

Universidade Estadual Paulista
“Júlio Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Atividade antimicrobiana de filmes de
policloreto de vinila (PVC) reforçado com
nanopartículas de prata imobilizadas em sílica**

Edneide Moraes Brasil

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Marcos David
Ferreira

Araraquara

2019

Atividade antimicrobiana de filmes de policloreto de vinila (PVC) reforçado com nanopartículas de prata imobilizadas em sílica

Edneide Moraes Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Marcos David Ferreira

Araraquara

2019

B823a Brasil, Edneide Moraes.
Atividade antimicrobiana de filmes de policloreto de vinila (PVC)
reforçado com nanopartículas de prata imobilizadas em sílica / Edneide
Moraes Brasil. – Araraquara: [s.n.], 2019.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Pesquisa em Ciência dos
Alimentos.

Orientador: Marcos David Ferreira.

1. Policloreto de vinila (PVC). 2. Nanopartículas de prata. 3. Atividade
antimicrobiana. I. Ferreira, Marcos David, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6

Esta ficha não pode ser modificada

Edneide Moraes Brasil

**Atividade antimicrobiana de filmes de
policloreto de vinila (PVC) reforçado com
nanopartículas de prata imobilizadas em sílica**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Araraquara como requisito
para a obtenção do título de Mestra em
Alimentos e Nutrição.

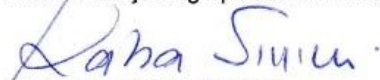
Banca examinadora



Prof. Dr. MARCOS DAVID FERREIRA
Instrumentação Agropecuária / EMBRAPA



Dra. ELAINE CRISTINA PARIS
Instrumentação Agropecuária / EMBRAPA



Profa. Dra. KATIA SIVIERI
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP- Araraquara

Araraquara, 05 de julho de 2019

Agradecimentos:

À Capes pela bolsa concedida para a realização do projeto.

Ao doutor Marcos David Ferreira por toda orientação e ensinamentos.

Ao programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição pela oportunidade do mestrado.

A Embrapa Instrumentação São Carlos e aos técnicos, por toda ajuda, apoio e infraestrutura.

A doutora Elaine Cristina Paris e doutorando João Otávio Mallafatti pela colaboração com o projeto.

Aos colegas de laboratório por todo apoio e incentivo durante meu percurso acadêmico.

Resumo

Objetivo. Analisar a eficácia antimicrobiana *in vitro* de compósito em pó a base de prata e sua aplicação em diferentes concentrações em filmes de policloreto de vinila (PVC) produzidos em escala industrial e em laboratório.

Métodos. Um material compósito constituído por dióxido de silício (SiO₂) e nanopartículas de prata (NpAg), produzido e cedido por uma empresa de soluções tecnológicas, foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raio X (DRX). Filmes de PVC industrial aditivados com 6,25, 12,5, 25 e 100 ppm de NpAg e filmes produzidos laboratorialmente pelo método de *casting* aditivados com 12,5, 25 e 100 ppm de NpAg foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raio X (DRX). Testes microbiológicos *in vitro* foram realizados com o compósito de prata e com os filmes de PVC. Com o compósito realizou-se o Teste de Difusão em Ágar por poço e a Contagem de Microrganismos Viáveis. Com os filmes industrial e laboratorial realizou-se o teste da Norma JIS Z 2801:2000, e com os filmes industriais realizou-se os testes de Agitação em Frasco e Contagem de Microrganismos Viáveis. **Resultados.** O compósito apresentou inibição para *Escherichia coli* em todas as concentrações estudadas e para *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 12,5, 25 e 100 ppm de NpAg. A adição de compósito na matriz polimérica do PVC não alterou as propriedades físico-químicas dos filmes. Os filmes industriais apresentaram taxa de inibição baixa para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* segundo a Norma JIS e os filmes produzidos em laboratório apresentaram inibição alta para *Staphylococcus aureus* apenas na concentração de 100 ppm de NpAg (97,95%). Em meio líquido, os filmes industriais não apresentaram redução microbiana para ambos microrganismos. **Conclusão.** Conclui-se que não houve uma boa interação entre a sílica e o polímero, ocasionando aglomerações de compósito no interior dos filmes e consequente diminuição da ação antimicrobiana das nanopartículas. Filmes *casting* apresentaram uma alta taxa de inibição contra *S. aureus* na concentração de 100 ppm possivelmente devido à ausência de aditivos no polímero.

Palavras-chave: policloreto de vinila (PVC), nanopartículas de prata, atividade antimicrobiana.

Abstract

Purpose. Analyze the in vitro antimicrobial efficacy of powder silver composites and its applications in different types of polyvinyl chloride (PVC) films in industrial and laboratory scale. **Methods.** A composite material consisting of silicon dioxide (SiO₂) and silver nanoparticles (NpAg), produced and supplied by a company of technological solutions, was characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and X-Ray Diffraction (XRD). Industrial PVC films added with 6.25, 12.5, 25 and 100 ppm of NpAg and laboratorial films produced by the casting method added with 12.5, 25 and 100 ppm of NpAg were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR) and X-Ray Diffraction (XRD). *In vitro* microbiological tests were performed with the silver composite and the PVC films. With the composite, the Agar Diffusion Test per Well was made and the Counting of Viable Microorganisms. The JIS Z 2801: 2000 standard was tested with the industrial and laboratory films, and with the industrial films were carried out Flask Shake and Counting of Viable Microorganisms tests. **Results.** The compound presented inhibition for *Escherichia coli* at all concentrations studied and for *Staphylococcus aureus* at concentrations of 12.5, 25 and 100 ppm of NpAg. The addition of composites in the polymeric matrix of PVC does not altered the physical-chemical properties of the films. Industrial films had a low inhibition rate for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* according to the JIS Standard and the films produced in the laboratory showed high inhibition for *Staphylococcus aureus* only at the concentration of 100 ppm of NpAg (97,95%). In the liquid medium, the industrial films does not presented antimicrobial action for both microorganisms. **Conclusion.** It was concluded that there was no good interaction between silica and polymer, causing agglomerations of compounds within films and consequent loss of antimicrobial action of nanoparticles. The casting films presented a high inhibition rate against *S. aureus* at a concentration of 100 ppm, possibly due to the absence of additives in the polymer.

the concentrations of composites utilized in the PVC films, as well as the distribution of the material in the polymer they were not enough to reduce the concentration of the microorganisms.

Key words: polyvinyl chloride (PVC), silver nanoparticles, antimicrobial activity.

SUMÁRIO

1.	Introdução	10
2.	Revisão Bibliográfica	12
2.1	Doenças Transmissíveis por Alimentos	12
2.2	Embalagens	14
2.3	Nanotecnologia	16
2.4	Ação antimicrobiana de nanopartículas de prata	18
3.	Objetivos	20
3.1	Objetivos gerais	20
3.2	Objetivos específicos	20
4.	Material e Métodos	21
4.1	Confecção dos filmes de PVC pelo método de casting	23
4.2	Caracterização físico-química de SiO ₂ :NpAg e filmes de PVC	23
4.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	23
4.2.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	24
4.2.3	Difração de Raios X (DRX)	24
4.2.4	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	25
4.3	Atividade antimicrobiana in vitro de SiO ₂ :NpAg	25
4.3.1	Difusão em ágar por poço	25
4.3.2	Contagem de microrganismos viáveis	26
4.4	Atividade antimicrobiana in vitro dos filmes de PVC	27
4.4.1	Norma JIS Z 2801:2000	27
4.4.2	Teste de Agitação em Frasco	30
4.4.3	Contagem de microrganismos viáveis	31
4.5	Análise Estatística	32
5.	Resultados e Discussão	33
5.1	Caracterização físico-química do compósito SiO ₂ :NpAg	33
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	33
5.1.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	35
5.1.3	Difração de Raios X (DRX)	36
5.2	Caracterização físico-química de filmes de PVC	37
5.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	37
5.2.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	48
5.2.3	Difração de Raios X (DRX)	50
5.2.4	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	52
5.3	Avaliação antimicrobiana do compósito SiO ₂ :NpAg	54
5.3.1	Difusão em ágar por poço	54
5.3.2	Contagem de microrganismos viáveis	56
5.4	Avaliação antimicrobiana dos filmes de PVC	59
5.4.1	Teste antimicrobiano segundo Norma JIS Z 2801:2000	59
5.4.2	Teste de Agitação em Frasco	63
5.4.3	Contagem de microrganismos viáveis	67
6.	Conclusões	72

1. Introdução

A segurança alimentar constitui uma das principais preocupações de países em desenvolvimento. Com o aumento populacional, até 2050 o mundo terá cerca de 9 bilhões de pessoas, sendo necessário um aumento na produção de alimentos de forma segura e sustentável. Entretanto, falhas na cadeia do alimento ocasionam um aumento das perdas, resultando no desperdício de recursos como água e solo e no aumento do preço do produto final. A redução das perdas de alimentos tornaria o alimento mais acessível contribuindo de forma substancial para a diminuição da fome, a manutenção da segurança alimentar e a economia do país(1)(2).

Uma das formas de perdas de alimento é por contaminação. A contaminação de alimentos, seja de origem química ou microbiológica, pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia do alimento, desde a colheita até o preparo pelo consumidor (3)(4). No processo de contaminação microbiológica, microrganismos produzem metabólitos que alteram as características organolépticas dos alimentos, deteriorando-os. Ainda, há microrganismos alimentares causadores de doenças ao ser humano, denominados patogênicos. A proliferação desses microrganismos depende de alguns fatores relacionados ao alimento, como temperatura, pH e disponibilidade de água livre (5). Formas de diminuir o crescimento microbiológico e prolongar a vida de prateleira dos alimentos incluem o armazenamento em temperaturas adequadas e a utilização de embalagens apropriadas.

As embalagens exercem um papel crucial na indústria de alimentos devido às suas funções de contenção e proteção, mantendo a qualidade e

segurança do alimento (6). Embalagens convencionais mantêm a segurança dos alimentos passivamente, interagindo o mínimo possível com estes. Entretanto, nas últimas décadas têm-se desenvolvido embalagens com características adicionais, denominadas ativas e inteligentes, que tem por princípio interagir com o alimento ou com o meio que o circunda a fim de manter ou melhorar sua qualidade (7).

No que diz respeito às embalagens ativas, as embalagens à base de nanopartículas de prata mostram-se promissoras devido sua atividade antimicrobiana, reduzindo a presença patógenos e prolongando a vida de prateleira dos alimentos (8). Diante disso, a presente pesquisa tem por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de um compósito em pó a base de prata e sua aplicação em diferentes concentrações em filmes nanocompósitos de PVC industrial e produzidos laboratorialmente por *casting*.

O compósito em pó e os filmes de PVC foram avaliados quanto a imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX) e avaliação microbiológica. Ainda, os filmes foram analisados por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Doenças Transmissíveis por Alimentos

As Doenças Transmissíveis por Alimentos (DTAs) constituem um problema mundial decorrente de problemas econômicos e de saúde pública, causando morbidade e mortalidade no mundo todo (9). As doenças de origem alimentar ocorrem quando uma pessoa consome alimentos ou água contaminados com microrganismos ou toxinas indesejáveis, contraindo alguma doença. Os sintomas mais comuns das DTAs são febre, dor no estômago, náusea e diarreia, podendo ocorrer sintomas mais graves como insuficiência renal e hepática, distúrbios neurais, paralisia e morte (10) (11).

No Brasil, os casos de surtos e doenças causadas por alimentos são monitorados pela Vigilância Epidemiológica das DTA's e, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), 700 casos são notificados por ano (9). Entretanto, sabe-se que apenas poucos casos de DTA são notificados aos órgãos competentes. Isso ocorre porque em muitos casos os sintomas são brandos e a vítima não procura auxílio médico ou porque os sintomas são confundidos com outras doenças, como gripe (10).

As DTAs podem ser causadas por vírus, príons, bactérias, fungos, parasitas, agrotóxicos, metais pesados e substâncias químicas (12)(13). Dentre as bactérias, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* constituem o segundo e terceiro microrganismo bacteriano mais notificado nos casos de DTAs (Figura 1).

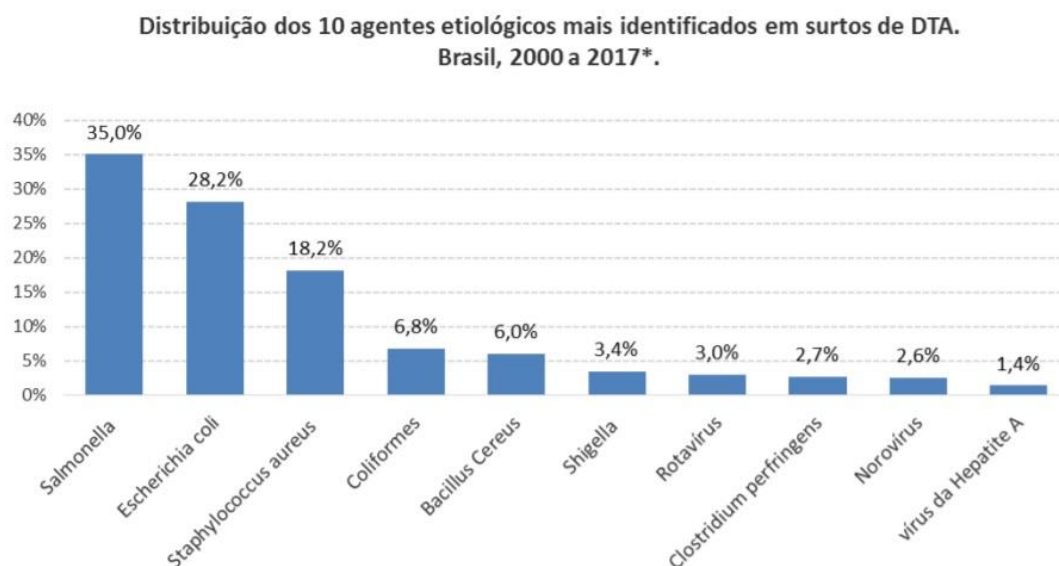


Figura 1. Distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTA de 2000 a 2017. Fonte: Brasil, Ministério da Saúde.

Escherichia coli, importante bactéria Gram negativa, possui linhagens patogênicas que são divididas de acordo com os sintomas patogênicos e mecanismos de ação, sendo elas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggAC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente adesiva (DAEC), todas causadoras de diarreia. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva esférica que ocorre em cadeias ou cachos. *S. aureus* produz uma gama de fatores e de patogenicidade, sendo as intoxicações alimentares causadas pelas enterotoxinas. Além de viver no ambiente, como ar, água e esgoto, *S. aureus* também estão presentes nas vias aéreas, garganta e cabelo de pelo menos 50% dos indivíduos. Podem estar presentes em equipamentos de processamento ou na superfície de

alimentos, mas a principal forma de contaminação é pelo manipulador do alimento. Os principais sintomas relacionados a intoxicações causadas por estafilococos são náuseas, vômitos e dores abdominais (10)(5).

As embalagens desempenham um papel fundamental na proteção dos alimentos contra agentes externos, diminuindo a contaminação microbiológica e alterações físico-químicas (14) (15). As embalagens ativas agem mantendo a qualidade do produto e sua vida de prateleira, atuando na redução da deterioração, do desperdício e de surtos de doenças transmissíveis por alimentos (16).

2.2 Embalagens

As embalagens devem conter e proteger os alimentos de modo que minimize influências externas como alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas (17), além de funcionar como uma barreira ao meio externo, permitindo a troca de gases e passagem de luz com mais ou menos eficiência (18), dependendo do tipo de material. Os principais materiais de embalagens de alimentos são plástico, vidro, metal e papel, havendo, além destes, embalagens de madeira, cortiça e têxteis (6).

No mercado competitivo os materiais plásticos têm ganhado cada vez mais espaço (6). Plásticos são materiais poliméricos de alta massa molecular, divididos em termorrígidos e termoplásticos: termorrígidos caracterizam-se por sofrer transformações químicas irreversíveis quando submetidos a aquecimento, tornando-se rígidos, ao passo que termoplásticos sofrem transformações físicas reversíveis quando aquecidos e resfriados, capazes de

amolecer e fluir quando em aquecimento e solidificar com a diminuição da temperatura (19). A maior parte dos materiais plásticos utilizados em embalagens são termoplásticos derivados do etileno (20) e entre eles destaca-se o polímero policloreto de vinila (PVC), utilizado em diversos alimentos como frutas, verduras, massas, queijos e carnes (21) .

O PVC é constituído por cloro (proveniente do sal industrial) e carbono e hidrogênio (provenientes de óleo/gás via etileno). O PVC se destaca pela presença da clorina na sua cadeia, que o torna compatível com muitos outros materiais, tornando-o versátil. Além disso, a presença de clorina o torna menos dependente de óleo ou gás, quando comparado a outros polímeros totalmente dependentes desses recursos, como o polietileno (PE), polipropileno (PP) e poliestireno (PS). (22)

O PVC rígido é uma macromolécula de cadeia polihalogenada, na qual átomos de cloro ligam-se covalentemente aos átomos de carbono, ocasionando interações dipolo-dipolo entre o cloro e o hidrogênio em muitos pontos, promovendo desse modo a rigidez do material. A utilização de plastificantes causam quebra da interação dipolo das cadeias, proporcionando um material mais flexível (23). O comportamento dos filmes de PVC varia de acordo com o grau de plastificação mas, de um modo geral, possuem como características aparência transparente e brilhante, boa resistência a hidrocarbonetos não polares, alta barreira a ácidos, bases e gordura, e propriedade de barreira média à umidade e baixa a gases (6) (8).

Embalagens tradicionais protegem os alimentos atuando o mínimo possível com estes, ou seja, de modo praticamente inerte. Entretanto, uma

das principais inovações na área de embalagens atualmente é o desenvolvimento de embalagens ativas e inteligentes, que atuam interagindo com o alimento ou o ambiente em torno deste. O princípio das embalagens ativas é manter a qualidade dos alimentos e prolongar sua vida útil, ao passo que embalagens inteligentes tem por escopo monitorar e dar indicação sobre a qualidade dos alimentos (7). Embora existam materiais usuais para tais embalagens, a nanotecnologia possui grande potencial para a produção de materiais inovadores (24).

2.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia consiste na aplicação de conhecimentos provenientes de diversas áreas, tais como física, biologia, eletrônica, materiais, entre outras, para a síntese, manipulação e uso da matéria na escala nano, com o objetivo de produzir materiais, estruturas ou dispositivos capazes de promover soluções ou benefícios ao ser humano, (25) (24). Nanomateriais caracterizam-se por ter ao menos uma dimensão de até 100 nanômetros e incluem nanofilmes e revestimentos, nanotubos e nanopartículas (26).

Nanopartículas podem ocorrer naturalmente, serem produzidas involuntariamente ou manipuladas intencionalmente (27). Um dos principais fenômenos observados em nanopartículas é o efeito de superfície, ocasionado pelo aumento da relação superfície-volume em materiais nanométricos (28). Com a diminuição do volume em detrimento do tamanho, a proporção de átomos na superfície aumenta, conferindo às nanopartículas

propriedades físicas, químicas e ópticas distintas daquelas encontradas no mesmo material na escala macro (29) (26), variando de acordo com o tamanho, forma e funcionalização da nanopartícula (30). As nanopartículas podem ser divididas em orgânicas (nanopartículas poliméricas) e inorgânicas (nanopartículas metálicas, óxidos, sais e hidróxidos) (31).

Apesar da aplicação de nanotecnologia na área de alimentos ser recente, é observado uma crescente aplicação nos últimos anos (32), sendo o setor de embalagens a maior categoria nessa área (24). As principais aplicações em embalagens são incorporação de nanomateriais para melhorar suas propriedades, incorporação de nanopartículas com atividade antimicrobiana em embalagens ativas, incorporação de nanosensores que monitoram o alimento ou eliminam o oxigênio em embalagens inteligentes e produção de nanopolímeros biodegradáveis (32).

Nanocompósitos são materiais híbridos que possuem ao menos um componente em dimensão nanométrica e são constituídos por um segundo componente que serve como matriz no qual o nanomaterial é disperso (33). Para se obter um bom nanocompósito, são necessários uma dispersão homogênea do material de reforço e uma forte adesão entre este e a matriz. Contudo, devido sua elevada energia de superfície de adsorção e sua diferença de polaridade em relação aos polímeros, as nanopartículas tendem a formar aglomerados (34). Desse modo, materiais porosos como sílicas e zeólitas são utilizados como carreadores para que tais aglomerados sejam evitados.

De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), materiais porosos são classificados em três categorias segundo o diâmetro de seus poros, sendo microporosos os materiais com diâmetro de poro menor que 2 nm, mesoporos materiais com diâmetro de poro entre 2 e 20 nm e macroporosos materiais cujo diâmetro de poro é superior a 50 nm (35). Partículas de sílica mesoporosas possuem poros cilíndricos regulares e uma grande área superficial interna, além de alta estabilidade térmica e química, sendo, desse modo úteis para catálise, separações químicas, adsorção e dispositivos biotecnológicos (35).

2.4 Ação antimicrobiana de nanopartículas de prata

Entre os cátions metálicos, o íon Ag^+ se destaca pela sua alta capacidade antimicrobiana contra uma gama de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos e sua baixa volatilidade, além de não possuir efeitos adversos para células eucarióticas abaixo de certas concentrações. (30).

A ação antimicrobiana de nanopartículas Ag^0 é atribuída à liberação de íons Ag^+ . Devido à alta estabilidade das nanopartículas, a liberação desses íons ocorre através da oxidação em meio aquoso, com a dissolução do oxigênio atmosférico na água. A liberação de íons Ag^+ também está relacionada com o tamanho das nanopartículas, pois com a diminuição do volume ocorre um aumento da superfície e consequente aumento da oxidação de Ag^0 . Desse modo, quanto menor a nanopartícula maior a liberação de Ag^+ e maior o potencial antimicrobiano (36).

Nanopartículas de prata atuam como um reservatório liberando lentamente os íons Ag^+ , os quais possuem um amplo espectro antimicrobiano contra fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários e alguns vírus (37) (38).

Diferentes mecanismos de ação da prata são descritos na literatura. Raffi e colaboradores (39) verificaram, por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) a presença de nanopartículas de prata aderidas à parede celular e no interior de *Escherichia coli*. Devido ao pequeno tamanho e grande superfície de contato, as nanopartículas são capazes de aderir fortemente à superfície bacteriana, alterando as propriedades da membrana (40) (41).

Íons Ag^+ possuem alta afinidade pelos grupos tiol e fosfato, interagindo com diversos componentes celulares. No interior da célula reagem com os grupos tiol das proteínas, alterando as atividades enzimáticas e ocasionando a inativação bacteriana. A interação com grupos tiol de enzimas respiratórias causa um desacoplamento do transporte de elétrons na cadeia respiratória, inibindo essas enzimas e alterando a permeabilidade da membrana (42).

Íons e nanopartículas Ag^+ também interagem com ácidos nucleicos através dos grupamentos de fósforo e enxofre, causando danos ao DNA, inviabilizando sua replicação (40), além de interagir com os ribossomos, inibindo a expressão de enzimas vitais (43).

3. Objetivos

3.1 *Objetivos gerais*

Avaliar o potencial antimicrobiano de compósito em pó constituído por dióxido de silício e nanopartículas de prata ($\text{SiO}_2\text{:NpAg}$) e sua aplicação em diferentes concentrações em filmes de policloreto de vinila (PVC) produzidos em escala industrial e por *casting* em laboratório.

3.2 *Objetivos específicos*

- (1) Caracterizar o pó $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$
- (2) Produzir filmes de PVC pelo método de *casting*, com diferentes concentrações do compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$.
- (3) Caracterizar os filmes de PVC industriais e produzidos em laboratório, com e sem $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$.
- (4) Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$.
- (5) Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* dos filmes de PVC.

4. Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido na Embrapa Instrumentação localizada em São Carlos – SP utilizando-se compósito em pó de sílica e nanopartículas de prata ($\text{SiO}_2\text{:NpAg}$) e filmes de PVC produzidos em escala industrial e pelo método de *casting*, acrescidos do respectivo compósito. O compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$, bem como os filmes de PVC industrial, foram produzidos e cedidos por uma empresa especializada em soluções tecnológicas localizada em São Carlos – SP. Os filmes de PVC produzidos pelo método de *casting* foram confeccionados na Embrapa Instrumentação.

MATERIAL

O compósito utilizado apresenta-se em forma de pó, constituído por dióxido de silício e nanopartículas de prata (99,5% SiO_2 e 0,5% NpAg). Os filmes de PVC industrial foram confeccionados pelo método de extrusão e as concentrações de $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ adicionadas a esses, bem como a quantidade de NpAg correspondente, estão descritas no Quadro 1:

Filmes	Concentrações de $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ (ppm)	Concentrações de NpAg (ppm)
1	0	0
2	1250	6,25
3	2500	12,50
4	5000	25,00
5	20000	100,00

Quadro 1. Concentrações de $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ presente nos filmes de PVC industrial e respectivas concentrações de nanopartículas de prata.

Os filmes de PVC confeccionados em laboratório foram produzidos pelo método de *casting* utilizando-se apenas solvente, polímero e o composto SiO₂:NpAg, sendo esse último adicionado nas concentrações de 12,5, 25 e 100 ppm NpAg.

MÉTODOS

Os materiais foram avaliados quanto a suas características físico-químicas e seu potencial antimicrobiano conforme descrito a seguir:

O pó de SiO₂:NpAg e os filmes de PVC com diferentes concentrações de SiO₂:NpAg foram caracterizado através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raio X (DRX). Os filmes também foram caracterizados por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Para avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* do pó de SiO₂:NpAg foram realizados os testes de Difusão em Ágar em poço e Contagem de microrganismos viáveis e para os filmes industriais foram realizados o Teste de Agitação em Frasco, Contagem de Microrganismos Viáveis e procedimento da Norma JIS Z 2801:2000. Os filmes laboratoriais foram produzidos pelo método de *casting* e sua atividade antimicrobiana foi avaliada pelo procedimento da Norma JIS Z 2801:2000.

Os microrganismos utilizados em todos os testes microbiológicos foram *Escherichia coli* INCQS 33 ATCC 25922 como Gram negativo e *Staphylococcus aureus subsp. aureus* INCQS 15 ATCC 25923 como Gram

positivo, importantes microrganismos patogênicos na área de alimentos. Os procedimentos realizados são detalhados a seguir.

4.1 *Confecção dos filmes de PVC pelo método de casting*

Filmes de PVC foram confeccionados em laboratório com mesmas concentrações de SiO₂:NpAg presentes nos filmes industriais com o objetivo de compreender o comportamento do PVC. Nos filmes produzidos por *casting* não foi utilizado nenhum aditivo para se compreender a interação da sílica com o polímero.

A confecção dos filmes de PVC foi realizada a partir da adaptação do método de *casting* (44), nas concentrações de 12,5, 25 e 100 ppm de NpAg. Inicialmente 10% (m/v) do polímero de PVC foi mantido em agitação em 15 mL de THF por duas horas em shaker automático, até completa solubilização dos pellets. Paralelamente, o compósito SiO₂:NpAg foi disperso em 5 mL de THF em ultrassom de ponteira por 2 minutos e amplitude de 10% e adicionado à solução de polímero. A solução foi mantida em agitação por mais cinco minutos e posteriormente vertida em placa de vidro, drenando-se o excesso. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas para evaporação do solvente.

4.2 *Caracterização físico-química de SiO₂:NpAg e filmes de PVC*

4.2.1 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Os materiais foram caracterizados morfologicamente por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) além de um mapeamento dos principais elementos constituintes através da técnica de Energia Dispersiva de Raio X

(EDS). Para se obter imagens superficiais do pó de $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$, uma pequena quantidade de pó foi colocada sobre fita carbono previamente fixada no stub e, com o auxílio de uma pera, o excesso foi retirado. Para realizar a Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG-SEM), preparou-se uma solução de nanocompósito e isopropanol, que foi mantida em banho ultrassônico por 10 minutos. Em seguida, pingou-se uma gota da solução em uma placa de silício previamente fixada no stub com fita carbono.

Para imagens superficiais dos filmes, amostras foram fixadas em porta amostras e recobertas com carbono. Para imagens de corte transversal, amostras dos filmes foram congeladas em nitrogênio líquido com posterior fratura criogênica e fixação no porta amostra. Para um maior detalhamento morfológico, as amostras também foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG-SEM).

4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os materiais foram analisados pela técnica de FTIR para avaliar os grupos funcionais das amostras. Todas as amostras foram analisadas em espectrômetro Paragon 1000 Perkin–Elmer, realizando-se varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . O pó de $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ foi analisado como pastilha e os filmes foram analisados pelo método de Refletância Total Atenuada (ATR).

4.2.3 Difração de Raios X (DRX)

Ensaio de difração de raios X foram realizados em equipamento XRD Shimadzu-6000, a fim de avaliar a cristalinidade dos materiais. A amostra de pó de $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ foi varrida com 2θ entre 5° e 90° com velocidade de 1° por minuto, sob tensão de aceleração de 30 kV e com corrente de 30 mA. Todas as amostras de filmes foram varridas com 2θ entre 4° e 70° com velocidade de 2° por minuto, sob tensão de aceleração de 30 kV, com corrente de 30 mA.

4.2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Para se obter a temperatura de transição vítrea (T_g), realizou-se a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) dos filmes com e sem nanopartículas em equipamento DSC Q100 (TA – Instruments). Aproximadamente 5 mg de amostra foi colocada em porta amostra de alumínio e aquecida de -90°C a 150°C , com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ e fluxo de nitrogênio a 60 mL min^{-1} .

4.3 Atividade antimicrobiana *in vitro* de $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$

4.3.1 Difusão em ágar por poço

Para avaliar se as concentrações de nanopartículas utilizadas nos filmes são suficientes para inibir o crescimento de microrganismos foi realizado o teste de difusão em poço, adaptado de Khalil e colaboradores (2014) (45). Uma solução contendo 10 mL de água deionizada e 200 mg de $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ (correspondendo a 100 ppm de NpAg, maior concentração utilizada nos filmes industriais) foi mantida em banho ultrassônico por 15 minutos para dispersão das partículas. Em seguida, foram realizadas 4

diluições de 1:1, obtendo-se as concentrações de 25, 12,5 e 6,25 ppm, utilizadas no experimento.

A partir de uma cultura estoque dos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi preparado um inóculo de $2,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ para cada um, comparando-se com o padrão de turbidez McFarland. Placas contendo ágar Muller Hinton foram preparadas e, sobre estas, foram pipetados 100 µL do inóculo dos microrganismos, o qual foi espalhado por todo ágar com uma alça de Drigalsky. Com o auxílio de uma ponteira de 100 µL, foram feitos 3 poços em cada placa, nos quais foram pipetados 40 µL de cada solução estudada, em triplicata. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas e o halo formado foi medido com paquímetro digital Mitutoyo.

4.3.2 Contagem de microrganismos viáveis

Para averiguar se as concentrações de SiO₂:NpAg utilizadas nos filmes de PVC são eficazes, foi realizado o Teste de Contagem de Microrganismos Viáveis com o compósito, nas mesmas concentrações presentes nos filmes. Desse modo, foram calculadas as concentrações de SiO₂:NpAg presentes numa área de 8 x 10 cm de cada filme (mesma área utilizada no experimento com os filmes - item 4.4.3). Assim, foram utilizadas nesse experimento as concentrações de 1,37, 3,5, 6,0 e 22,0 µg mL⁻¹ de compósito.

Com uma alça de inoculação, duas colônias de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de Caldo Nutriente estéril e mantidas em estufa a 35 °C por 12 a 16 horas. Posteriormente a concentração bacteriana foi ajustada para 1×10^6 UFC mL⁻¹.

¹ utilizando o padrão de turbidez McFarland. Uma Solução Estoque com 100 mL de Caldo Nutriente e 100 mg de SiO₂:NpAg foi preparada para que, a partir desta, as concentrações do experimento fossem ajustadas.

Erlenmeyers com 100 mL de Caldo Nutriente foram preparados, em triplicata, com 1 mL do microrganismo e com concentrações de 1,37, 3,5, 6,0 e 22,0 µg mL⁻¹ de SiO₂:NpAg, a partir da Solução Estoque. Os erlenmeyers foram mantidos em agitação constante a 35 °C e 150 rpm por 24 horas e, posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em Solução Salina Tamponada com Fosfato até 10⁻⁸, com plaqueamento das diluições 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸ pela técnica de Pour Plate. As placas foram mantidas em estufa a 35 °C por 24 horas e foi realizada a contagem de microrganismos viáveis, expressa em log de UFC mL⁻¹

4.4 Atividade antimicrobiana in vitro dos filmes de PVC

4.4.1 Norma JIS Z 2801:2000

Para avaliar a eficácia antimicrobiana dos filmes industriais e produzidos por *casting* em laboratório, foi utilizada a norma japonesa JIS Z 2801:2000 “*Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity and efficacy*” (46). Para o ensaio, foram utilizadas bactérias Gram negativas *Escherichia coli* e bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, as quais, a partir de uma cultura estoque, foram repicadas para tubos contendo Caldo Nutriente e mantidas em estufa a 35 °C por 16 a 20h. Após esse período, a suspensão bacteriana foi ajustada para 2,5 x 10⁵ UFC mL⁻¹ utilizando um espectrômetro

de Ultravioleta-Visível (UV-Vis), no comprimento de onda 625 nm e comparando a turvação do inóculo com a escala Mc Farland 0,5.

Filmes de PVC sem SiO₂:NpAg foram cortados, em triplicata, em amostras de 5 cm x 5 cm para compor o controle e filmes com SiO₂:NpAg foram cortados, na mesma medida, para compor os tratamentos do experimento. Filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) foram cortados em amostras de 4cm x 4 cm para cobertura de todas as amostras de PVC. Todas as amostras de filmes foram lavadas com álcool 70% por 15 minutos. Posteriormente, os filmes de PVC foram colocados individualmente em placas de Petri e, com o auxílio de uma micropipeta, 400 µL do inóculo foi colocado no centro do filme e recoberto com uma amostra de filme de polietileno, fazendo-se uma leve pressão para que o inóculo se espalhasse por toda área do filme (Figura 3).

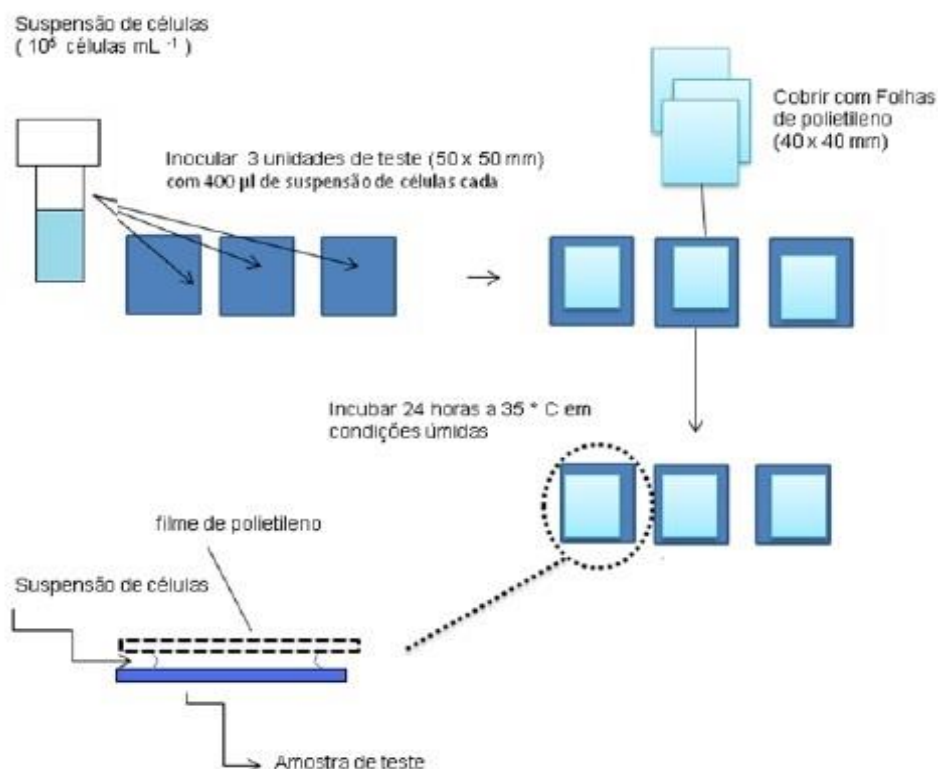


Figura 2. Fluxograma esquemático do procedimento da Norma JIS Z 201:2000. Modificado de: Gibelli, 2012.

Os filmes foram mantidos em estufa a 35 °C por 24 h, em bandejas forradas com papéis toalha umedecidos. Após esse período, os filmes foram lavados com 10 mL de caldo SCDLP e foram realizadas diluições seriadas em Solução Salina Tamponada com Fosfato até 10^{-7} . Em seguida, 1 mL das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foi plaqueada utilizando meio PCA (Plate Count Ágar), através da técnica do Pour Plate. As placas foram mantidas em estufa a 35 °C por 24 h para posterior contagem de microrganismos viáveis. A contagem foi multiplicada pelo inverso da diluição e os valores foram expressos em UFC mL^{-1} . A redução decimal (RD) dos microrganismos foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$RD = \log_{10} (B/A) - \log_{10} (C/A)$, onde:

RD = redução decimal;

A= média do número de colônias viáveis imediatamente após a inoculação para as amostras sem antimicrobiano;

B= média do número de colônias viáveis para as amostras sem antimicrobiano após 24 horas;

C= média do número de colônias viáveis para as amostras com antimicrobiano após 24 horas.

A redução percentual (RP) dos microrganismos foi calculada a partir da seguinte equação:

$RP = (1 - 10^{-RD}) \times 100$, onde:

RP= redução percentual

RD = redução decimal

Para os filmes industriais, foram utilizados como controle filmes de PVC sem $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ provenientes da empresa de soluções tecnológicas (denominado controle Referência) e filme de PVC comercial da marca Alpfilm (denominado controle Comercial). Para os filmes por *casting* foram utilizados como controle apenas os filmes produzidos pela técnica sem adição de NpAg.

4.4.2 Teste de Agitação em Frasco

De modo a avaliar a cinética microbiana, realizou-se o teste de agitação em frasco com curva de crescimento (47) com os filmes industriais. Nesse

ensaio, a eficácia dos filmes de PVC foi avaliada de acordo com o perfil de crescimento dos microrganismos ao longo do tempo.

A partir de uma cultura estoque dos microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), foi realizada uma suspensão microbiana, no qual 2 a 4 colônias de cada microrganismo foram inoculadas em 10 mL de Caldo Nutriente estéril e mantidas em estufa a 35 °C por 12 a 16 horas. A concentração final dos microrganismos foi ajustada para 1×10^6 UFC mL⁻¹ em espectrômetro UV-Vis utilizando-se o Padrão de turbidez McFarland.

Os filmes de PVC foram cortados em oito pedaços de 2 cm x 5 cm e lavados com álcool 70% por 15 minutos. Erlenmeyers de 250 mL foram preparados com 100 mL de Caldo Nutriente estéril, oito pedaços de filme e 1 mL do microrganismo. Após o preparo do material, uma alíquota de 2 mL foi imediatamente retirada e realizada a leitura da absorbância no tempo zero, em espectrômetro UV-Vís no comprimento de onda de 625 nm. Os erlenmeyers foram mantidos em agitação constante em shaker automático a 35 °C e 150 rpm durante 12 horas, com leituras de absorbância em intervalos de 2 horas. O experimento foi realizado em triplicata e erlenmeyers contendo filmes sem SiO₂:NpAg foram utilizados como controle. A partir das leituras de densidade ótica em função do tempo, foi determinada a curva de crescimento bacteriano para cada amostra.

4.4.3 Contagem de microrganismos viáveis

Para avaliar quantitativamente a inibição antimicrobiana dos filmes, foi realizado o teste de contagem de microrganismos viáveis. Erlenmeyers contendo 100 mL de Caldo Nutriente estéril foram preparados com 1 mL de microrganismo e oito pedaços de 2 cm x 5 cm e mantidos em agitação constante por 24 h a 35 °C e 150 rpm. Após esse período, 1 mL de cada amostra foi coletado e foram realizadas diluições seriadas em Solução Salina Tamponada com Fosfato até 10^{-8} . Posteriormente, 1 mL das diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} foram plaqueadas com meio PCA, utilizando-se a técnica do Pour Plate. As placas foram mantidas em estufa a 35 °C por 24 horas e foi realizada a contagem de microrganismos. Os resultados são apresentados em log de UFC mL⁻¹.

4.5 *Análise Estatística*

A comparação de médias do tamanho do halo de inibição no teste de difusão em ágar por poço foi realizada por Anova não paramétrica de Kruskal-Wallis. No Teste de Agitação em Frasco os valores de absorbância obtidos após 12 horas de experimento foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis. Para os testes de Contagem de Microrganismos Viáveis, a comparação de médias foi realizada por Anova de Regressão com efeitos aleatórios para a variável concentração. O software utilizado nas análises foi o R versão 3.5.1 e o nível de significância adotado em todas as análises foi de 5%.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização físico-química do compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura foram obtidas para avaliar a estrutura do compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$. A Figura 4 mostra uma imagem de MEV da amostra (esquerda) e seus principais elementos constituintes, detectados por Energia de Dispersão de Raio X (direita). Através da análise por EDS, pode-se observar que os elementos principais são sílica e oxigênio, sendo também detectado o pico da prata (Ag) (Figura 5).

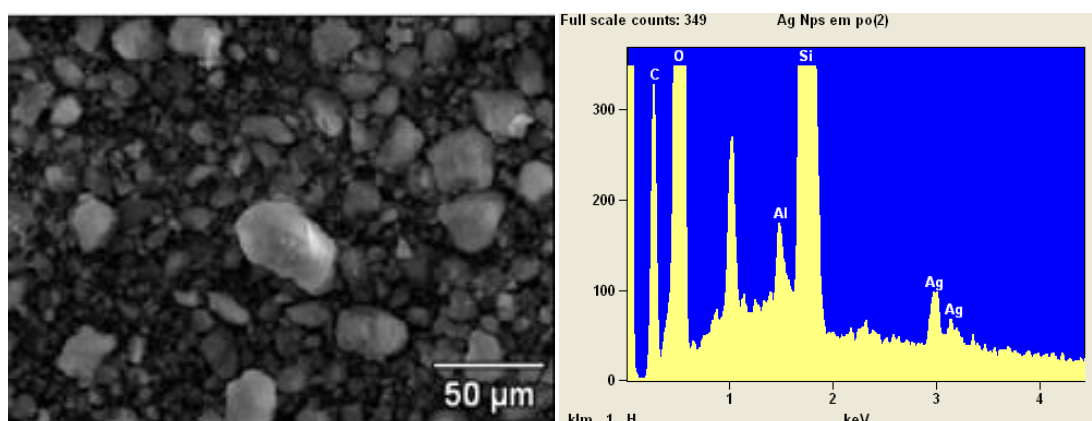


Figura 3. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ (esquerda) e mapeamento por EDS (direita).

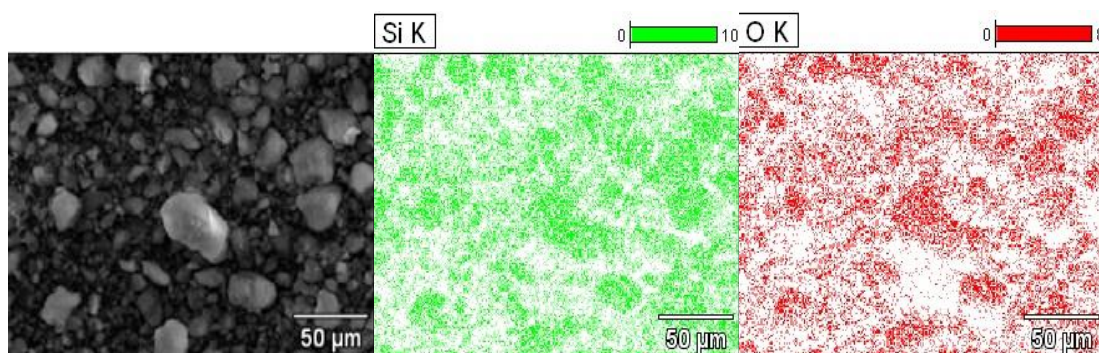


Figura 4. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$.

Partículas de SiO_2 mesoporosa possuem poros regulares e uma grande área superficial interna, além de alta estabilidade térmica e química (35), sendo muito utilizadas como matriz para impedir a aglomeração de nanopartículas (48). Dependendo da concentração, metais podem ser tóxicos para células procarióticas e eucarióticas. Metais como a prata e o alumínio podem afetar microrganismos desestabilizando a membrana celular e interferindo na cadeia de transporte de elétrons e bombeamento de prótons (49), (50).

Para realizar uma análise mais detalhada da amostra, foram feitas imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG) com detector de elétrons retroespalhados, auxiliando na visualização da sílica e das nanopartículas de prata (Figura 6). Observa-se na imagem que as nanopartículas de prata se apresentam dispersas pela sílica em baixa quantidade, como esperado devido sua baixa concentração (0,5%), formando pequenos agregados em alguns pontos.

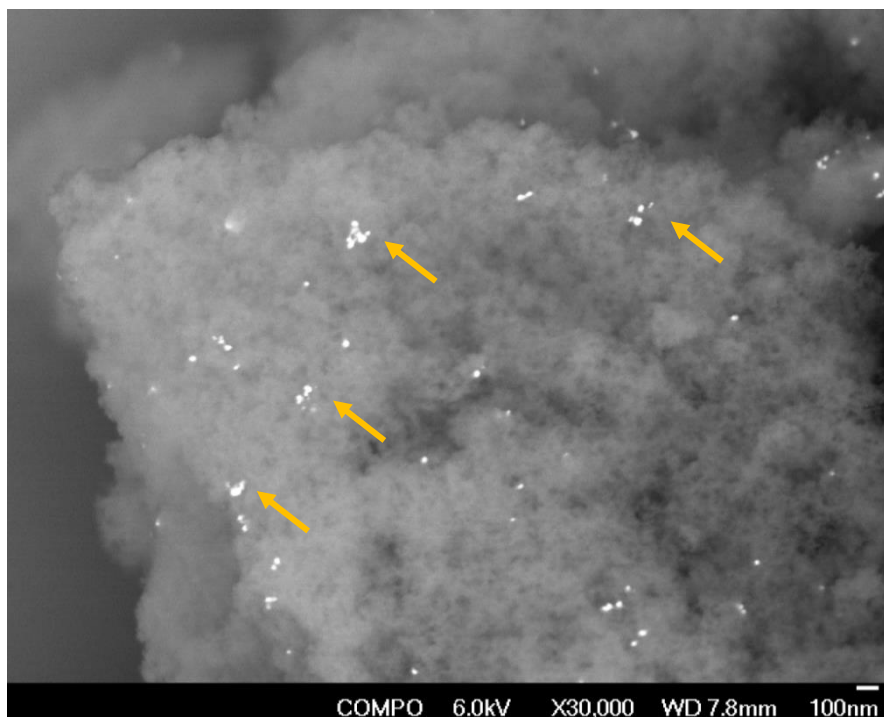


Figura 5. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG) do compósito SiO₂:NpAg. Pontos mais claros (indicados por setas) representam aglomerados de nanopartículas de prata.

5.1.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Segundo a literatura o dióxido de silício possui bandas características nas regiões de 1100, 800 e 470 cm⁻¹ (51). A Figura 7 mostra os espectros na região do infravermelho do compósito SiO₂:NpAg, onde as três bandas são evidenciadas: a vibração em 1071 cm⁻¹ corresponde ao estiramento simétrico Si-O-Si ao passo que a vibração em 798 cm⁻¹ corresponde ao seu estiramento assimétrico e a banda 458 cm⁻¹ evidencia a absorção da ligação Si-O (52). Além das bandas inerentes ao dióxido de silício, é observada a presença de outras bandas, indicando a possível presença de contaminantes adsorvidos no material.

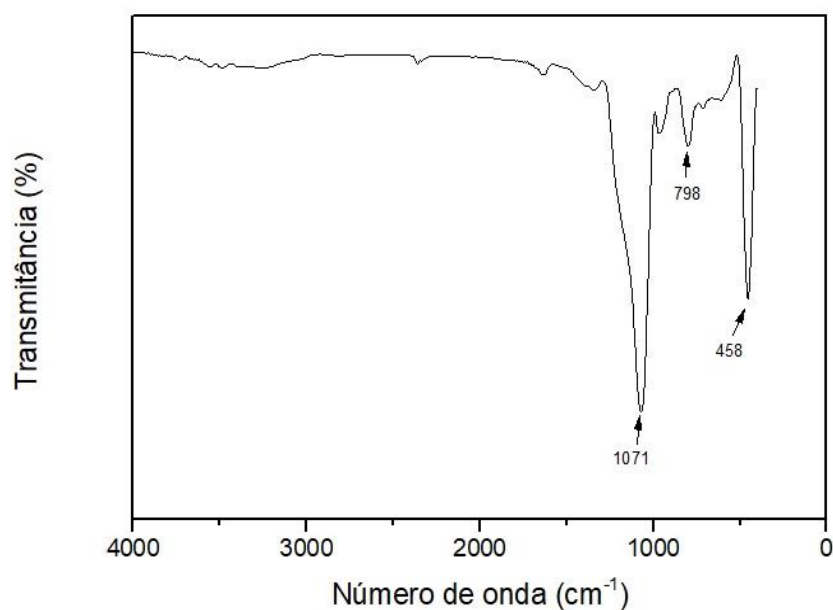


Figura 6. Espectro de FTIR do compósito SiO₂:NpAg.

5.1.3 Difração de Raios X (DRX)

Para complementar a caracterização estrutural do compósito, foi realizada a análise de DRX. Observa-se no difratograma da amostra (Figura 8) quatro picos de difração referentes a cristalização da prata, sendo, $2\theta = 38,2^\circ$ a $39,4^\circ$, $2\theta = 44,4^\circ$ a $44,6^\circ$, $2\theta = 63,5^\circ$ a $64,6^\circ$ e $2\theta = 77,6^\circ$ a $78,1^\circ$ (52) (53) (48). O difratograma ainda apresenta uma banda amorfa na região de 2θ entre 15 e 35° correspondente à sílica em seu estado amorfo .

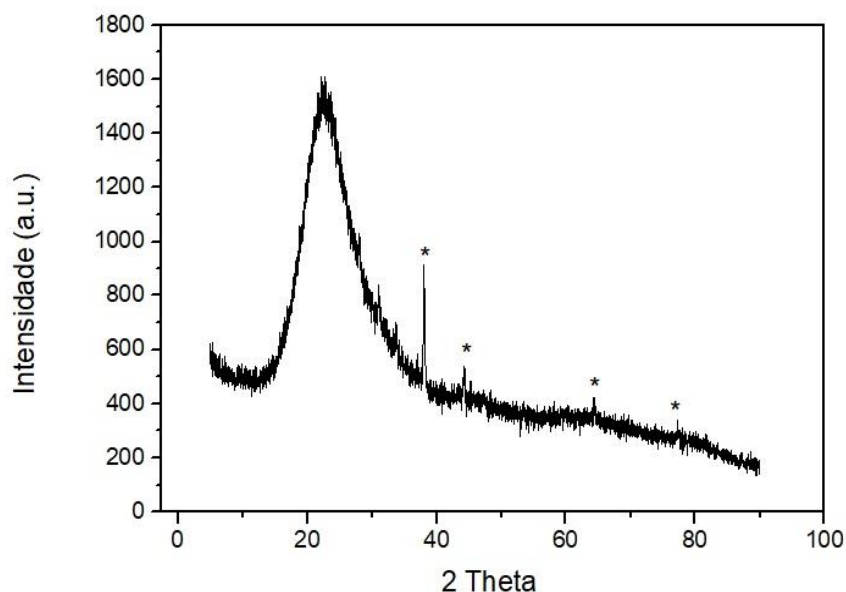


Figura 7. Difratoograma de Raios X (DRX) do compósito SiO₂:NpAg.

5.2 Caracterização físico-química de filmes de PVC

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Microscopias eletrônicas de varredura foram obtidas para analisar a morfologia dos filmes industrial e produzidos em laboratório, com e sem nanopartículas de prata e, através da análise por EDS, pôde-se mapear os principais componentes químicos que constituem os filmes. Todos os filmes apresentaram em sua composição C, O, Cl e Si, entretanto, a prata não pôde ser detectada pelo equipamento, possivelmente pela baixa concentração de nanopartículas.

As Figuras 9 a 18 apresentam os resultados do MEV e mapeamento dos principais elementos constituintes por EDS dos filmes industriais com e sem SiO₂:NpAg:

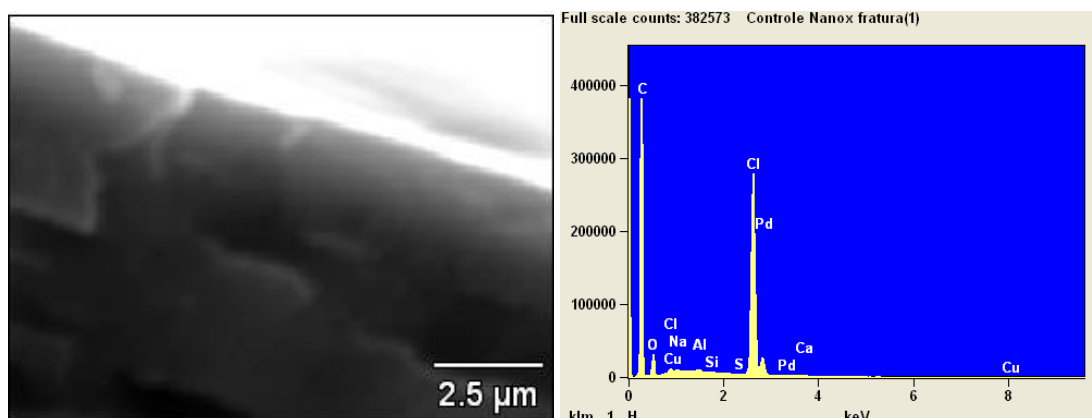


Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura de filmes de PVC industrial sem NpAg (esquerda) e análise por EDS (direita).

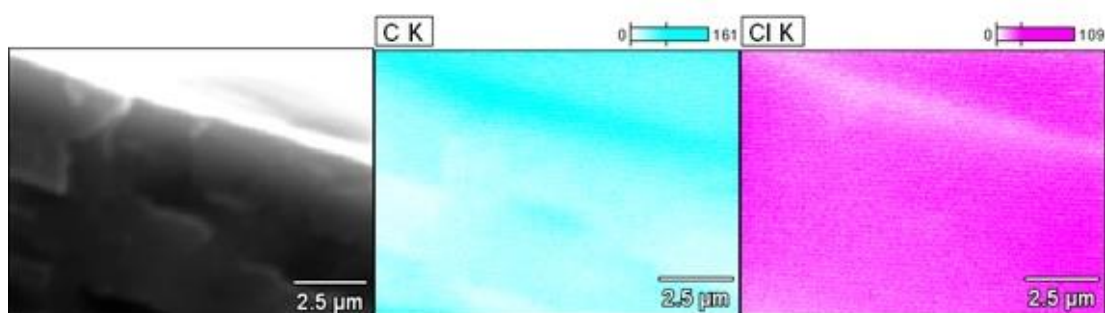


Figura 9. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do filme de PVC industrial sem NpAg.

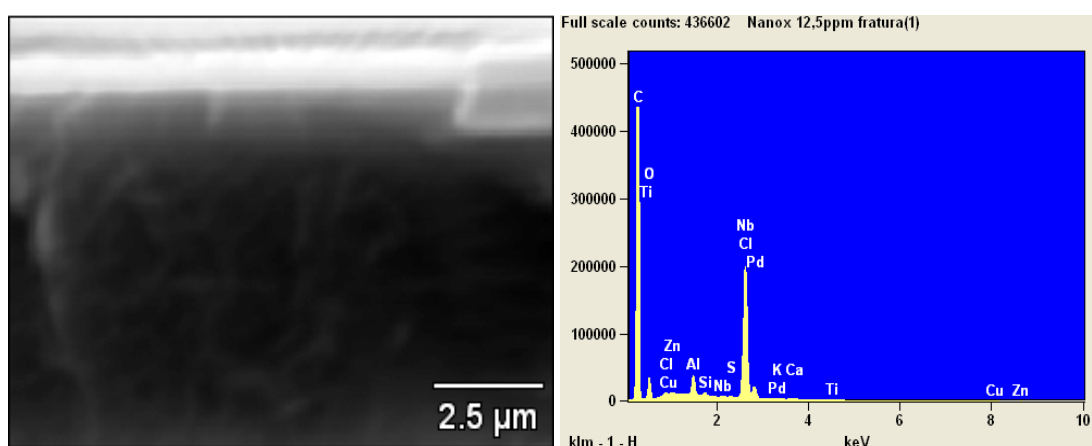


Figura 10. Microscopia Eletrônica de Varredura de filme de PVC industrial com 6,25 ppm de NpAg (esquerda) e análise por EDS (direita).

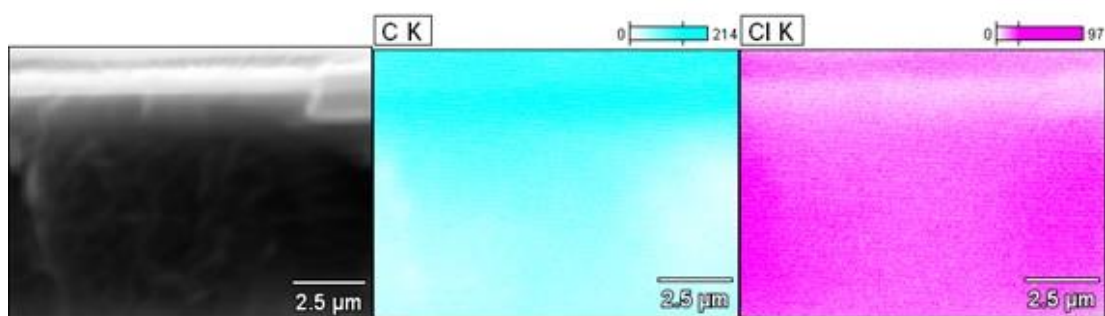


Figura 11. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do filme de PVC industrial com 6,25 ppm de NpAg.

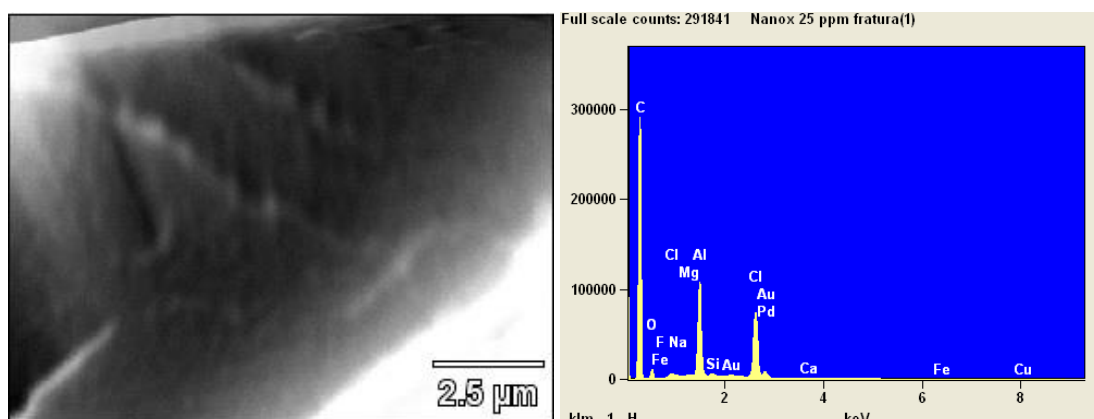


Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura de filme de PVC industrial com 12,5 ppm de NpAg (esquerda) e análise por EDS (direita).

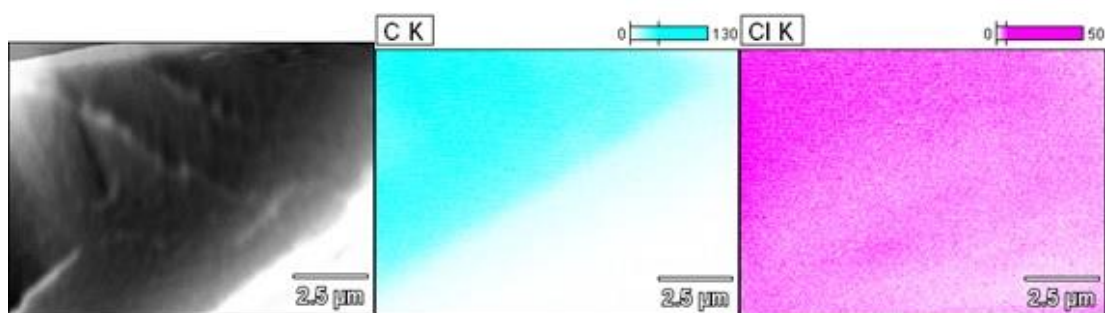


Figura 13. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do filme de PVC industrial com 12,5 ppm de NpAg.

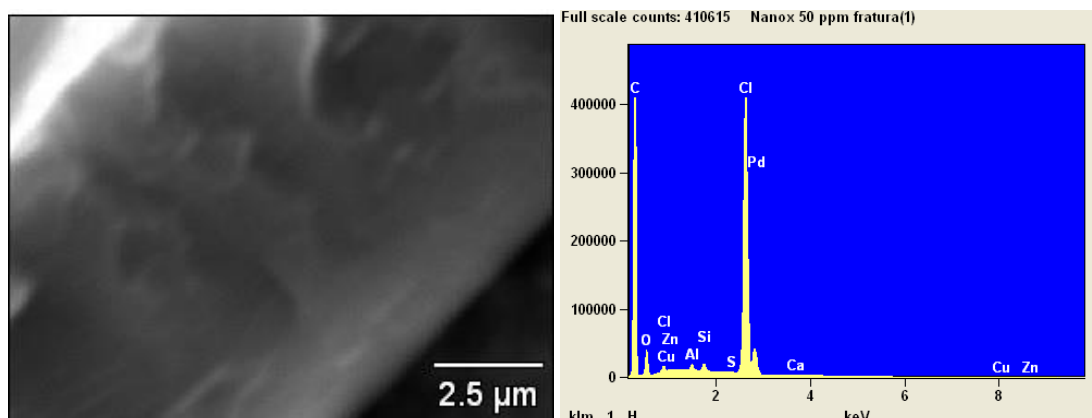


Figura 14. Microscopia Eletrônica de Varredura de filme de PVC industrial com 25 ppm de NpAg (esquerda) e análise por EDS (direita).



Figura 15. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do filme de PVC industrial com 25 ppm de NpAg.

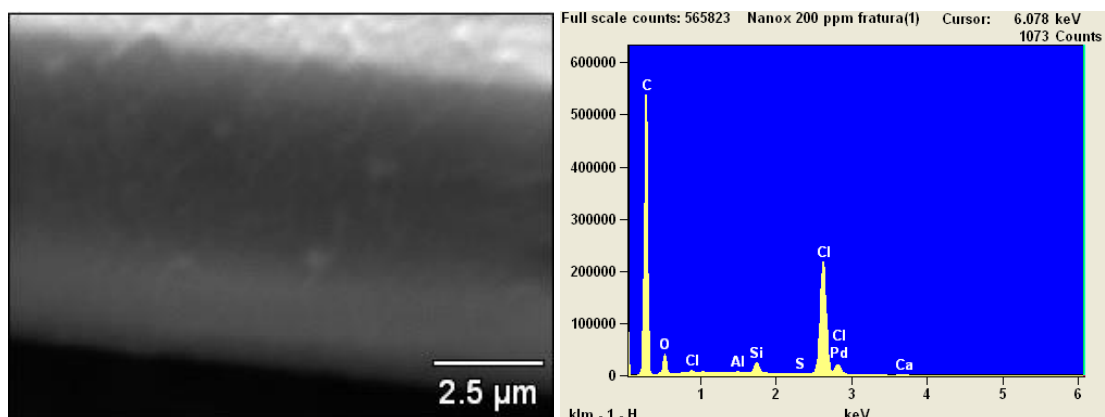


Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura de filme de PVC industrial com 100 ppm de NpAg (esquerda) e análise por EDS (direita).

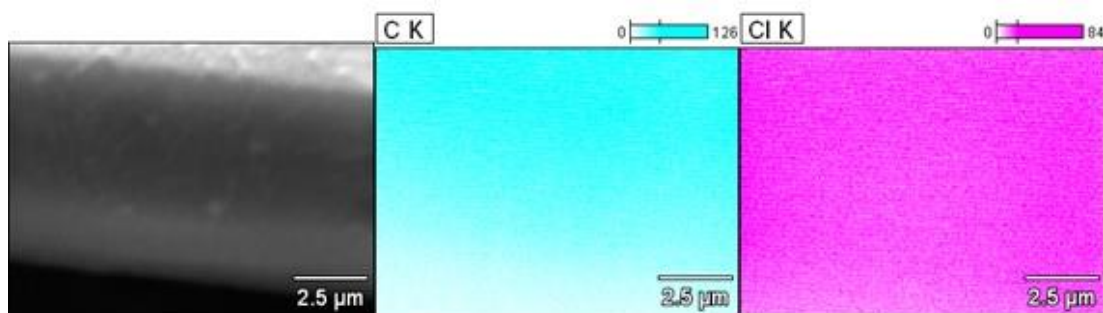


Figura 17. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do filme de PVC industrial com 100 ppm de NpAg.

As Figuras 19 a 26 apresentam os resultados do MEV e mapeamento por EDS dos filmes produzidos em laboratório por *casting*, com e sem SiO₂:NpAg:

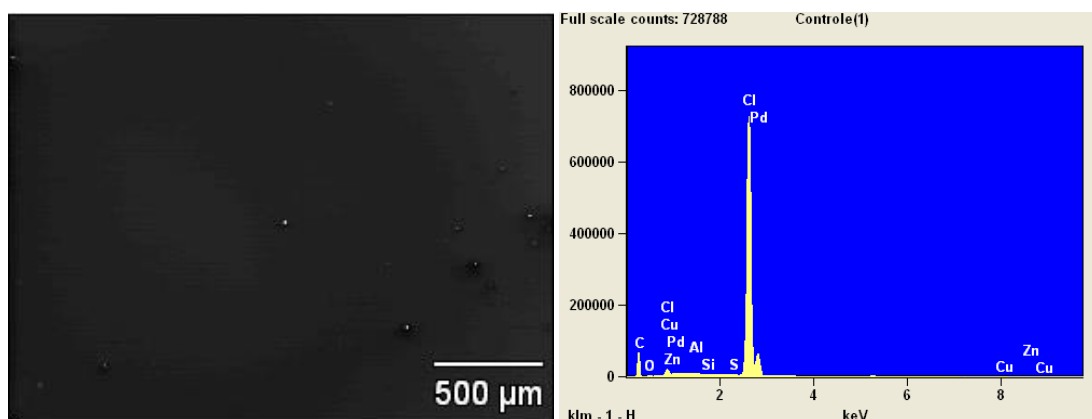


Figura 18. Microscopia Eletrônica de Varredura de filmes de PVC *casting* sem NpAg (esquerda) e análise por EDS (direita).

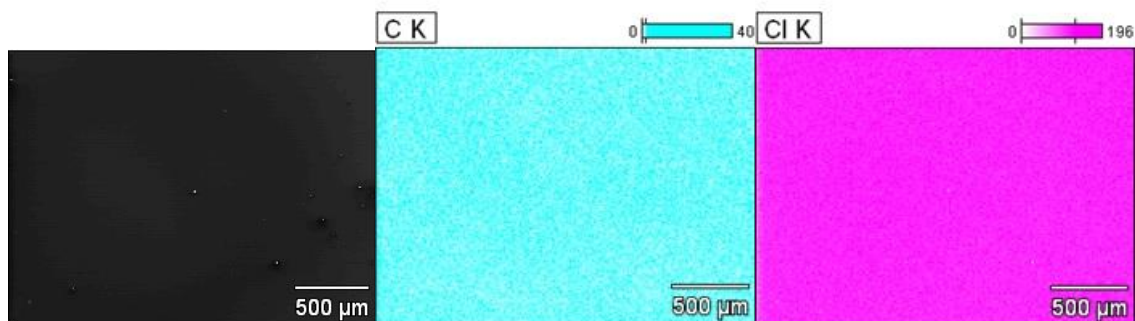


Figura 19. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do filme de PVC *casting* sem SiO₂:NpAg.

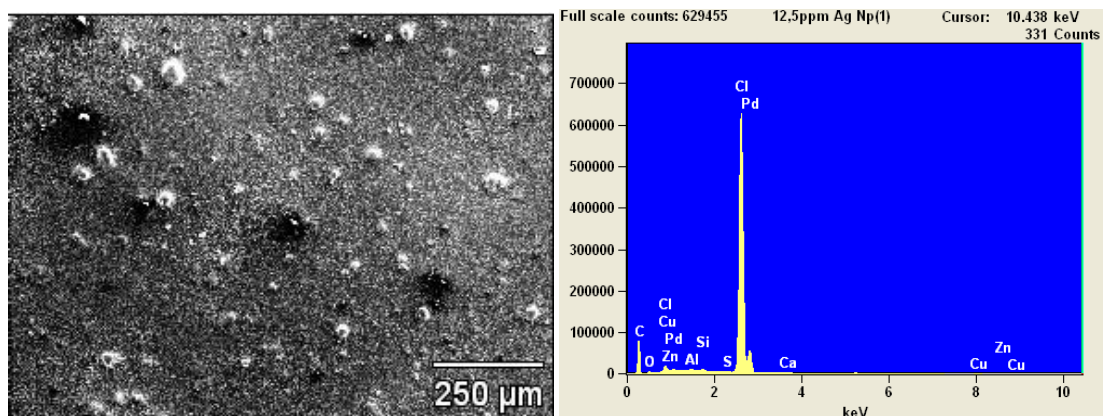


Figura 20. Microscopia Eletrônica de Varredura de filme de PVC *casting* com 12,5 ppm de NpAg (esquerda) e análise por EDS (direita).

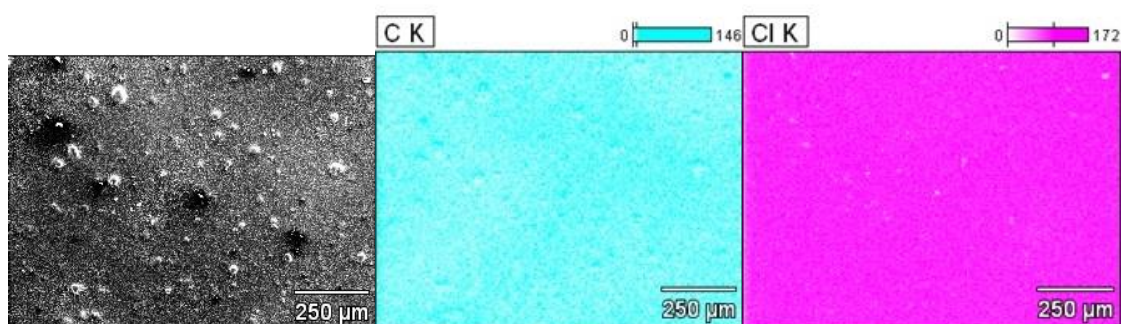


Figura 21. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do filme de PVC *casting* com 12,5 ppm de NpAg.

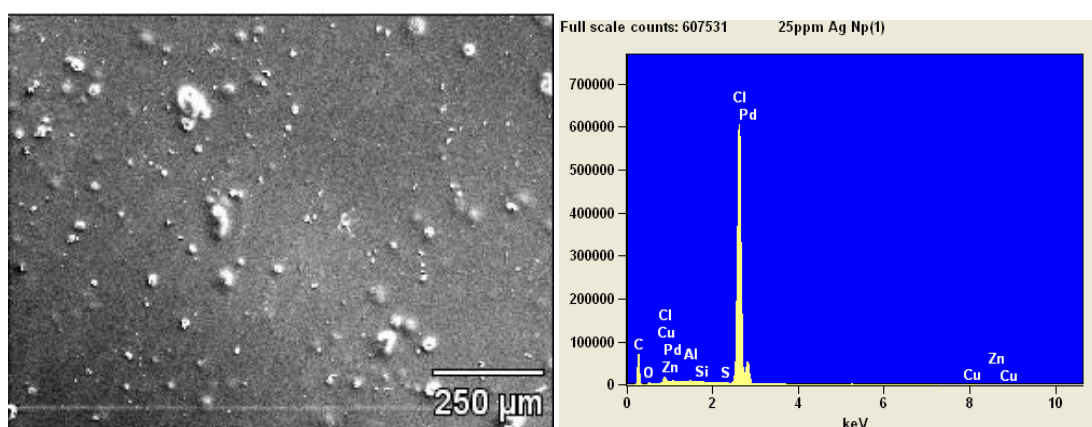


Figura 22. Microscopia Eletrônica de Varredura de filme de PVC *casting* com 25 ppm de NpAg (esquerda) e análise por EDS (direita).

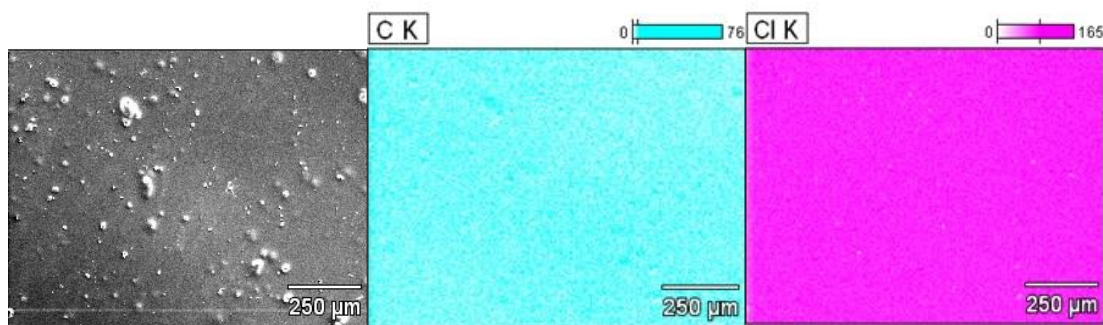


Figura 23. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do filme de PVC *casting* com 25 ppm de NpAg.

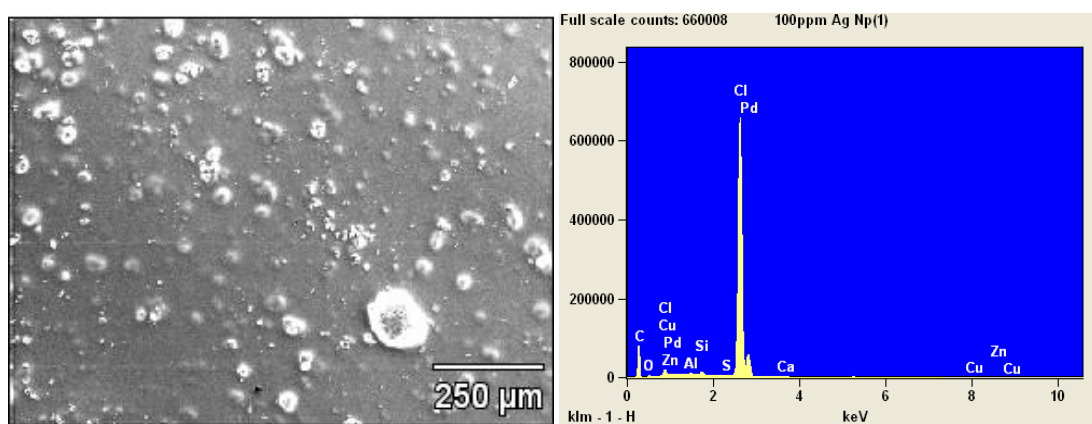


Figura 24. Microscopia Eletrônica de Varredura de filme de PVC *casting* com 100 ppm de NpAg (esquerda) e análise por EDS (direita).

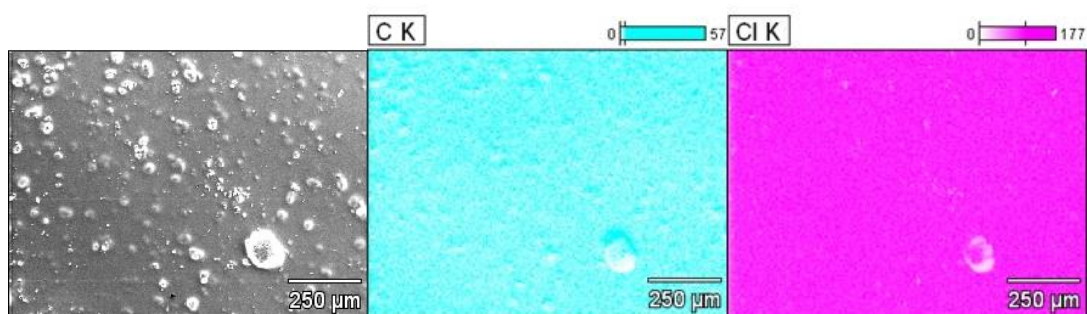


Figura 25. Mapeamento por EDS dos principais elementos constituintes do filme de PVC *casting* com 100 ppm de NpAg.

Pelas imagens de MEV os filmes industriais apresentaram uma estrutura mais lisa enquanto os filmes *casting* apresentaram aglomerados de sílica, decorrentes do método de confecção dos filmes. Imagens de

Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG) foram obtidas para observar detalhadamente a morfologia das amostras. As Figuras 27 e 28 mostram imagens de superfície e fratura dos filmes industriais.

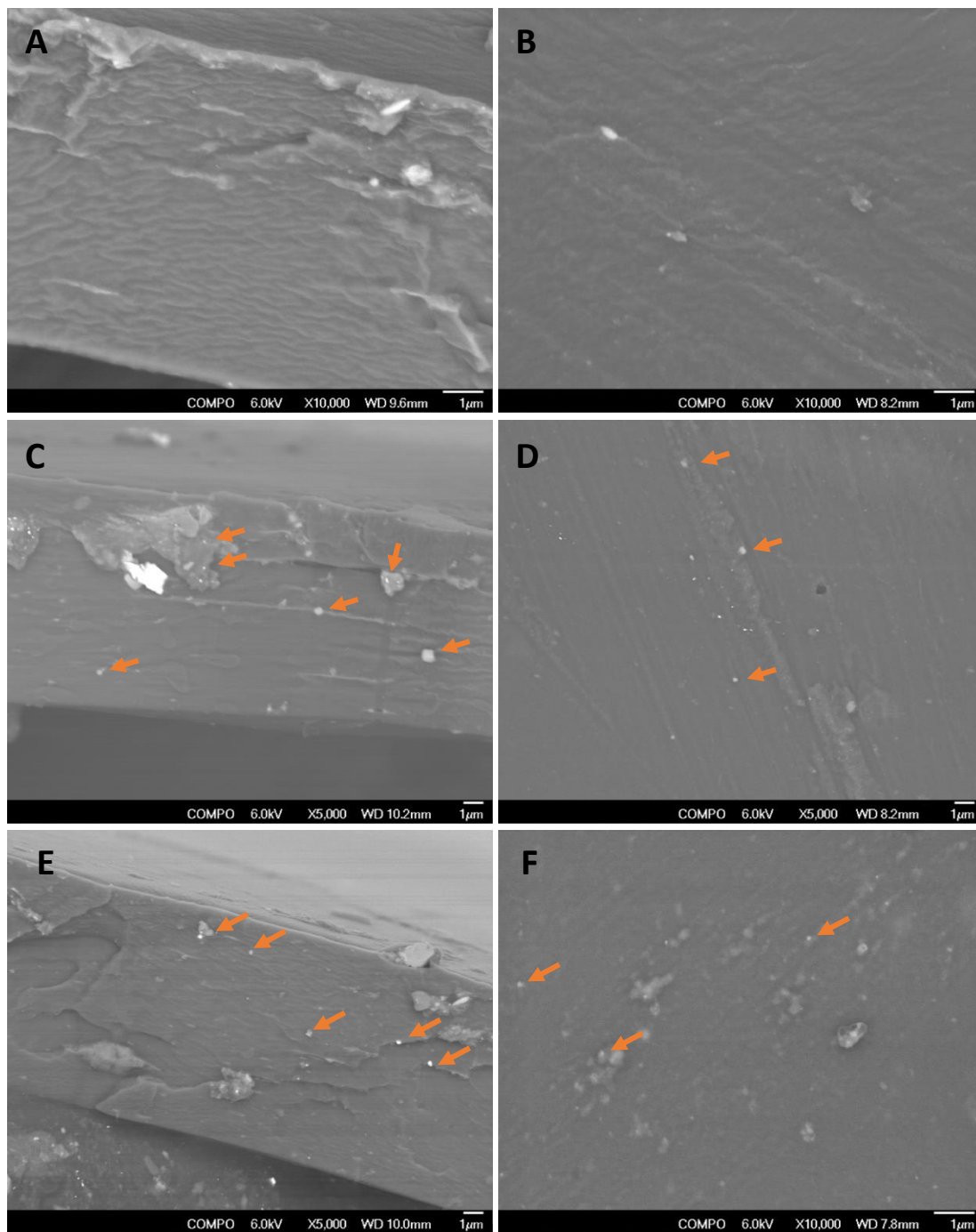


Figura 26. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG - SEM) de filmes de PVC industrial com e sem NpAg. Imagens da espessura por meio de fratura criogênica (esquerda) e imagens de superfície (direita). A e B = 0 ppm; C e D = 6,25 ppm; E e F = 12,5 ppm. Setas laranjas indicam aglomerados de dióxido de silício.

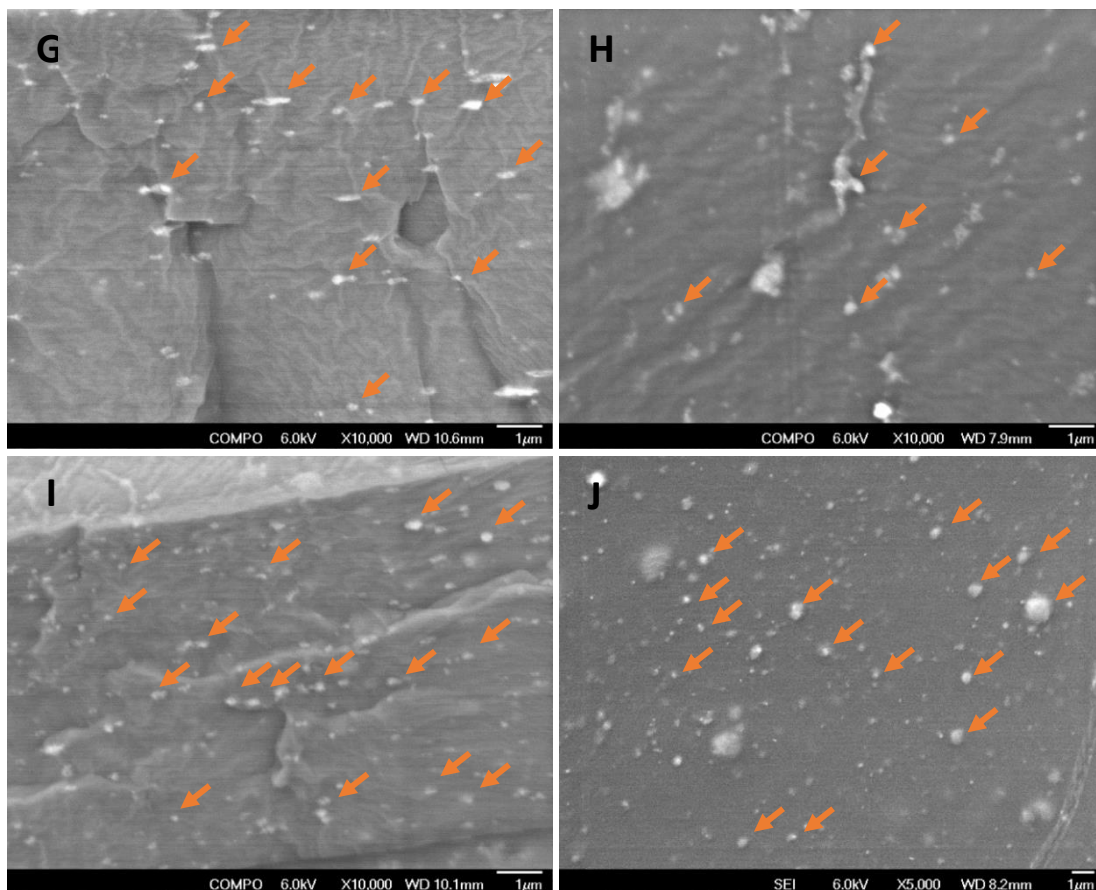


Figura 27. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG - SEM) de filmes de PVC com NpAg. Imagens da espessura por meio de fratura criogênica (esquerda) e imagens de superfície (direita). G e H = 25 ppm; I e J = 100ppm.

Pode-se observar, pela análise do FEG, o aumento crescente do compósito nos filmes (setas laranjas). Todas as amostras apresentaram material no interior bem como na superfície. Filmes com as concentrações de 25 e 100 ppm de NpAg apresentaram alguns aglomerados de sílica. No geral, o compósito apresenta uma distribuição homogênea na matriz polimérica devido o método de extrusão, entretanto, muito material de sílica encontra-se aprisionado no interior do filme.

As imagens de FEG dos filmes produzidos por *casting* são apresentadas nas figuras 29 e 30:

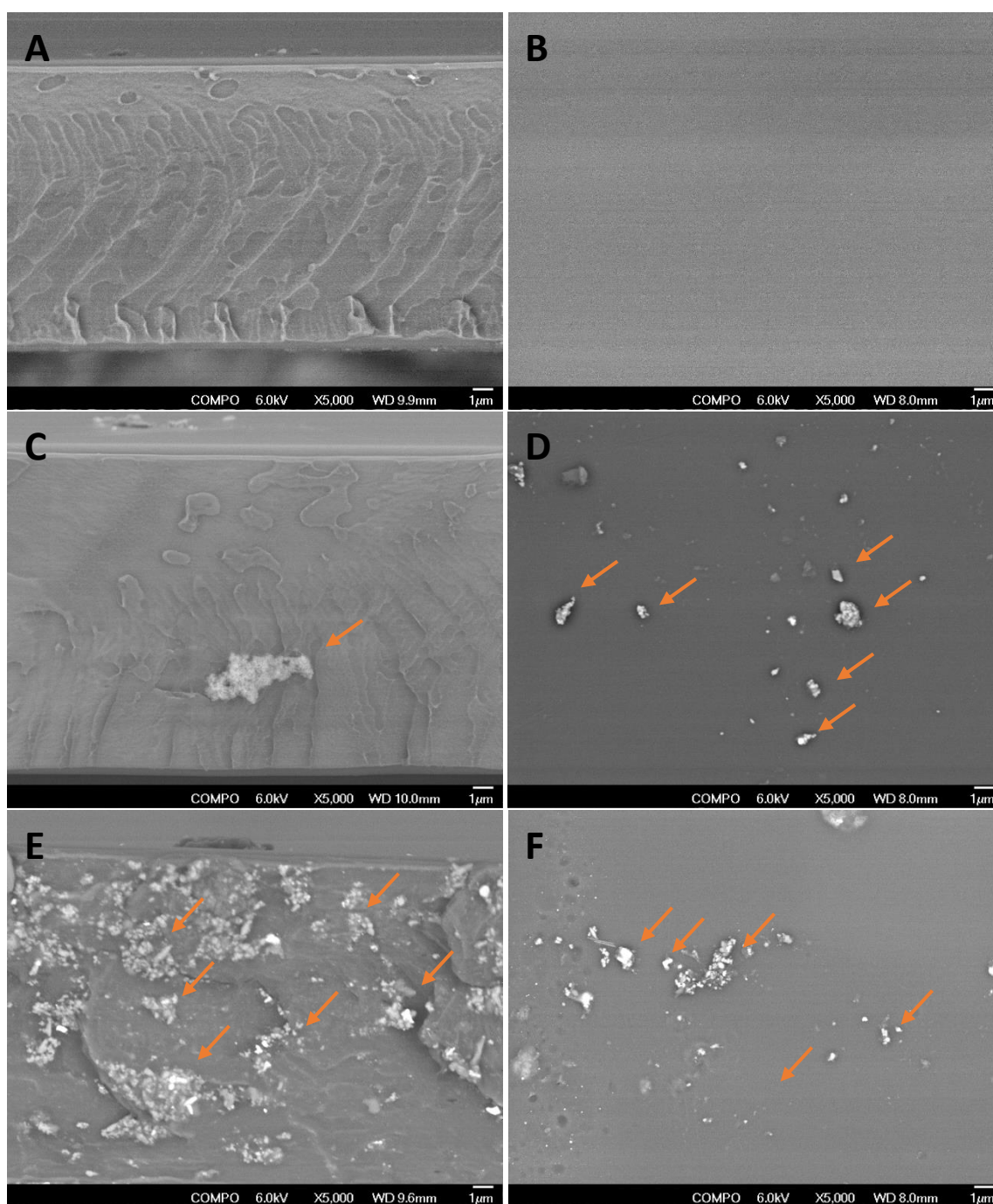


Figura 28. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG - SEM) de filmes de PVC produzidos em laboratório com e sem NpAg. Imagens da espessura por meio de fratura criogênica (esquerda) e imagens de superfície (direita). A e B = 0 ppm; C e D = 12,5 ppm; E e F = 25 ppm. Setas laranjas indicam aglomerados de dióxido de silício.

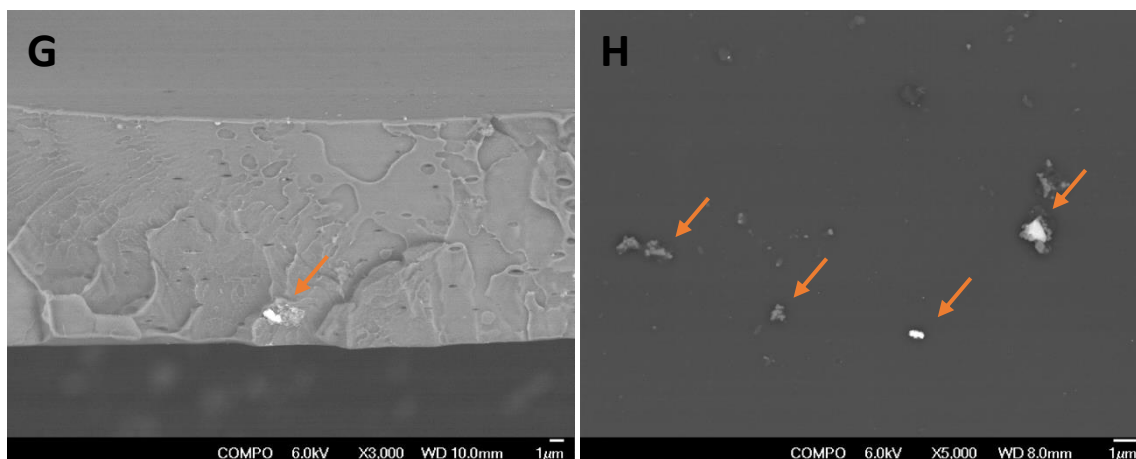


Figura 29. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG - SEM) de filmes de PVC produzidos por *casting* com NpAg. Imagens da espessura por meio de fratura criogênica (esquerda) e imagens de superfície (direita). G e H = 100ppm.

Através das imagens de FEG, pode-se observar a presença de compósito tanto no interior quanto na superfície dos filmes *casting*. Entretanto, quando comparados aos industriais, os filmes *casting* apresentaram uma má dispersão do material, ocasionando grandes aglomerados de sílica (setas laranja). Essa dispersão heterogênea fica mais evidente na amostra com 100 ppm de NpAg (Figura 30. G-H), a qual apresenta pouco material de sílica na área de filme da microscopia. Essa característica é observada porque nos filmes *casting* não é utilizado nenhum compatibilizante, visto que o objetivo era apenas investigar a interação do compósito com o polímero.

O processo de extrusão é um método capaz de produzir filmes em larga escala, com uma boa capacidade de mistura e baixo custo, sendo amplamente utilizado na indústria (54). Já a técnica de *casting* caracteriza-se por ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo, além de utilizar pouco material, sendo mais aplicada em experimentos laboratoriais (55). Pela microscopia é possível visualizar a diferença na dispersão do compósito na

matriz polimérica nas duas técnicas, podendo influenciar na atividade antimicrobiana dos filmes.

5.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais presente nos filmes industriais e produzidos por *casting*, com e sem SiO₂:NpAg, foram determinados pelas bandas de absorção do espectro do infravermelho, representados nas Figuras 31 e 32. Pode-se observar que a adição de nanopartículas de prata não alterou significativamente os espectros. Todas as amostras apresentaram bandas características do polímero de PVC, descritas no Quadro 2 (51), (55), (56):

Bandas PVC industrial (cm⁻¹)	Bandas PVC <i>casting</i> (cm⁻¹)	Grupo funcional
1432	1431	Deformação angular de CH ₂
1333	1331	Deformação angular de CH ₂
1232	1245	Estiramento C-Cl
836	836	Estiramento C-Cl
686	687	Estiramento C-Cl

Quadro 2: bandas de absorção do espectro do infravermelho de filmes de PVC.

As bandas nas regiões de 1071 cm⁻¹, 791 cm⁻¹ e 458 cm⁻¹ encontradas no espectro do compósito de SiO₂:NpAg foram mascaradas nos espectros dos filmes de PVC, possivelmente devido à alta concentração de polímero e baixa concentração de compósito. A interação entre as nanopartículas de prata e a matriz polimérica também não pôde ser observada, devido à baixa quantidade de NpAg.

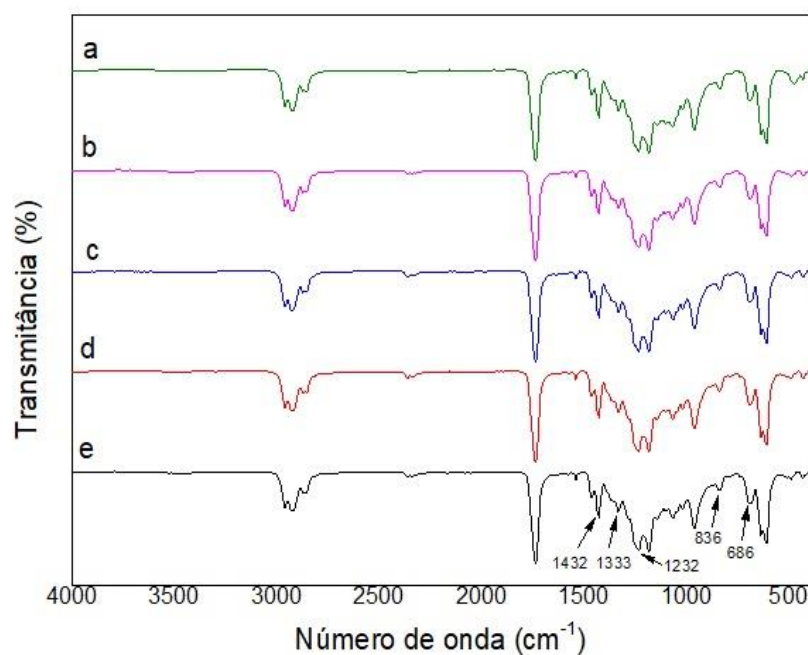


Figura 30. Espectros de FTIR de filmes de PVC industrial com diferentes concentrações de NpAg. A= 0 ppm; B= 6,25 ppm; C= 12,5 ppm; D= 25 ppm; E= 100 ppm.

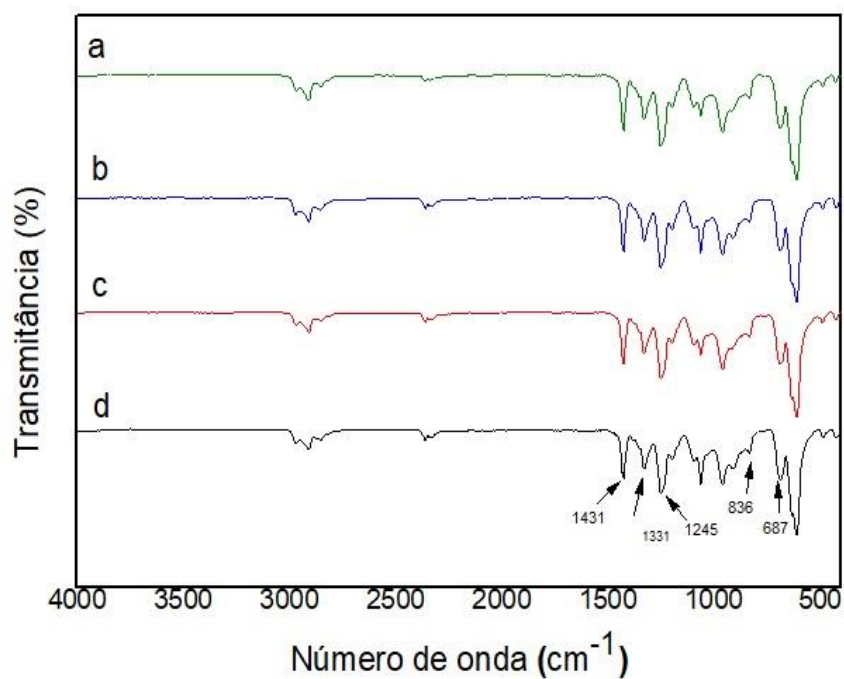


Figura 31. Espectros de FTIR de filmes de PVC por *casting* com diferentes concentrações de NpAg. A= 0 ppm; B= 12,5 ppm; C= 25 ppm; D= 100 ppm.

5.2.3 Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X dos filmes de PVC industrial e sintetizados em laboratório são mostradas nas Figuras 33 e 34, respectivamente. Os filmes sem $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ (Figuras 30.a e 31.a) apresentaram uma estrutura amorfa, como relatado na literatura (51). Os demais filmes apresentaram uma estrutura semelhante ao PVC puro correspondente, sugerindo que o processamento não alterou a estrutura do PVC. Os picos referentes à prata detectados no DRX do compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ não foram observados, possivelmente devido à baixa concentração de NpAg adicionada aos filmes, estando abaixo do limite de detecção do equipamento.

Braga e colaboradores (2018) (55) sintetizaram filmes de PVC com diferentes concentrações de nanopartículas de prata e detectaram a fase cristalina da prata apenas nos difratogramas dos filmes com concentrações mais altas (4% e 8% NpAg), não sendo detectadas nas concentrações inferiores. Becaro e colaboradores, ao trabalhar com polietileno de baixa densidade (PEBD) com nanopartículas de prata, também observaram a cristalinidade da prata apenas nas concentrações mais altas (57) Todas as concentrações detectadas em DRX pelos autores são superiores às concentrações utilizadas nessa pesquisa.

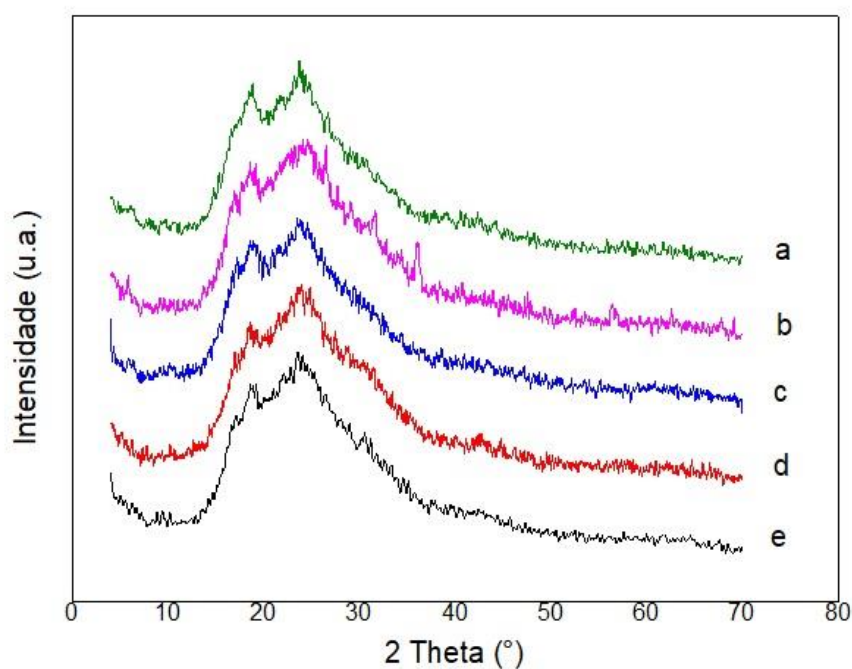


Figura 32. Difratoograma de Raios X de filmes de PVC industrial com diferentes concentrações de NpAg. A= 0 ppm; B= 6,25 ppm; C= 12,5 ppm; D= 25 ppm; E= 100 ppm.

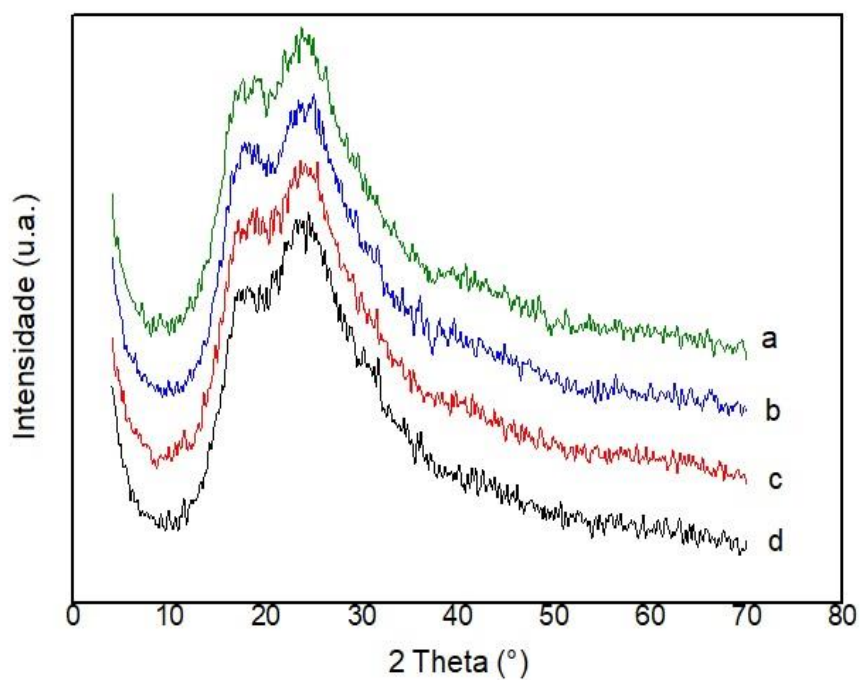


Figura 33. Difratoograma de Raios X de filmes de PVC produzido em laboratório com diferentes concentrações de NpAg. A= 0 ppm; B= 6,25 ppm; C= 12,5 ppm; D= 25 ppm; E= 100 ppm.

5.2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As curvas de DSC dos filmes de PVC industrial e produzidos em laboratório com e sem o compósito são apresentadas nas Figuras 35 e 36, respectivamente. A partir das curvas de DSC, foi obtida a Temperatura de transição vítrea (T_g), utilizada para avaliar a rigidez das cadeias poliméricas (58). Os valores de T_g dos filmes industriais são apresentados na Tabela 1 e dos filmes produzidos em laboratório na Tabela 2.

Os filmes industriais apresentaram os valores de T_g menor que os filmes produzidos em laboratório. Esse fenômeno é observado devido a presença de plastificantes e outros aditivos nesses filmes, que ocasionam a diminuição da T_g quando comparados a filmes sem plastificantes (59)(56).

Os filmes nanocompósitos apresentaram uma diminuição da T_g em relação ao filme puro, tanto para os industriais quanto os laboratoriais. Isso ocorre porque a aglomeração de sílica, observada nos polímeros por FEG, diminui sua superfície de contato, podendo diminuir a interação entre a sílica e as cadeias poliméricas (58), interferindo pouco na mobilidade das cadeias.

Segundo Taha e Azab (2019) (60), se nanopartículas apresentam atração pelo polímero a T_g aumenta, entretanto, se há repulsão, a T_g diminui. Nesse sentido, é possível que tenha ocorrido repulsão entre as nanopartículas de prata e o polímero, resultando na diminuição da T_g . Entretanto, apesar da diminuição observada, o comportamento do gráfico foi semelhante entre os nanocompósitos e seus respectivos controles, indicando que não há alteração significativa no polímero.

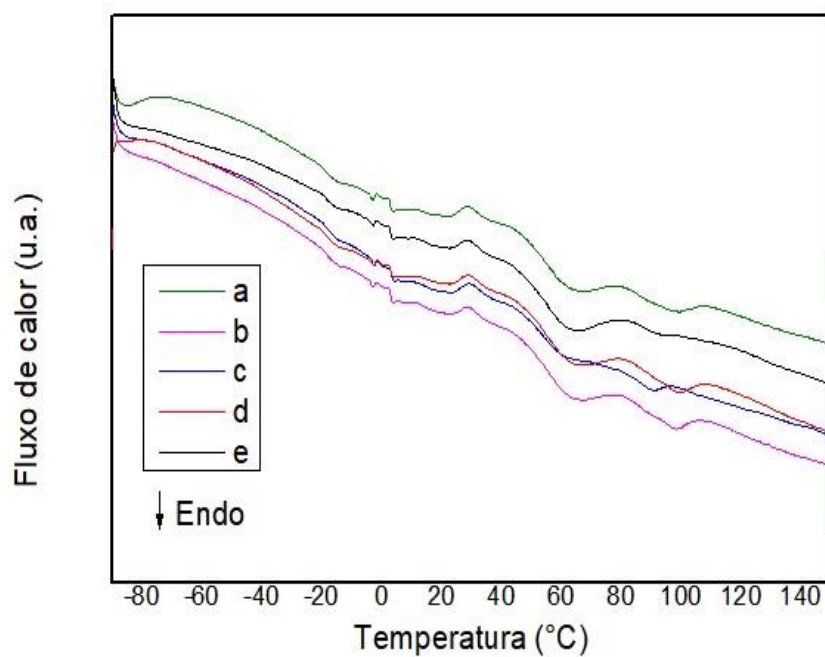


Figura 34. Calorimetria Diferencial de Varredura de filmes de PVC industrial com diferentes concentrações de NpAg. A= 0 ppm; B= 6,25 ppm; C= 12,5 ppm; D= 25 ppm; E= 100 ppm.

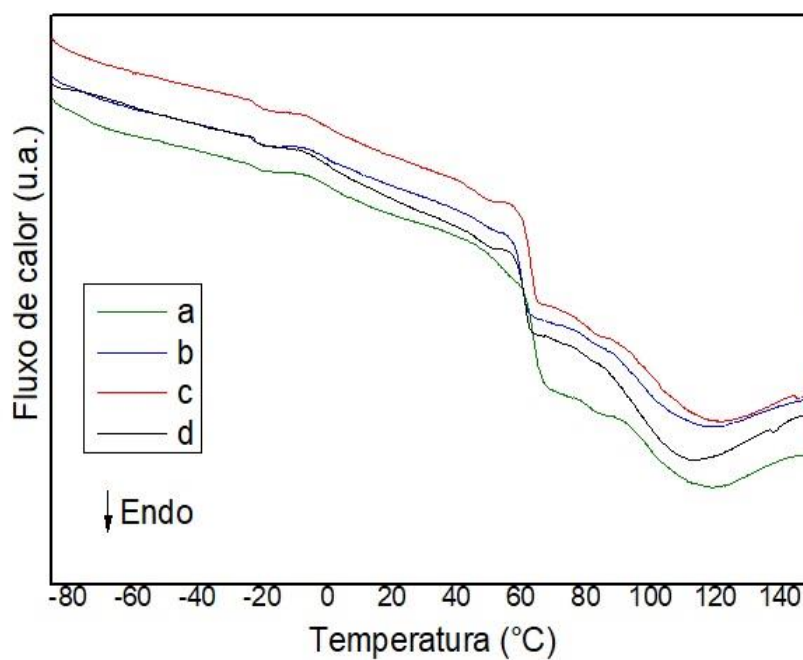


Figura 35. Calorimetria Diferencial de Varredura de filmes de PVC produzido em laboratório com diferentes concentrações de NpAg. A= 0 ppm; B= 6,25 ppm; C= 12,5 ppm; D= 25 ppm; E= 100 ppm.

Tabela 1: Temperatura de transição vítrea (T_g) de filmes de PVC industrial com diferentes concentrações de NpAg.

Sample (ppm NpAg)	T_g (°C)
0	52,39
6,25	51,32
12,5	50,13
25	52,05
100	47,23

Tabela 2: Temperatura de transição vítrea (T_g) de filmes de PVC produzidos em laboratório com diferentes concentrações de NpAg.

Sample (ppm NpAg)	T_g (°C)
0	63,56
12,5	60,1
25	62,25
100	60,46

5.3 Avaliação antimicrobiana do compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$

5.3.1 Difusão em ágar por poço

O teste de difusão em ágar por poço foi realizado com o compósito em suspensão nas mesmas concentrações dos filmes de PVC industrial (6,25, 12,5, 25 e 100 ppm de NpAg). O diâmetro do halo formado indica a suscetibilidade dos microrganismos ao material testado (61). As Figuras 37 e 38 apresentam imagens do halo formado para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, e a Tabela 3 apresenta a média e desvio padrão dos halos de inibição.



Figura 36. Halo de inibição formado pelo compósito em suspensão contra *Escherichia coli*. A = 6,25 ppm; B = 12,5 ppm; C = 25 ppm; D = 100 ppm NpAg.

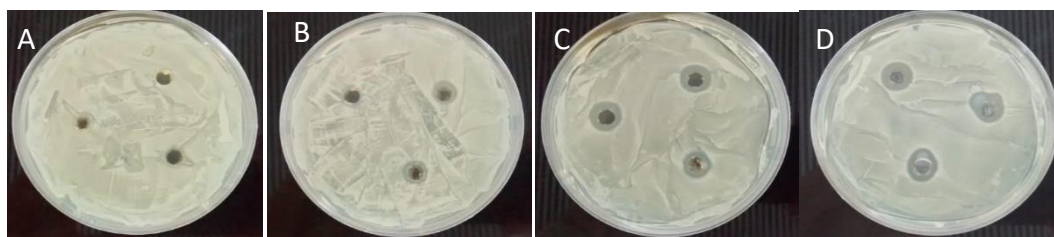


Figura 37. Halo de inibição formado pelo compósito em suspensão contra *Staphylococcus aureus*. A = 6,25 ppm; B = 12,5 ppm; C = 25 ppm; D = 100 ppm NpAg.

Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) formado pela suspensão do compósito SiO₂:NpAg.

Concentração NpAg (ppm)	Diâmetro (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
6.25	0,54 $\pm$ 0,16 ^a	—
12.5	1,95 $\pm$ 0,23 ^a	1,72 $\pm$ 0,01 ^b
25	1,75 $\pm$ 0,16 ^a	3,51 $\pm$ 0,36 ^a
100	1,89 $\pm$ 0,05 ^a	3,71 $\pm$ 0,20 ^a

Números com letras iguais nas colunas não apresentam diferença significativa segundo o teste de Kruskal-Wallis.

A concentração de 6,25 ppm de nanopartículas de prata não formou halo de inibição para *S. aureus*, entretanto, as demais concentrações apresentaram inibição para ambos microrganismos, indicando a eficácia do compósito testado. Para *S. aureus*, o diâmetro do halo aumentou com o aumento das concentrações de nanopartículas e a concentração de 100 ppm ficou no limite de significância ($p = 0,06$), sendo considerado estatisticamente

diferente das demais concentrações, indicando maior suscetibilidade de *S. aureus* em relação a *E. coli*.

Kowsalya e colaboradores (2019) (62) realizaram o teste de difusão em ágar com nanopartículas de prata nas concentrações de 15, 30, 45 e 60 ppm, contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* e observaram que todos os microrganismos apresentaram halo de inibição para todas as concentrações testadas, sendo as bactérias Gram positivas mais sensíveis que as bactérias Gram negativas. Esses resultados confirmam a eficácia das concentrações de nanopartículas de prata utilizadas na presente pesquisa, bem como a maior sensibilidade de *S. aureus* em relação a *E. coli*.

A maior suscetibilidade a NpAg de *S. aureus* em relação a *E. coli* está de acordo com a literatura (63)(57) e é atribuída à diferença da parede celular desses microrganismos. Bactérias Gram positivas e Gram negativas apresentam uma diferença estrutural na membrana: bactérias Gram negativas possuem uma fina camada de peptídeoglicana entre sua membrana e a parede celular, ao passo que bactérias Gram positivas possuem várias camadas dessa substância, formando uma estrutura espessa e rígida (64). Entretanto, bactérias Gram negativas apresentam uma membrana externa, ausente em Gram positivas, que lhes confere maior proteção. Ainda, bactérias Gram-positivas possuem ácidos teicóicos em suas paredes, que possuem carga negativa e auxiliam na entrada e saída de cátions do interior da célula (64), podendo atrair e facilitar a entrada de íons Ag^+ .

5.3.2 Contagem de microrganismos viáveis

O teste de agitação em frasco com contagem de microrganismos viáveis foi realizado com o compósito nas mesmas concentrações presentes numa área de 8 x 10 cm de cada filme (área utilizada nesse mesmo experimento com os filmes). O objetivo desse experimento foi avaliar se as concentrações de compósito presentes numa área de 8 x 10 cm de filmes são suficientes para inibir o crescimento microbiano. Desse modo, foram utilizadas as concentrações de 1,37, 3,5, 6,0 e 22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de compósito, correspondentes aos filmes com 6,25, 12,5, 25 e 100 ppm, respectivamente. O experimento foi executado duas vezes para *E. coli* e uma vez para *S. aureus*. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão de log de UFC mL⁻¹ para o experimento de Contagem de Microrganismos Viáveis com compósito SiO₂:NpAg.

bactéria	Concentração de compósito SiO ₂ :NpAg ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	0	1,37	3,5	6	22
<i>E. coli</i> 1	8,90 $\pm$ 0,11 ^a	8,51 $\pm$ 0,24 ^a	8,54 $\pm$ 0,22 ^a	8,81 $\pm$ 0,06 ^a	8,94 $\pm$ 0,21 ^a
<i>E. coli</i> 2	9,23 $\pm$ 0,11 ^a	9,08 $\pm$ 0,19 ^a	9,30 $\pm$ 0,11 ^a	9,02 $\pm$ 0,34 ^a	9,26 $\pm$ 0,19 ^a
<i>S. aureus</i>	9,01 $\pm$ 0,03 ^a	8,98 $\pm$ 0,08 ^a	8,96 $\pm$ 0,05 ^a	9,03 $\pm$ 0,06 ^a	8,87 $\pm$ 0,06 ^b

Números com letras iguais nas linhas não apresentam diferença significativa segundo teste Anova de Regressão.

Segundo a regressão, não houve relação significativa entre o log de UFC mL⁻¹ e a concentração de compósito nos experimentos com *E. coli* (p=0,121 e p=0,602 para os experimentos 1 e 2 respectivamente). Para *S. aureus* houve uma tendência de redução de 0,056 log de UFC mL⁻¹ para cada unidade de concentração acrescida (p=0,013). Entretanto, *S. aureus* apresentou $r^2 = 0,37$, não sendo considerado uma redução importante do ponto de vista prático.

5.4 Avaliação antimicrobiana dos filmes de PVC

5.4.1 Teste antimicrobiano segundo Norma JIS Z 2801:2000

Os testes segundo a Norma JIS Z 2801:2000 foram realizados para avaliar quantitativamente a inibição dos filmes de PVC industriais e produzidos por *casting*. Para os filmes industriais, foram utilizados como controle filmes de PVC sem NpAg de mesma matriz dos filmes com NpAg (denominado controle Referência) e filmes de PVC sem NpAg da marca Apfilm, adquiridos comercialmente (denominado controle Comercial). Os resultados da inibição dos filmes de PVC industrial com NpAg são apresentados nas Tabelas 5 a 8 para *E. coli* e 9 e 10 para *S. aureus*.

Tabela 5. Resultados da inibição de *E. coli* por filmes de PVC industrial com concentrações de 0, 6,25 e 25 ppm de NpAg, comparados com filmes controle Comercial.

<i>Escherichia coli</i>			
	Inóculo para cálculo base	Concentração após 24 h (UFC mL ⁻¹)	Redução (%)
0	$9,8 \times 10^8$	$9,8 \times 10^8 \pm 1,79$	-
6,25	$9,8 \times 10^8$	$9,36 \times 10^8 \pm 0,86$	3,43
25	$9,8 \times 10^8$	$9,46 \times 10^8 \pm 1,10$	2,59

Tabela 6. Resultados da inibição de *E. coli* por filmes de PVC industrial com concentrações de 0, 12,5 e 100 ppm de NpAg, comparados com filmes controle Comercial.

<i>Escherichia coli</i>			
	Inóculo para cálculo base	Concentração após 24 h (UFC mL ⁻¹)	Redução (%)
0	6,85 x 10 ⁸	6,85 x 10 ⁸ ± 1,20	–
12,5	6,85 x 10 ⁸	3,35 x 10 ⁸ ± 0,71	51,27
100	6,85 x 10 ⁸	4,33 x 10 ⁸ ± 1,23	37,67

Tabela 7. Resultados da inibição de *E. coli* por filmes de PVC industrial com concentrações de 0, 6,25 e 25 ppm de NpAg, comparados com filmes controle Referência.

<i>Escherichia coli</i>			
	Inóculo para cálculo base	Concentração após 24 h (UFC mL ⁻¹)	Redução (%)
0	9,94 x 10 ⁸	9,94 x 10 ⁸ ± 1,90	
6,25	9,94 x 10 ⁸	9,36 x 10 ⁸ ± 0,86	4,79
25	9,94 x 10 ⁸	9,46 x 10 ⁸ ± 1,10	3,96

Tabela 8. Resultados da inibição de *E. coli* por filmes de PVC industrial com concentrações de 0, 12,5 e 100 ppm de NpAg, comparados com filmes controle Referência.

<i>Escherichia coli</i>			
	Inóculo para cálculo base	Concentração após 24 h (UFC mL ⁻¹)	Redução (%)
0	4,62 x 10 ⁸	4,62 x 10 ⁸ ± 1,05	–
12,5	4,62 x 10 ⁸	3,35 x 10 ⁸ ± 0,71	26,87
100	4,62 x 10 ⁸	4,33 x 10 ⁸ ± 1,23	6,46

Tabela 9. Resultados da inibição de *S. aureus* por filmes de PVC industrial com diferentes concentrações de NpAg, comparados com filmes controle Comercial.

<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Inóculo para cálculo base	concentração após 24 h (UFC mL ⁻¹)	Redução (%)
0	2,12 x 10 ⁷	2,12 x 10 ⁷ ± 0,23	–
6,25	2,12 x 10 ⁷	1,37 x 10 ⁷ ± 0,44	38,33
12,5	2,12 x 10 ⁷	5,5 x 10 ⁶ ± 3,46	77,92
25	2,12 x 10 ⁷	1,42 x 10 ⁷ ± 0,36	34,25
100	2,12 x 10 ⁷	9,2 x 10 ⁶ ± 3,7	58,81

Tabela 10. Resultados da inibição de *S. aureus* por filmes de PVC industrial com diferentes concentrações de NpAg, comparados com filmes controle Referência.

<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Inóculo para cálculo base	concentração após 24 h (UFC mL ⁻¹)	Redução (%)
0	$1,15 \times 10^7$	$1,15 \times 10^7 \pm 0,30$	-
6,25	$1,15 \times 10^7$	$1,37 \times 10^7 \pm 0,44$	-
12,5	$1,15 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6 \pm 3,46$	58,25
25	$1,15 \times 10^7$	$1,42 \times 10^7 \pm 0,36$	-
100	$1,15 \times 10^7$	$9,2 \times 10^6 \pm 3,74$	22,10

Os resultados encontrados indicam baixa taxa de inibição dos filmes com NpAg contra *E. coli* e *S. aureus*, considerando o controle Referência. Através dos resultados obtidos, observa-se uma possível ação inibitória do filme de PVC controle Referência, mascarando o resultado dos filmes com NpAg. Desse modo, fez-se necessário incluir um outro tipo de filme como controle.

Os filmes com compósito não apresentaram uma taxa de inibição crescente de acordo com o aumento da concentração de NpAg. Em geral, embalagens de PVC apresentam em sua composição estabilizantes, plastificantes, lubrificantes e pigmentos, tornando-os aderentes e esticáveis (6). A presença de aditivos nos filmes industriais pode ter dificultado a presença de nanopartículas na superfície, mantendo-as predominantemente no interior, diminuindo desse modo sua eficácia. Além disso, alguns aditivos poliméricos podem ser tóxicos, como ftalatos e estearato de zinco, podendo apresentar ação antimicrobiana, mesmo no filme controle. Por essa razão, o experimento foi realizado com os filmes *casting*, que não possuíam aditivos em sua composição.

Os resultados da taxa de inibição dos filmes de PVC produzidos por *casting* são apresentados nas Tabelas 11 e 12, para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente:

Tabela 11. Resultados da inibição de *E. coli* por filmes de PVC produzidos por *casting*, com diferentes concentrações de NpAg.

<i>E. coli</i>			
	inóculo para o cálculo base	concentração após 24 h (UFC/mL)	Redução (%)
0	$6,36 \times 10^7$	$6,36 \times 10^7 \pm 0,14$	-
12,5	$6,36 \times 10^7$	$6,13 \times 10^7 \pm 0,75$	2,35
25	$6,36 \times 10^7$	$6,28 \times 10^7 \pm 0,43$	-
100	$6,36 \times 10^7$	$6,08 \times 10^7 \pm 0,26$	9,49

Tabela 12. Resultados da inibição de *S. aureus* por filmes de PVC *casting* com diferentes concentrações de NpAg.

<i>Staphylococcus aureus</i>			
	inóculo para o cálculo base	concentração após 24 h (UFC/mL)	Redução (%)
0	$2,47 \times 10^7$	$2,47 \times 10^7 \pm 0,17$	-
12,5	$2,47 \times 10^7$	$2,15 \times 10^7 \pm 0,25$	13,04
25	$2,47 \times 10^7$	$2,05 \times 10^7 \pm 0,27$	17,49
100	$2,47 \times 10^7$	$5,5 \times 10^5 \pm 0,23$	97,95

Os filmes de *casting* apresentaram baixa inibição em todas as concentrações para *Escherichia coli* e baixa inibição para *S. aureus* nas concentrações de 12,5 e 25 ppm de NpAg. Na concentração de 100 ppm foi obtida uma alta taxa de inibição para *S. aureus* (97,95%), indicando eficácia da concentração estudada para esse microrganismo. A taxa de inibição aumentou com o aumento das concentrações de NpAg e, como observado no teste de Difusão em Ágar com o compósito de SiO₂:NpAg, houve maior suscetibilidade de *S. aureus*.

5.4.2 Teste de Agitação em Frasco

O teste de Agitação em Frasco foi realizado apenas com os filmes de PVC industrial. As curvas de crescimento de *E. coli* e *S. aureus* em contato com filmes com compósito não apresentaram diferença da curva de crescimento de bactérias na presença de filmes sem o compósito (Figuras 39 e 40).

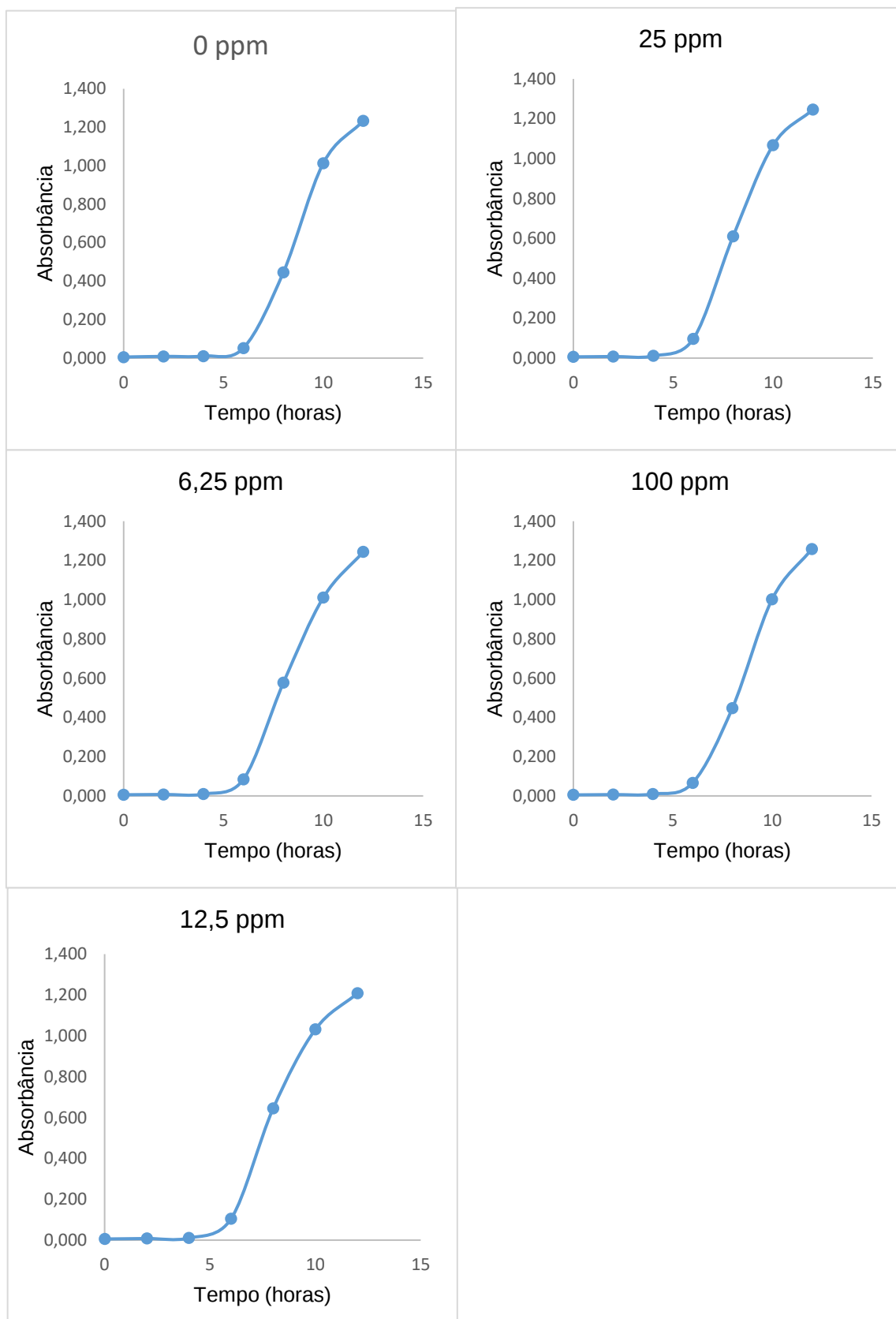
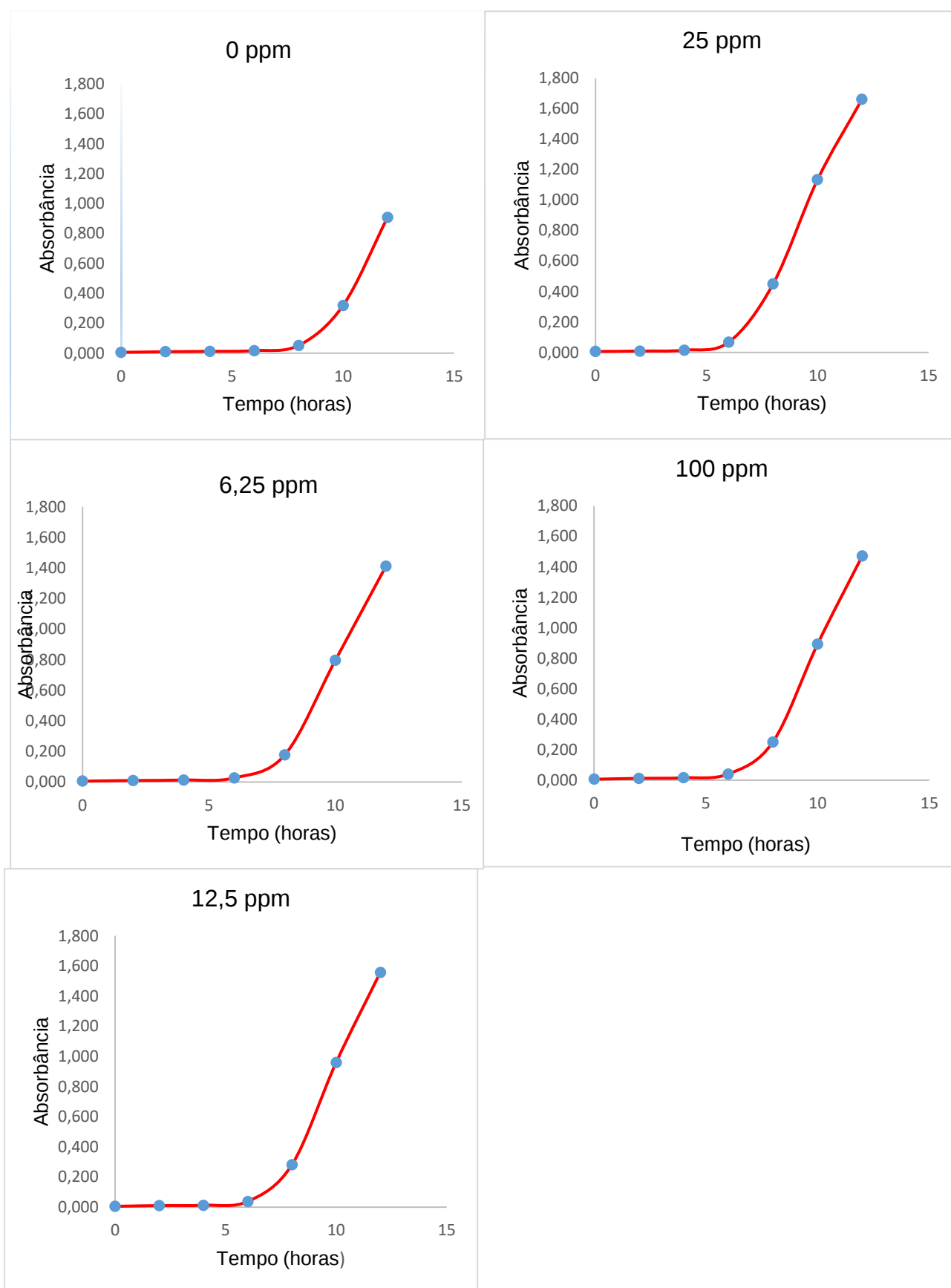


Figura 38. Resultados das curvas de crescimento para *Escherichia coli* em contato com filmes de PVC industrial com 0, 6,25, 12,5, 25 e 100 ppm de NpAg por 12 horas.



39. Resultados das curvas de crescimento para *Staphylococcus aureus* em contato com filmes de PVC industrial com 0, 6,25, 12,5, 25 e 100 ppm de NpAg por 12 horas.

A média dos valores de absorvância obtidos após 12 horas de experimento são apresentadas na Tabela 13. Os valores de absorvância não se diferiram entre os grupos para *Escherichia coli*, indicando um crescimento bacteriano semelhante entre os tratamentos e o controle. Para *Staphylococcus*, microrganismos em contato com filmes com 12,5, 25 e 100 ppm de NpAg apresentaram valores de absorvância maior que o controle, sugerindo que os filmes controle possam estar tendo algum tipo de ação antimicrobiana, como constatado pela norma JIS.

Tabela 13. Média $\pm$ desvio padrão da absorvância dos microrganismos em contato com os filmes após 12 horas de agitação em frasco.

Bactéria	Concentração NpAg (ppm)				
	0	6.25	12.5	25	100
<i>E. coli</i>	1,23 $\pm$ 0,05 ^a	1,24 $\pm$ 0,05 ^a	1,21 $\pm$ 0,02 ^a	1,25 $\pm$ 0,03 ^a	1,26 $\pm$ 0,05 ^a
<i>S. aureus</i>	0,91 $\pm$ 0,35 ^d	1,41 $\pm$ 0,09 ^{cd}	1,56 $\pm$ 0,04 ^{ab}	1,66 $\pm$ 0,11 ^a	1,47 $\pm$ 0,10 ^{bc}

Médias com a mesma letra nas linhas não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Jokar e colaboradores (63) realizaram o teste de Agitação em Frasco com filmes de polietileno aditivados com 1,19, 2,14, 6,69, 11,23 e 22,64 ppm de nanopartículas de prata, com *E. coli* e *S. aureus*. As concentrações de 6,69, 11,23 e 22,64 ppm apresentaram diferença do controle, com aumento da fase lag e redução da concentração máxima bacteriana. As concentrações utilizadas pelos autores são semelhantes às utilizadas na presente pesquisa, indicando que são suficientes para exibir ação antimicrobiana quando inseridas na matriz de polietileno. Entretanto, nanopartículas inseridas na matriz de PVC não apresentaram atividade antimicrobiana em nenhuma concentração estudada. Esse resultado é observado porque o polímero de

PVC possui característica hidrofóbica, ao passo que a sílica possui característica hidrofílica. Desse modo, há uma tendência da sílica se aglomerar no interior do polímero, sendo tal aglomeração aumentada com o aumento da concentração do compósito.

A aglomeração de sílica no interior dos filmes é observada nas micrografias por FEG (Figuras 28 e 29) e indica que a sílica não é um bom carreador para ser incorporado em filmes de PVC. Com o aprisionamento da sílica no interior do filme há uma diminuição da presença de nanopartículas na superfície, ou seja, embora a concentração de nanopartículas possa ser suficiente para um efeito antimicrobiano, sua disponibilidade é reduzida.

No presente experimento, a curva de crescimento microbiano é plotada de acordo com a densidade ótica do meio de cultura ao longo do tempo (47), constituindo-se uma medida indireta. Para confirmar os resultados obtidos, optou-se por realizar a contagem de microrganismos viáveis a partir desse mesmo experimento.

5.4.3 Contagem de microrganismos viáveis

O teste de Contagem de microrganismos viáveis foi realizado apenas com os filmes industriais. Para este experimento os microrganismos foram mantidos em agitação constante em 100 mL de meio e oito pedaços de filmes, com uma área total de $8 \times 10 \text{ cm}^2$, por 24 h. Após esse período as amostras foram diluídas e plaqueadas para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias. O crescimento dos microrganismos em contato com os filmes de PVC com e sem compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ foram comparados ao crescimento de

cada microrganismo crescendo sem a presença de filmes (controle). Os resultados são apresentados na Tabela 14 para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Tabela 14. Média $\pm$ desvio padrão de *log de UFC mL⁻¹* para o experimento de Contagem de Microrganismos Viáveis com filmes de PVC industrial.

bactéria	Filmes de PVC com compósito SiO ₂ :NpAg (ppm)					
	controle	0	6,25	12,5	25	100
<i>E. coli</i>	8,85 $\pm$ 0,04 ^a	8,98 $\pm$ 0,06 ^a	8,58 $\pm$ 0,60 ^a	8,56 $\pm$ 0,53 ^a	8,17 $\pm$ 0,19 ^a	8,85 $\pm$ 0,24 ^a
<i>S. aureus</i>	8,61 $\pm$ 0,06 ^a	8,67 $\pm$ 0,29 ^a	8,74 $\pm$ 0,15 ^a	8,77 $\pm$ 0,29 ^a	8,66 $\pm$ 0,07 ^a	8,65 $\pm$ 0,40 ^a

Números com letras iguais nas linhas não apresentam diferença significativa segundo Anova de Regressão.

Os resultados dos ajustes de regressão não indicam relação entre a concentração de microrganismos e o aumento da concentração de NpAg para *Escherichia coli* em contato com filmes ($p=0,655$), assim como para *Staphylococcus aureus* ($p=0,686$), indicando que os filmes não foram capazes de reduzir o crescimento microbiano, assim como foi observado na curva de crescimento.

De um modo geral, os filmes de PVC industrial não apresentaram eficácia contra os microrganismos estudados nas concentrações de NpAg testadas. O filme controle (sem adição de NpAg) apresentou uma aparente inibição nos testes de Norma JIS e Agitação em Frasco, indicando uma possível contaminação da amostra ou a presença de algum aditivo com ação antimicrobiana.

A inibição de nanopartículas de prata depende da concentração inicial de UFC mL⁻¹ dos microrganismos bem como da concentração de nanopartículas utilizadas (65). Apesar de não ser observada uma redução microbiana com os filmes de PVC industriais, a concentração de microrganismos utilizada nos experimentos de Agitação em Frasco e Contagem de microrganismos viáveis (1×10^6) é muito superior às concentrações presentes em alimentos próprios para consumo, não representando condições reais.

Um fenômeno comum em nanopartículas capaz de diminuir a ação antimicrobiana é a agregação, que consiste na aproximação das nanopartículas, formando partículas maiores, diminuindo assim sua área

superficial. A ação antimicrobiana de nanopartículas de prata ocorre a partir da sua oxidação e liberação de íons Ag^+ . Com a fusão das nanopartículas e diminuição da área superficial, ocorre menos oxidação e há uma menor atividade antimicrobiana (36).

O aprisionamento das nanopartículas de prata no interior do polímero também diminui sua atividade antimicrobiana pois as nanopartículas são oxidadas pelo oxigênio dissolvido no meio aquoso (66), sendo necessário, portanto, estarem na superfície do polímero.

Os filmes de PVC industriais apresentaram baixa taxa de inibição microbiana segundo a Norma JIS e, para os outros testes, não houve relação entre a concentração de NpAg e a concentração de microrganismos. Os filmes produzidos por *casting* apresentaram uma baixa taxa de inibição para *E. coli* em todas as concentrações e para *S. aureus* nas concentrações de 12,5 e 25 ppm. Por outro lado, filmes *casting* apresentaram uma alta taxa de inibição para *S. aureus* na concentração de 100 ppm (97,95%), sugerindo que essa concentração é suficiente para reduzir o crescimento microbiano quando inserida em filmes sem aditivos. Além da aglomeração de sílica no interior dos filmes, a presença de aditivos nos filmes industriais pode ter funcionado como uma barreira entre o compósito de sílica e o meio externo, diminuindo ainda mais a ação antimicrobiana dos filmes.

6. Conclusões

- A caracterização do compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ confirmou a presença de nanopartículas de prata no material.
- O compósito $\text{SiO}_2\text{:NpAg}$ em suspensão foi eficaz para *E. coli* em todas as concentrações e para *S. aureus* nas concentrações de 12,5, 25 e 100 ppm de NpAg, sendo um bom agente antimicrobiano.
- A adição do compósito no PVC não alterou significativamente as características físico-químicas dos filmes industriais e produzidos em laboratório em nenhuma concentração.
- A aglomeração de sílica no interior dos filmes verificada nas imagens de FEG, bem como a diminuição da T_g sugerem que não houve boa interação entre a sílica e o polímero.
- Os filmes de PVC industrial apresentaram baixa taxa de inibição para *E. coli* e *S. aureus*, segundo Norma JIS Z. Nos experimentos em meio líquido não foi observado aumento de inibição com o aumento da concentração do compósito.
- Os filmes de PVC produzidos por *casting* apresentaram alta taxa de inibição microbiana para *S. aureus* na maior concentração de NpAg (100 ppm), segundo Norma JIS Z.
- No geral, *S. aureus* foi mais sensível que *E. coli*, tanto para o compósito em suspensão quanto para os filmes nanocompósitos, devido a diferença da parede celular desses microrganismos.

7. Referências

1. Gustavsson J, Cederberg C, Sonesson U, Otterdijk R van, Meybeck A. Global food losses and food waste. Rome: FAO; 2011. p. 38.
2. King T, Cole M, Farber JM, Eisenbrand G, Zabaras D, Fox EM, et al. Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2017;68:160–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.014>
3. Nerín C, Aznar M, Carrizo D. Food contamination during food process. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2016;48:63–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.004>
4. Radford S, States U. Sources of Contamination in Food [Internet]. Vol. 2, Encyclopedia of Food Security and Sustainability. Elsevier; 2019. 518–522 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22264-6>
5. Húngaro HM, Peña WEL, Silva NBM, Carvalho R V., Alvarenga VO, Sant'Ana AS. Food Microbiology. Encycl Agric Food Syst. 2014;3:213–31.
6. Jorge N. Embalagens para alimentos. Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação. 2013. 198 p.
7. Dainelli D, Gontard N, Spyropoulos D, Zondervan-van den Beuken E, Tobback P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2008;19(SUPPL. 1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.011>
8. Carbone M, Donia DT, Sabbatella G, Antiochia R. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. J King Saud Univ - Sci [Internet]. 2016;28(4):273–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2016.05.004>
9. Brasil. Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos [Internet].

- 2018 [cited 2018 Oct 9]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>
10. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança alimentar. Artmed, editor. Porto Alegre; 2002. 424 p.
 11. Linscott AJ. Food-Borne Illnesses. Clin Microbiol News [Internet]. 2011;33(6):41–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.02.004>
 12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos [Internet]. Saúde E do M da, editor. Brasília - DF; 2010. 158 p. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doenças_alimentos.pdf
 13. van Seventer JM, Hamer DH. Foodborne Diseases [Internet]. Second Edi. Vol. 3, International Encyclopedia of Public Health. Elsevier; 2016. 160–173 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00162-4>
 14. Benito-Peña E, González-Vallejo V, Rico-Yuste A, Barbosa-Pereira L, Cruz JM, Bilbao A, et al. Molecularly imprinted hydrogels as functional active packaging materials. Food Chem. 2016;190:487–94.
 15. Mousavi Khaneghah A, Hashemi SMB, Limbo S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. Food Bioprod Process [Internet]. 2018;111:1–19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>
 16. Vilela C, Kurek M, Hayouka Z, Röcker B, Yildirim S, Antunes MDC, et al. A concise guide to active agents for active food packaging. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2018;80(August):212–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.006>

17. Marsh K, Bugusu B. Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary. *J Food Sci.* 2007;72(3).
18. Carmelo LGP. Permeabilidade de filmes plásticos com nanopartículas de prata utilizados na armazenagem de morangos. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos; 2015.
19. Jr. SVC. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. Artibles, editor. São Paulo; 2002. [184.
20. Chitarra MIF, Chitarra AB. Pós colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. UFLA. 2005. 783 p.
21. Coltro L, Pitta JB, da Costa PA, Fávaro Perez MÂ, de Araújo VA, Rodrigues R. Migration of conventional and new plasticizers from PVC films into food simulants: A comparative study. *Food Control* [Internet]. 2014;44:118–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.058>
22. PVC Forum - South East Europe [Internet]. 2010 [cited 2018 Apr 28]. Available from: <http://www.seepvcforum.com/>
23. Vinhas GM, Souto-Maior RM, Lapa CM, Almeida YMB De. Degradation studies on plasticized PVC films submitted to gamma radiation. *Mater Res.* 2003;6(4):497–500.
24. Rossi M, Cubadda F, Dini L, Terranova ML, Aureli F, Sorbo A, et al. Scientific basis of nanotechnology, implications for the food sector and future trends. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2014;40(2):127–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.004>
25. Augustin MA, Sanguansri P. Nanostructured materials in the food industry [Internet]. 1st ed. Vol. 58, *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Inc.; 2009. 183–213 p. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58005-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58005-9)
26. Hochella MF. Nanoscience and technology: The next revolution in the Earth

- sciences. *Earth Planet Sci Lett*. 2002;203(2):593–605.
27. Tiede K, Boxall A, Tear S, Lewis J, David H, Hasselov M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit Contam Part A* [Internet]. 2008;25(7):795–821. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030802007553>
 28. Roduner E. Size matters: Why nanomaterials are different. *Chem Soc Rev*. 2006;35(7):583–92.
 29. Waychunas GA. Structure, Aggregation and Characterization of Nanoparticles. *Rev Mineral Geochemistry* [Internet]. 2001;44(1):105–66. Available from: <https://pubs.geoscienceworld.org/rimg/article/44/1/105-166/140697>
 30. Llorens A, Lloret E, Picouet PA, Trbojevich R, Fernandez A. Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2012;24(1):19–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.001>
 31. Aouada MR de M. Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos. 2009;138.
 32. Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2008;25(3):241–58.
 33. Esteves ACC, Barros-Timmons A, Trindade T. Nanocompósitos de matriz polimérica: Estratégias de síntese de materiais híbridos. *Quim Nova*. 2004;27(5):798–806.
 34. Avella M, Bruno G, Errico ME, Gentile G, Piciocchi N, Sorrentino A, et al. Innovative packaging for minimally processed fruits. *Packag Technol Sci*. 2007;20(5):325–35.

35. Kumar S, Malik MM, Purohit R. Synthesis Methods of Mesoporous Silica Materials. *Mater Today Proc* [Internet]. 2017;4(2):350–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2017.01.032>
36. Le Ouay B, Stellacci F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* [Internet]. 2015;10(3):339–54. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84937520553&partnerID=40&md5=07bc110b183027f55f4b8471b02a1d7e>
37. Kumar R, Münstedt H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials*. 2005;26(14):2081–8.
38. Marchiore NG, Manso IJ, Kaufmann KC, Lemes GF, Pizolli AP de O, Droval AA, et al. Migration evaluation of silver nanoparticles from antimicrobial edible coating to sausages. *LWT - Food Sci Technol*. 2017;76:203–8.
39. Raffi M, Akhter j. i., Hamed A, Hassan masood ul. Antibacterial Characterization of Silver Nanoparticles against. 2008;24(2):192–6.
40. Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga M V., Li D, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Res* [Internet]. 2008;42(18):4591–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.015>
41. Wong KKY, Liu X. Silver nanoparticles - The real “silver bullet” in clinical medicine? *Medchemcomm*. 2010;1(2):125–31.
42. Durán N, Marcato PD, De Conti R, Alves OL, Costa FTM, Brocchi M. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. *J Braz Chem Soc*. 2010;21(6):949-959
ST-Potential Use of Silver Nanoparticle.
43. Holt KB, Bard AJ. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag.

- Biochemistry. 2005;44(39):13214–23.
44. Dastpaki M, Khonakdar HA. Thermal, thermomechanical, and morphological characterization of poly(vinyl chloride) (PVC)/ZnO nanocomposites: PVC molecular weight effect. *J Vinyl Addit Technol*. 2019;25:E63–71.
 45. Khalil MMH, Ismail EH, El-Baghdady KZ, Mohamed D. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arab J Chem* [Internet]. 2014;7(6):1131–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.007>
 46. Japanese Standards Association. Antimicrobial products Test for antimicrobial activity and efficacy, Japanese Industrial Standard JIS Z 2801,. Reference number: JIS Z 2801: 2000 (E), First English edition published in 2001. Tokyo; 2000. p. 1–14.
 47. Li XH, Xing YG, Li WL, Jiang YH, Ding YL. Antibacterial and physical properties of poly(vinyl chloride)-based film coated with ZnO nanoparticles. *Food Sci Technol Int*. 2010;16(3):225–32.
 48. Zhang X, Niu H, Yan J, Cai Y. Immobilizing silver nanoparticles onto the surface of magnetic silica composite to prepare magnetic disinfectant with enhanced stability and antibacterial activity. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2011;375(1–3):186–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.009>
 49. Koechler S, Farasin J, Cleiss-Arnold J, Arsène-Ploetze F. Toxic metal resistance in biofilms: Diversity of microbial responses and their evolution. *Res Microbiol* [Internet]. 2015;166(10):764–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2015.03.008>
 50. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013;11(6):371–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3028>

51. Mallakpour S, Nazari HY. Ultrasonic-assisted fabrication and characterization of PVC-SiO₂nanocomposites having bovine serum albumin as a bio coupling agent. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2017;39(April):686–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.05.036>
52. Kung JC, Chen YJ, Chiang YC, Lee CL, Yang-Wang YT, Hung CC, et al. Antibacterial activity of silver nanoparticle (AgNP) confined mesoporous structured bioactive powder against *Enterococcus faecalis* infecting root canal systems. *J Non Cryst Solids* [Internet]. 2018;(June):0–1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.06.030>
53. Abdel-Mohsen AM, Abdel-Rahman RM, Fouda MMG, Vojtova L, Uhrova L, Hassan AF, et al. Preparation, characterization and cytotoxicity of schizophyllan/silver nanoparticle composite. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;102(1):238–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.040>
54. González-Seligra P, Guz L, Ochoa-Yepes O, Goyanes S, Famá L. Influence of extrusion process conditions on starch film morphology. *Lwt*. 2017;84:520–8.
55. Braga LR, Rangel ET, Suarez PAZ, Machado F. Simple synthesis of active films based on PVC incorporated with silver nanoparticles: Evaluation of the thermal, structural and antimicrobial properties. *Food Packag Shelf Life* [Internet]. 2018;15(December):122–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.12.005>
56. Altenhofen Da Silva M, Adeodato Vieira MG, Gomes Maumoto AC, Beppu MM. Polyvinylchloride (PVC) and natural rubber films plasticized with a natural polymeric plasticizer obtained through polyesterification of rice fatty acid. *Polym Test* [Internet]. 2011;30(5):478–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.03.008>

57. Becaro AA, Puti FC, Correa DS, Paris EC, Marconcini JM, Ferreira MD. Polyethylene Films Containing Silver Nanoparticles for Applications in Food Packaging: Characterization of Physico-Chemical and Anti-Microbial Properties. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;15(3):2148–56.
58. Mohagheghian M, Sadeghi M, Chenar MP, Naghsh M. Gas separation properties of polyvinylchloride (PVC)-silica nanocomposite membrane. *Korean J Chem Eng*. 2014;31(11):2041–50.
59. Aouachria K, Belhaneche-Bensemra N. Miscibility of PVC/PMMA blends by vicat softening temperature, viscometry, DSC and FTIR analysis. *Polym Test*. 2006;25(8):1101–8.
60. Taha TA, Azab AA. Thermal, optical, and dielectric investigations of PVC/La_{0.95}Bi_{0.05}FeO₃ nanocomposites. Vol. 1178, *Journal of Molecular Structure*. Elsevier B.V.; 2019. 39–44 p.
61. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater*. 2008;4(3):707–16.
62. E K, K M, P B, A TS, I JCR. Biocompatible silver nanoparticles/poly(vinyl alcohol) electrospun nanofibers for potential antimicrobial food packaging applications. *Food Packag Shelf Life* [Internet]. 2019;21(September 2018):100379. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100379>
63. Jokar, M., Abdul Rahman, R., Ibrahim, N. A., Abdullah, L. C., & Tan, C. P. (2012). Melt Production and Antimicrobial Efficiency of Low-Density Polyethylene (LDPE)-Silver Nanocomposite Film. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 719–728. <https://doi.org/10.1007/s11467-011-9711-1> M, Abdul Rahman R, Ibrahim NA, Abdullah LC, Tan CP. Melt Production and Antimicrobial Efficiency of Low-Density Polyethylene (LDPE)-Silver Nanocomposite Film. *Food Bioprocess Technol*. 2012;5(2):719–28.

64. Tortora GJ, Funke BR, Christine L. Case. Microbiologia. 8a Edição. Artmed, editor. São Paulo; 2005. 894 p.
65. Soni I, Salopek-Soni B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. Vol. 275, Journal of Colloid and Interface Science. 2004. 177–182 p.
66. Dehnavi AS, Aroujalian A, Raisi A, Fazel S. Preparation and characterization of polyethylene/silver nanocomposite films with antibacterial activity. J Appl Polym Sci. 2013;127(2):1180–90.