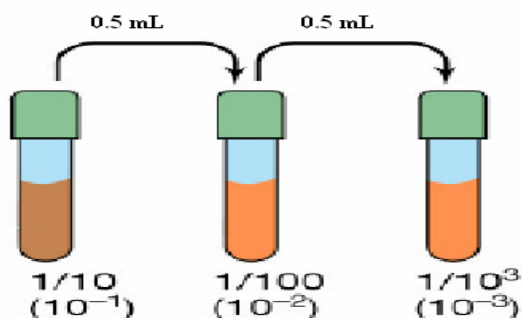
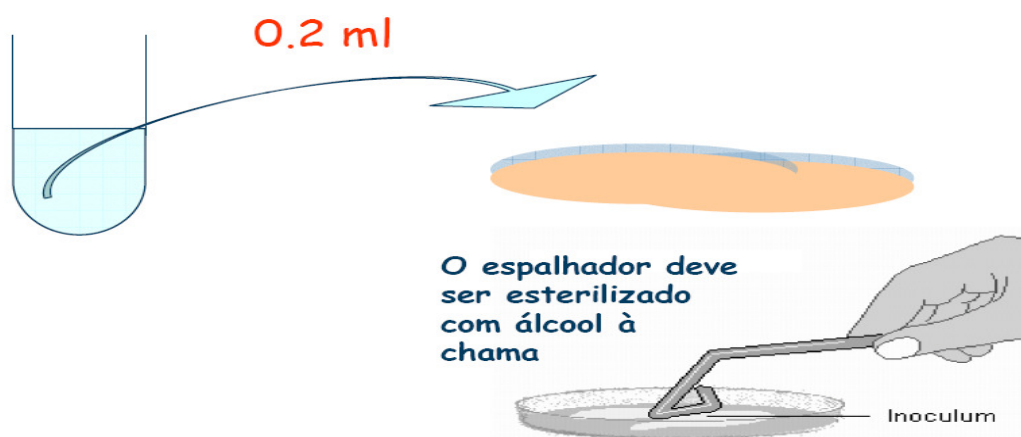


Figura 5.1 Esquema representativo das diluições efectuadas nos testes fúngicos

Após diluição, o fungo foi semeado pela técnica de sementeira à superfície. 0.2 mL de amostra foi retirado da diluição maior ( $10^{-3}$ ) e colocado à superfície de uma da placa de petri com o meio de cultura (PDA). A amostra foi espalhada com um espalhador esterilizado. A figura 5.2 representa como se realiza uma sementeira à superfície.



**Figura 5.2** Esquema representativo de uma sementeira à superfície de fungos

### 5.3.4 Teste da actividade antifúngica das nanopartículas de sílica e do nanocompósito $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$

O fungo foi diluído até  $10^{-3}$  e adicionado  $\text{SiO}_2$  (10 mg) e  $\text{SiO}_2/\text{Ag}_2\text{S}$  (10 mg). Após agitação foram semeados em triplicado (200  $\mu\text{L}$  de amostra) à superfície de uma placa de PDA. As placas foram incubadas a  $26.5^\circ\text{C}$ . Após incubação de quatro dias foi determinado o diâmetro das colónias



### **5.3.5 Teste da actividade antifúngica das nanopartículas de sílica e do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com o aumento do tempo de exposição dos materiais**

Foram preparadas duas suspensões do fungo em soluto de Ringer. A uma das suspensões foi adicionada o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S, à outra foi adicionada nanopartículas de SiO<sub>2</sub>. As suspensões foram incubadas durante 24 horas para o *Penicillium sp* e 48 horas para o *Aspergillus níger*.

Foram recolhidas amostras de µL a diferentes tempos de exposição, 0, 8 e 24 horas para o *Penicillium sp* e 0, 12 e 48 horas para o *Aspergillus níger*. As amostras foram semeadas em placas de PDA e incubadas durante quatro dias a 26.5°C. Foi determinada então o número de colónias em cada placa

### **5.3.6 Teste da actividade antifúngica do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com o aumento da sua concentração**

Foram preparadas suspensões de *Aspergillus níger* e de *Penicillium sp* em soluto de Ringer. Às suspensões foram adicionadas os nanocompósitos SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (2 e 10 g/dm<sup>3</sup>) e incubadas durante 48 horas sob agitação (150 rpm) a uma temperatura de 25° C. As amostras foram semeadas em placas com PDA e incubadas durante quatro dias. O número de colónias foi contado e determinou-se o número de ufc/mL (unidade formadora de colónias por mililitro).

### **5.3.7 Teste da actividade antifúngica do nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com diferentes tamanhos de sílica**

Os dois fungos foram semeados em placas contendo PDA na presença de SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com diferentes quantidades de prata (1.99 e 5.99% de m/m de Ag). O tamanho médio das colónias foi determinado após 4 dias de incubação a 26.5°C.

### **5.3.8 Teste da actividade antifúngica de fibras de celulose com SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S**

As folhas de papel de fibras de celulose e fibras de celulose com SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S após autoclavadas foram colocadas no centro das caixas de petri na fase final de solidificação do meio de cultura (PDA). As amostras foram semeadas em cima destas folhas. As placas foram colocadas numa estufa a 26.5°C durante 8 dias.

### **5.3.9 Teste da actividade antifúngica do Ag<sub>2</sub>S preparado por diferentes métodos**

Os dois fungos foram semeados em placas contendo PDA na presença de Ag<sub>2</sub>S preparado por diferentes métodos. A densidade fúngica dos dois fungos utilizados foi determinada após 4 dias de incubação a 26.5°C.

### **5.3.10 Teste da actividade antifúngica da prata (metálica e iónica)**

Os fungos foram semeados em placas com PDA na presença de prata metálica, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação directa e o nanocompósito SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (ambos com 1.58E-05 mol de prata). A densidade fúngica foi determinada após 4 dias de incubação a 26.5° C.

### **5.3.11 Teste da actividade antifúngica das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S**

O fungo foi diluído até 10<sup>-3</sup> e adicionado TiO<sub>2</sub> (10 mg) e TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (10 mg). Após agitação foram semeados em duplicado (200 µL de amostra) à superfície de uma placa de PDA. As placas foram incubadas a 26.5°C. Após incubação de quatro dias foi determinado a densidade fúngica.

### 5.3.12 Teste da actividade antifúngica das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> com diferentes tamanhos

O fungo foi diluído até  $10^{-3}$  e adicionado TiO<sub>2</sub> (300 e 500 nm). Após agitação foram semeados em duplicado (200 µL de amostra) à superfície de uma placa de PDA. As placas foram incubadas a 26.5°C. Após incubação de quatro dias foi determinado a densidade fúngica.

### 5.3.13 Teste da actividade antifúngica do nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S com diferentes tamanhos de TiO<sub>2</sub>

O fungo foi diluído até  $10^{-3}$  e adicionado TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (300 me 500 nm). Após agitação foram semeados em duplicado (200 µL de amostra) à superfície de uma placa de PDA. As placas foram incubadas a 26.5°C. Após incubação de quatro dias foi determinado a densidade fúngica.

### 5.3.14 Teste da actividade antifúngica da prata (metálica e iónica)

Os fungos foram semeados em placas com PDA na presença de prata metálica, Ag<sub>2</sub>S preparado por precipitação directa e o nanocompósito TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S (ambos com 1.58E-05 mol de prata). A densidade fúngica foi determinada após 4 dias de incubação a 26.5° C.

## 5.4 Caracterização instrumental

**Espectroscopia vibracional (FTIR e Raman)** – Os espectros de infravermelho foram registados num espectrofotómetro Matson 700 FTIR, usando pastilhas de KBr. Os espectros de Raman foram registados usando um espectrofotómetro FT – Raman Bruker RFS 100S.

**Espectroscopia de <sup>1</sup>H RMN** – Os espectros de RMN foram registados num espectrómetro Bruker AMX 300 usando TMS como referência e Clorofórmio Deuterado como solvente.

**Análise elementar** – A análise elementar do precursor unimolecular foi realizada num CHMS-932 da Leco, nos laboratórios do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

**Análise térmica (TGA)** – A análise termogravimétrica foi realizada num aparelho Shimadzu – TGA 50 Thermogravimetric, com uma velocidade de aquecimento de 10°C/min e sob N<sub>2</sub>.

**Análise electroforética** – As análises do potencial zeta foram realizadas pelo aparelho ZetaSizer – Nano Séries Nano-ZS. A preparação das amostras consistiu na dispersão dos sólidos num sal (KCl) com uma concentração de 2<sup>-3</sup> M e posterior ajuste de pH utilizando uma base (KOH) com uma concentração de 1<sup>-2</sup> M e um ácido (HCl) com uma concentração de 0.1 M. Para a medição do diâmetro das partículas os sólidos foram só dispersados numa solução aquosa KCl (2<sup>-3</sup> M).

**Difracção de raios X de pós (DRX)** – A difracção de raios X de pós foi realizada usando um difractómetro Philips X'Pert operando com radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=1.54060\text{\AA}$ ) a 40kV/50mA. As amostras sólidas foram depositadas num substrato de platina.

**TEM, SEM e EDS** – A microscopia electrónica de varrimento (SEM) e a análise por EDS, dos sólidos preparados, foram realizadas usando um microscópio FEG-SEM Hitachi S4100 operando a 25 kV ou um microscópio SEM Hitachi SU-70. A preparação das amostras consistiu em depositar uma aliquota de uma suspensão contendo o material a analisar, num suporte de alumínio. Dependendo de se pretender ou não a análise por EDS, as amostras foram previamente revestidas com carbono (usando um evaporador de carbono) ou com uma mistura de Au/Pt. A microscopia electrónica de transmissão (TEM) das nanopartículas foi realizada num microscópio Hitachi H-9000 operando a 300 kV. A preparação das amostras consistiu em colocar uma aliquota da amostra nanodispersa sobre uma grelha de cobre revestida com filme de carbono amorfo, deixando o solvente evaporar antes da análise.

## 5.5 Referências

- 
- <sup>1</sup> Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E., *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, 26, 62.
- <sup>2</sup> S.Eiden-Assmann, J. Widoniak, G. Maret; *Journal of Chemical Materials* **2004**, 16, 6.