

NANOPARTÍCULAS DE Au EM LÍQUIDO IÔNICO SUPOSTADAS EM FILMES BIOPOLIMÉRICOS: UMA AULA PRÁTICA PARA INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**Camila C. de Quadros, Marcos F. Brunelli, Vinícius W. Faria e Carla W. Scheeren***

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Santo Antônio da Patrulha, Rua Barão do Café, 125, Cidade Alta, CEP 95500-000, Santo Antônio da Patrulha – RS, Brasil

Recebido em 09/02/2016; aceito em 23/02/2016; publicado na web em 25/05/2016

Au NANOPARTICLES IN IONIC LIQUID SUPPORTED ON BIOPOLYMERIC FILMS: A PRACTICAL LESSON FOR INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY. The synthesis of Au nanoparticles (NPs) in ionic liquid (IL) supported on biopolymers films applied in the investigation of antimicrobial activity was introduced as a new experimental practice for undergraduates in the nanotechnology discipline at the Department of chemistry, at University Federal of Rio Grande- FURG. The Au NPs were synthesized by reduction of tetrachloroauric acid complex trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) in IL 1-*n*-butyl-3-methyl-imidazolium hexafluorophosphate (BMI.PF_6) using sodium borohydride at room temperature. Subsequently, the Au NPs were supported in the biopolymers films using a solution of cellulose acetate dissolved in acetone. The biopolymers films containing supported Au NPs were applied in the investigation of antimicrobial activity against bacteria *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Au nanoparticles; ionic liquid; biopolymers films; antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

A nanociência está ligada à manipulação da matéria em escala nanométrica, escala tão pequena quanto à de um bilionésimo do metro (10^{-9} m). Multidisciplinar a nanociência tem potencial de aplicação em diferentes áreas como: biologia, física, química e engenharia.¹ A aplicação de membranas/filmes biopoliméricos tem atraído a atenção de pesquisadores em diversas áreas, como: biotecnologia, farmacêutica, médica, catálise, eletroquímica e ambiental.²⁻⁷ A combinação de nanopartículas (NPs) metálicas e filmes poliméricos com atividade antibacteriana têm sido muito estudados, os quais exibem grande atividade tóxica frente a bactérias e outros microorganismos, como fungos e também o sistema humano.⁸⁻¹⁵ NPs metálicas são capazes de incapacitar micróbios através da interação com algumas enzimas, proteínas e/ou DNA, inibindo a proliferação celular ou divisão celular. Para estas aplicações, NPs têm sido suportadas em biopolímeros em várias formas (por ex. cateteres, material dentário, dispositivos médicos, implantes e curativos para queimaduras) com o objetivo de proteger contra a contaminação microbiana. Para aplicações médicas, o acetato de celulose (AC) é um bom candidato, porque este polímero é hidrofílico, não tóxico, biodegradável e renovável.¹⁶ Podemos citar um exemplo, onde tecido de algodão foi usado como suporte para NPs de prata (41 ± 7 nm) com efeito antimicrobiano em bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*). Filmes poliméricos de acetato de celulose semipermeáveis foram utilizados como suporte para NPs de Pt e Au.¹⁷ Entretanto, um filme polimérico pode exibir outras vantagens adicionais como um material com maior capacidade de imobilização e seletividade, redução no tamanho de partícula, prevenção da aglomeração das NPs e estabelecimento de uma região de contato poroso entre as fases líquida e gasosa com a estrutura polimérica.^{18,19} Recentemente também foi demonstrado que a combinação de NPs metálicas estáveis em líquidos iônicos (LIs) com um filme polimérico de celulose pode gerar um material novo e versátil.²⁰ Nestas práticas experimentais, nós demonstramos a combinação de NPs de Au sintetizadas em líquido iônico BMI.

PF_6 suportadas em filme biopolimérico de acetato de celulose com investigação em atividade antimicrobiana frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. A combinação gerou a formação de um material com estrutura porosa com fácil incorporação das NPs de Au e boa atividade antimicrobiana.

Através da realização dos experimentos propostos neste trabalho é possível evidenciar a abrangência da nanociência em diversas áreas da química: química inorgânica (propriedades), orgânica (líquidos iônicos), físico-química (propriedades óticas e espectroscópicas), analítica (instrumentação/espectroscopia) e biologia/bioquímica (atividade antimicrobiana). Os experimentos propostos neste trabalho são ideais para serem desenvolvidos com alunos do sexto ao oitavo semestre dos cursos de graduação.

PARTE EXPERIMENTAL

Todas as reações realizadas nos experimentos foram conduzidas ao ar. Os filmes biopoliméricos de acetato de celulose contendo NPs de Au – denominados de AC/Au – foram preparados partindo-se do complexo $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ disperso em líquido iônico BMI.PF₆ e de solução de acetato de celulose dissolvido em acetona. Foram obtidos 900 mg de filme biopolimérico de acetato de celulose contendo 10 mg de NPs de Au. O líquido iônico hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (BMI.PF₆), (Aldrich) foi utilizado na síntese das NPs de Au. Os reagentes, acetato de celulose (Aldrich, 39,8% em peso de teor de acetilação) e acetona (Merck, 99,8%) foram utilizados para preparar os filmes biopoliméricos. Todos os outros produtos químicos foram adquiridos a partir de fontes comerciais e utilizados sem purificação adicional.

Para a realização dos experimentos destacamos a importância do uso dos equipamentos de proteção individual (EPIs) como: uso do jaleco, luvas e óculos de segurança. Durante o desenvolvimento dos experimentos os alunos devem tomar cuidado ao manusearem o complexo metálico, utilizando sempre luvas. Atenção ao preparo da solução polimérica a qual é dissolvida em acetona, usar luvas e óculos de proteção ao manusear solventes. E atenção ao colocarem os discos dos filmes biopoliméricos nas placas de Petry, pois estes possuem culturas de bactérias, usar luvas e óculos de proteção.

*e-mail: carlascheeren@gmail.com

Planejamento experimental

A sequência de experimentos apresentada neste trabalho foi idealizada para fornecer aos discentes, de forma simplificada, aspectos práticos da síntese de NPs de Au, assim como da imobilização destas em filmes biopoliméricos e a investigação da atividade antimicrobiana. Assim, o experimento aqui exposto tem por objetivo final a produção de um filme biopolimérico contendo NPs de Au com atividade antimicrobiana.

Para a execução dos experimentos os autores sugerem quatro aulas práticas de duas horas cada. A primeira aula visa sintetizar as NPs de Au, na segunda aula será preparada a solução biopolimérica e os filmes biopoliméricos contendo as NPs de Au suportadas, na terceira aula serão preparadas as placas contendo cultura de bactérias para investigação da atividade antibacteriana e na quarta aula serão avaliados os resultados obtidos.

Aula prática 1: síntese de NPs de Au em líquido iônico BMI.PF₆

Neste experimento, foi preparada uma solução dissolvendo borohidreto de sódio (NaBH₄), (9,25 mg, 250 mmol) em 2 mL de metanol e disperso em 1 mL de líquido iônico (BMI.PF₆). Separadamente, foi preparada uma solução contendo o precursor utilizado na síntese de NPs de Au, HAuCl₄.3H₂O (10 mg, 25 mmol) dissolvido em 2 mL de metanol e disperso em 1 mL de líquido iônico (BMI.PF₆), esta solução formada foi agitada a temperatura ambiente por 15 min, formando uma solução amarela. Posteriormente a primeira solução contendo NaBH₄ foi adicionada a segunda solução contendo ouro formando uma solução vermelha (Figura 1), (característica da formação de NPs de ouro). A solução de NPs de Au obtida foi analisada em espectrofotômetro UV-Vis e por MET.



Figura 1. Imagem da dispersão coloidal de NPs de Au obtidas

Aula prática 2: síntese da solução biopolimérica e dos filmes biopoliméricos contendo NPs de Au suportadas.

Neste experimento, foi preparada uma solução contendo 35 mL de acetona e 2,5 g de acetato de celulose, após dissolução do acetato de celulose a mistura permaneceu em repouso por 1 h, para obter a viscosidade desejada. Após 1 h os filmes biopoliméricos foram preparados, sendo que foram preparados filmes biopoliméricos sem NPs (denominados de branco, AC) e filmes contendo 10 mg de NPs de Au (denominados AC/Au). A mistura foi imersa em equipamento ultrassom Maxiclean 750A Unique, para dispersão das NPs de Au e depois a solução foi vertida em placa de Petri formando os filmes biopoliméricos.

Aula prática 3: preparo das placas de Petri contendo cultura de Bactérias *E. coli* e *S. aureus*

Estas experiências foram realizadas num meio de Luria-Bertani (LB) Agar sólido em uma placa de Petri. Os filmes biopoliméricos

liofilizados foram cortados em forma de disco de 1,5 cm de diâmetro, esterilizados por autoclave durante 15 minutos a 120 °C, e colocados em uma placa de Agar contendo bactérias *E. coli*- cultivadas e em outra placa Agar de bactérias *S. aureus*- cultivadas. As placas de Petri foram colocadas em incubadora durante 24 h a 37 °C para formação dos halos de inibição bacteriana.

Aula prática 4: avaliação dos resultados obtidos

Neste experimento as placas de Petri contendo as culturas de bactérias de *E. coli* e *S. aureus* incubadas na aula anterior foram analisadas para medir o halo de inibição bacteriana formado pelos filmes biopoliméricos contendo NPs de Au suportadas e resultados obtidos foram avaliados.

Análises realizadas

Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

O espectro eletrônico da dispersão coloidal de NPs de Au foi realizado utilizando-se um Espectrofotômetro UV-visível modelo UV-2550 da Shimadzu, com leituras na região de 190 a 800 cm⁻¹, com celas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises por MEV para o estudo da morfologia dos filmes biopoliméricos contendo NPs de Au suportadas foram conduzidas utilizando-se um modelo JEOL JSM 5800 com 10 a 20 kV e magnificação de 5000x.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de MET das NPs de Au foi realizada utilizando-se um microscópio JEOL JEM1200EXII operando em 120 kv. Para a análise foi utilizada uma amostra das NPs de Au obtidas no experimento. A análise da solução coloidal foi realizada com auxílio de pipeta de Pasteur, sobre o grid de cobre (300 mesh) recoberto com uma fina camada de Carbono. Os grids foram colocados em um dessecador para a retirada do solvente e umidade. A contagem das partículas foi feita utilizando o software *SigmaScan Pro 5*. Os histogramas da distribuição foram obtidos usando o programa Origin 8, através da medida do diâmetro de aproximadamente 300 partículas de Au.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos realizados levaram a formação de uma dispersão coloidal de NPs de Au, de coloração vermelha. A estabilidade da dispersão coloidal de NPs de Au está relacionada a estas permanecerem em suspensão em escala nanométrica, não ocorrendo aglomeração com consequente formação de NPs de diâmetro maior. O líquido iônico BMI.PF₆ foi utilizado como agente estabilizante das NPs de Au. A presença de líquido iônico causa estabilização eletrostática através do cátion e do ânion, levando a uma repulsão eletrostática entre as NPs e também por estabilização estérica, presença de grupos volumosos, desta forma impedindo a aproximação e crescimento das nanopartículas. Os agentes estabilizantes (por ex: líquidos iônicos, sais de amônio quaternário e polímeros) são utilizados para manter as NPs em escala nanométrica, sendo este um fator desafiador nesta área de pesquisa, pois a termodinâmica tende a levar a formação de aglomerados metálicos.

As técnicas de caracterização utilizadas, ultravioleta-Visível (UV-Vis), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) nos fornecem informações a respeito do tamanho, forma e composição das NPs de Au e dos filmes biopoliméricos. Estas informações são de suma importância,

pois estão diretamente relacionadas com os resultados obtidos na aplicação destas NPs em diversas áreas como, catálise, ótica, médica, farmacêutica, eletroquímica e atividade biológica.

A síntese das NPs de ouro coloidal está relacionada à redução do Au^{3+} para Au^0 pela ação do boroidreto de sódio como agente redutor, resultando na formação de NPs que possuem rede cúbica de face centrada (fcc). Os íons Au^{3+} são introduzidos ao meio reacional a partir do ácido tetracloreáurico triidratado, sendo a forma ácida do cloreto de ouro (III). Neste experimento, não houve aquecimento, muitos trabalhos utilizam o citrato de sódio como agente redutor, sendo o sistema mantido sob aquecimento para favorecer a redução do ouro.²¹

No nosso experimento observou-se a mudança de coloração do meio reacional de amarelo para vermelho, que se intensificou até o final da síntese. Após aproximadamente 5 min, a solução resultante apresentou uma coloração vermelha intensa.

Na Figura 2 está representado o espectro da solução de NPs de Au, obtidas no experimento, por espectroscopia de UV-visível. A banda de absorção para a amostra ocorreu em 524 nm. A interação entre as NPs metálicas e a luz está relacionada com a ressonância plasmônica. Os Plasmons se assemelham a uma onda vinda da oscilação coletiva entre os elétrons das NPs metálicas. Quando há formação de um plasmão ocorre a separação de cargas elétricas na partícula, em função da oscilação coletiva dos elétrons. Assim, os elétrons se concentram por curtos períodos de tempo, em uma região da partícula. Porém existe uma força restauradora, pois esta é uma condição energeticamente desfavorável, fazendo com que os elétrons se distribuam novamente de maneira uniforme, obtendo-se no final uma frequência de oscilação eletrônica interna. Quando se incide uma radiação nesta solução e ela tem a mesma frequência que a dos plasmons tem-se a ressonância plasmônica. Esta ressonância produz intensas oscilações eletrônicas na partícula que serão responsáveis pela absorção ou espalhamento da radiação.¹⁴ Ao contrário do ouro em forma de sal ou metálico, que apresentam cor amarelada, o ouro coloidal apresenta coloração avermelhada, as NPs de ouro absorvem na região de ~500 nm a ~560 nm. Se observarmos o espectro eletromagnético veremos que a região que as NPs de ouro absorvem corresponde ao verde, ou seja, elas absorvem o verde e refletem o vermelho.

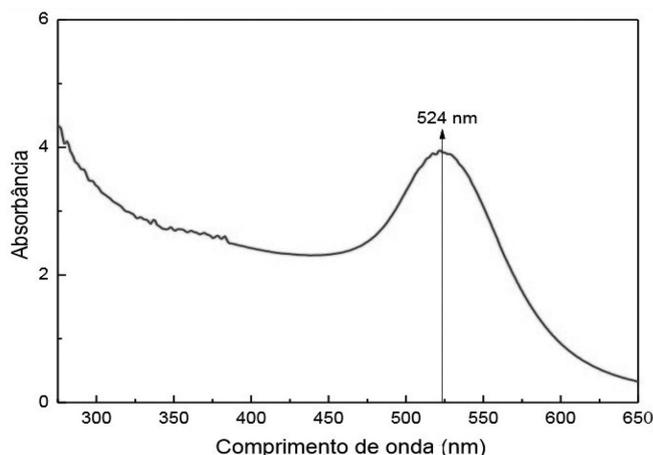


Figura 2. Espectro de Uv-visível da dispersão coloidal de NPs de Au

As NPs de Au obtidas também foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A micrografia e o histograma de distribuição de diâmetro médio das partículas obtidas são expostos na Figura 3. As NPs de Au (Figura 3A) exibiram diâmetro médio de 11 ± 1.5 nm. O histograma de distribuição de diâmetro (Figura 3B) foi obtido pela contagem de cerca de 300 partículas em diferentes regiões do grid analisado por MET.

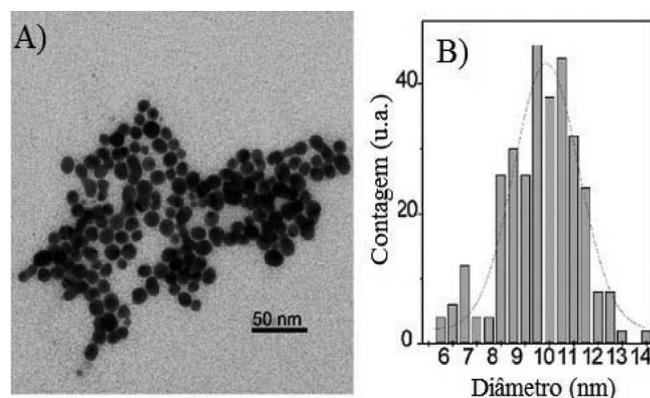


Figura 3. Micrografia obtida por MET (A) NPs de Au e (B) histograma de distribuição de diâmetro das NPs de Au.

A dispersão coloidal vermelha de ouro preparada em líquido iônico BMI.PF₆ foi misturada com uma solução de acetato de celulose (AC) dissolvida em acetona. A mistura obtida foi vertida em placa de Petri, após 5 min ocorreu à evaporação total do solvente e obtiveram-se os filmes biopoliméricos contendo NPs de Au suportadas, denominados AC/Au.

Os filmes biopoliméricos contendo NPs de Au suportadas (AC/Au) foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 4 expõe a micrografia obtida por MEV. Podemos observar que o filme apresenta estrutura porosa e que pequenos aglomerados de NPs de Au estão distribuídos homogêneoamente sobre todo filme biopolimérico.

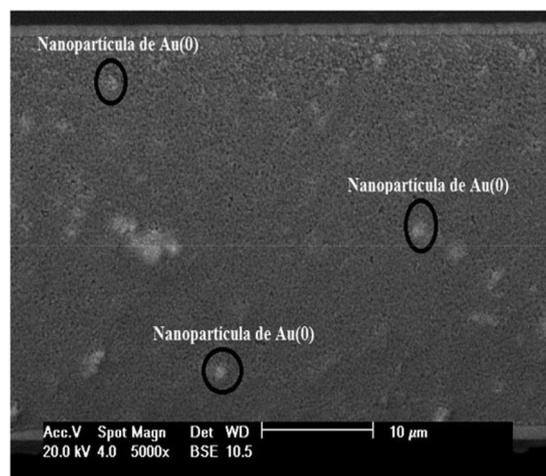


Figura 4. Micrografia obtida por MEV de pequenos aglomerados de NPs de Au suportados nos filmes biopoliméricos

A presença do líquido iônico BMI.PF₆ ocasiona um afastamento das moléculas de celulose, proporcionando maior maleabilidade e resistência aos filmes biopoliméricos. O filme biopolimérico preparado sem adição de líquido iônico BMI.PF₆ e NPs (denominado de branco, AC) exibiu aparência frágil e quebradiça.

A atividade antibacteriana dos filmes biopoliméricos foi investigada frente a bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*E. coli*) através do método de disco com formação de halo de inibição. As bactérias *S. aureus*, são cocos, gram-positivos, sendo que muitos pertencem à microbiota normal do trato respiratório superior ou da pele. As bactérias *E. coli*, se referem a gêneros diversos de bactéria bacilar gram-negativa, sendo um parasita intestinal generalizado de mamíferos. A habilidade dos filmes biopoliméricos contendo NPs de Au suportadas em inibir o crescimento destas bactérias está exposto

na Figura 5. Nos experimentos utilizamos um disco de 1,5 cm de filme biopolimérico sem a presença NPs de Au (denominado de AC), localizado na esquerda da placa de Petri, e um disco de filme biopolimérico contendo NPs de Au (denominado AC/Au), localizado à direita na placa de Petri.

A ação antibacteriana das NPs metálicas ocorre através da ordenação destas a camada superficial das bactérias ocasionando o rompimento da camada de peptidoglicano e consequente inativação. O peptidoglicano é a estrutura que confere rigidez à parede celular de bactérias, determina a forma da bactéria e protege da lise osmótica, quando em meio hipotônico. A camada de peptidoglicano da bactéria gram-negativa (*E. coli*) é mais fina do que nas bactérias gram-positivas (*S. aureus*),²² provavelmente este fato está relacionado às NPs de Au se coordenarem mais facilmente e eficientemente causando maior inibição nas bactérias *E. coli* do que nas bactérias *S. aureus* (a formação de 5 mm de halo de inibição bacteriana foram obtidos para *E. coli* e 3 mm para *S. aureus*, Figura 5).²²

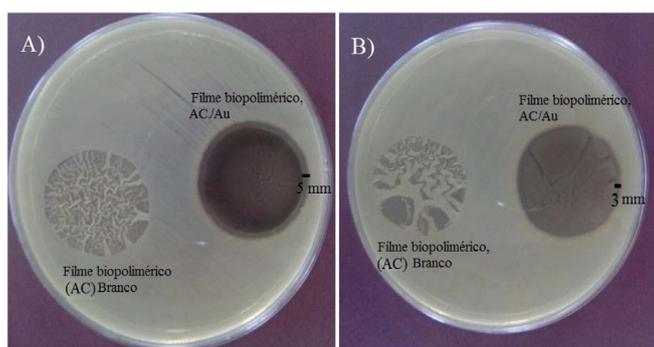


Figura 5. Atividade Antimicrobiana dos filmes biopoliméricos, AC (Branco, filme sem NPs Au) e AC/Au (filme contendo NPs de Au) frente as Bactérias: (A) *E.coli* e (B) *S. aureus*

CONCLUSÃO

Os experimentos realizados neste estudo, aplicados a alunos de Graduação na disciplina de Nanotecnologia possibilitaram o primeiro contato destes com conceitos relacionados à nanociência, um assunto bastante discutido em ciência atualmente. As práticas foram de simples manipulação, os reagentes de custo mais alto são o sal de ouro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), e o líquido iônico BMI.PF₆, porém as quantidades utilizadas foram pequenas. Seria interessante se cada grupo de alunos obtivesse suas próprias imagens das NPs de Au através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), mas sabemos que isso é impraticável para os cursos de Graduação. Porém, de maneira alguma a prática foi prejudicada. Foi importante os alunos terem informações sobre alguns conceitos sobre estas ferramentas fundamentais na caracterização de materiais em escala nanométrica. Os resultados gerados pelos métodos de síntese aplicados, confirmados pelas técnicas de caracterização utilizadas, também contribuíram para que a prática fosse bem sucedida e agregasse conhecimento a respeito dos fenômenos relacionados a sistemas em escala nano para os alunos. A aplicação dos filmes biopoliméricos contendo NPs de Au suportadas em inativação bacteriana também despertou grande atenção dos alunos, devido a ser um tema sempre atual e resultado de

extensa aplicação, os filmes biopoliméricos antibacterianos podem ser utilizados como embalagem polimérica para a conservação de frutas e alimentos, por exemplo.

AGRADECIMENTOS

Aos alunos de graduação da disciplina de Nanotecnologia, que foram parte fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Aos alunos Camila Costa de Quadros (aluna do curso de Engenharia de Alimentos), Marcos F. Brunelli (aluno do curso de Química bacharelado) e ao aluno de Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental Vinícius W. Faria. Agradecemos à FAPERGS pelas bolsas de iniciação científica e a CAPES pela bolsa de pós-graduação. Agradecemos também ao CNPq pelo apoio financeiro e a FURG pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Hochella-Júnior, M. F.; *Earth Planet Sci. Lett.* **2002**, *203*, 593.
- Zhiguang, W.; Tialong, L.; Wei, G.; *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 3881.
- Brockson, M. E.; Novotny, L. A.; Mokrzan, E. M.; Malhotra, S.; Jurcisek, J. A.; Akbar, R.; Devaraj, A.; Goodman, S. D.; Bakaletz, L. O.; *Mol. Microbiol.* **2014**, *93*, 1246.
- Diban, N.; Stamatialis, D. J.; *Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, *89*, 633.
- Faria, V. W.; Oliveira, D. G. M.; Kurz, M. H. S.; Gonçalves, F. F.; Rosa, G. R.; Scheeren, C. W.; *RSC Advances*. **2014**, *4*, 13446.
- Wang, Q.; Song, W-L.; Fan, L-Z.; Song, Y.; *J. Membr. Sci.* **2015**, *486*, 21.
- Goh, P. S.; Ng, B. C.; Lau, W. J.; Ismail, A. F.; *Separation e Purification Reviews* **2015**, *44*, 216.
- Stoimenov, P. K.; Klinger, R. L.; Marchin, G. L.; Klabunde, K. J.; *Langmuir* **2002**, *18*, 6679.
- Balogh, L.; Swanson, D. R.; Tomalia, D. A.; Hagnauer, G. L.; McManus, A. T.; *Nano Lett.* **2001**, *1*, 18.
- Kasuga, T.; Kume, H.; Abe, Y.; *J. Am. Ceram. Soc.* **1997**, *80*, 777.
- Kasuga, T.; Kume, H.; Abe, Y.; *J. Am. Ceram. Soc.* **1999**, *82*, 65.
- Yang, M. R.; Chem, K. S.; Rsai, J. C.; Tseng, C. C.; Lin, S. F.; *Mater. Sci. Eng., C*. **2002**, *20*, 167.
- Scheeren, C. W.; Hermes, V.; Bianchi, O.; Hertz, P.; Dias, S. L. P.; Dupont, J.; *J Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 5114.
- Kwak, S. Y.; Kim, S. H.; Kim, S. S.; *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 2388.
- Kierans, M.; Staines, A. M.; Bennett, H.; Gadd, G. M.; *Biology of Metals* **1991**, *4*, 100.
- Ciriolo, M. R.; Civitareale, P.; Carri, M. T.; De Martino, A.; Galianzo, F.; Rotilio, G.; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25783.
- Edgar, K. J.; Buchanan, C. M.; Debenham, J. S.; *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26*, 1605.
- Viswanathan, G.; Murugesan, S.; Pushparaj, V.; Nalamasu, O.; Ajayan, P. M.; Linhardt, R. J.; *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 415.
- Xu, J.; Dozier, A.; Bhattacharyya, D.; *J. Nanop. Res.* **2005**, *7*, 449
- Gelesky, M. A.; Scheeren, C. W.; *Polímeros-Ciência e Tecnologia* **2014**, *24*, 1.
- Daniel, M.; Astruc, D.; *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293
- Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V.; *Langmuir* **2011**, *27*, 11098.