



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

ANGELA MARIA CORDEIRO GUIMARÃES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES NANOCOMPÓSITOS DE
QUITOSANA E NANOTUBOS DE CARBONO COM
POLIESTIRENO/CUMARINA**

Recife

2017

ANGELA MARIA CORDEIRO GUIMARÃES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES NANOCOMPÓSITOS DE
QUITOSANA E NANOTUBOS DE CARBONO COM
POLIESTIRENO/CUMARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Materiais.

Área de concentração: materiais não metálicos

Orientadora: Prof. Dra. Yadira Itzel Vega Cantú

Co-orientador: Prof. Dr. André Galembeck

Recife

2017

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

G963s Guimarães, Angela Maria Cordeiro
 Síntese e caracterização de filmes nanocompósitos de
 quitosana e nanotubos de carbono com poliestireno/cumarina /
 Angela Maria Cordeiro Guimarães. – 2017.
 108 f.: fig., tab.

 Orientadora: Yadira Itzel Vega Cantú
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
 Pernambuco CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2017.
 Inclui referências.

 1. Nanocompósitos. 2. Biomateriais. 3. Agentes
 antimicrobianos. I. Cantú, Yadira Itzel Veja (orientadora). II. Título.

 620.5 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2019-25

ANGELA MARIA CORDEIRO GUIMARÃES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES NANOCOMPÓSITOS DE
QUITOSANA E NANOTUBOS DE CARBONO COM POLIESTIRENO/CUMARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 29/09/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Yadira Itzel Vega Cantú (orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Glória Maria Vinhas (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Cristal Martinez Ibañez (Examinador Externo)

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

Dedico esta dissertação aos meus pais, Moises e Francisca, a Ronaldo e a toda minha família, com amor e gratidão pela compreensão, carinho, paciência e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter permitido que chegasse até aqui e a minha família pelo companheirismo nos momentos de dificuldade.

A Profa. Dra. Yadira Itzel Veja Cantú e ao Dr. André Galembeck pela confiança, compreensão na realização deste trabalho e pela oportunidade de ter sido orientado por vocês.

A Dra. Cristal Martinez Ibañez pela orientação, apoio, incentivo, convivência e aprendizados nesse período do mestrado.

A Dra. Glória Maria Vinhas pelas contribuições e participação como membro da banca avaliadora deste trabalho.

Aos docentes que ministraram as disciplinas cursadas durante o programa e que muito contribuíram para a aquisição de um conhecimento científico de grande relevância na minha formação.

Aos amigos Sidicleia Bezerra e Miguel Pelagio pelas contribuições prestadas nos momentos necessários e pela convivência.

A Simone Simões pelas contribuições, amizade e incentivo durante os momentos difíceis.

A Romário Justino pelas orientações nas medidas de FTIR, realizações de medidas de impedância e fluorescência.

A Tayane Mendes e Aldenise pela realização das medidas de atividade microbiana.

Aos técnicos do Centro de Tecnologias do Nordeste – CETENE, Fábiana, Gabrielle Vasconcelos, Dyego Maia, Diego Ortiz, Joseane, pelas contribuições para obtenção dos resultados de caracterização para elaboração do presente estudo.

A Karina Saraira pelas análises de Microscopia Eletrônica de transmissão no Centro de Pesquisa Ageu Magalhães.

Aos amigos do laboratório de Compostos híbridos, Interfaces e Coloídes, Paula Sandrelly, Giovana Marília e Maria Clara pelas contribuições e momentos compartilhados.

Aos amigos Bruna Gomes, Jéssica Queiroz, Ingrid Teixeira, Valéria Gorayeb, Cícero, Aluiz Magno e Karina Silva, por todos os momentos compartilhados e incentivo.

A todos os funcionários da EREM- Professor Francisco Joaquim de Barros Correia pelo incentivo e solidariedade na conclusão deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

RESUMO

Os nanocompósitos formados com nanotubos de carbono (CNT) apresentam interessantes propriedades, devido as suas contribuições nas propriedades térmica, elétrica e mecânicas. A combinação de nanotubos de carbono com partículas fluorescentes em uma base polimérica resulta em materiais com propriedades interessantes. Dentre as bases poliméricas disponíveis, a quitosana foi escolhida porque tem a capacidade de formar filmes facilmente e apresenta atraentes propriedades. A adição de nanocompósitos de nanotubos de carbono com nanopartículas de poliestireno-cumarina para a formação de filmes de quitosana, viabiliza a aplicação no sensoriamento e controle de crescimento de bactérias patogênicas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a síntese de filmes nanocompósitos multifuncionais de quitosana com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de poliestireno/cumarina. Inicialmente foram realizados estudos comparativos dos métodos de purificação e funcionalização de CNT, assim como ancoragem de nanopartículas fluorescentes em nanotubos de carbono. Em seguida, os filmes foram produzidos através das misturas das dispersões. A síntese dos nanocompósitos, em forma de filmes, foi avaliada mediante estudos comparativos da concentração de quitosana e percentuais de nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de poliestireno/cumarina (CNT/PS–Cumarina) para formação de filmes homogêneos. Ao final, foram produzidos filmes de quitosana com 3% (m/m) e 10% (m/m) de CNT/PS – Cumarina, utilizando como corantes fluorescentes as cumarinas 6 e 30. De forma geral, os procedimentos de purificação, funcionalização e decoração dos CNTs se mostraram eficientes e não danificaram a estrutura dos mesmos. Nos filmes de quitosana, o compósito MWCNT/PS-Cumarina é melhor disperso na matriz de quitosana, e apresenta fluorescência na região de 480 nm, com poucas variações na intensidade ou comprimento de onda, devido a cumarina utilizada ou formação de nanopartículas aglomeradas. Em geral, os filmes são bem flexíveis, homogêneos, boa dispersão das nanopartículas e forte interação entre os materiais. A partir das medidas de impedância eletroquímica, maiores concentrações de CNTs (10% m/m) favorece melhor condução de elétrons na superfície do eletrodo. Medidas do grau de intumescimento paulatino também mostraram que os filmes com 10% m/m de MWCNT/PS-cumarina absorvem uma menor quantidade de água, exibindo um percentual de hidrofobicidade. Além disso, a sedimentação dos nanotubos favorece pequenas mudanças nas hidrofobicidade das superfícies, o que promove a aplicação em materiais que necessitem de superfícies diferentes. Ao investigar a atividade antimicrobiana foi observado que os filmes a

base de quitosana não apresentam zona de inibição em meio sólido, tanto para *Escherichia coli* quanto para a *Staphylococcus aureus*. Os filmes em contato com solução bacteriana causaram a destruição parcial da membrana citoplasmática de *E. coli* e *Salmonella*. Além disso, a intensidade da fluorescência também foi alterada conforme a concentração bacteriana e tempo de contato com as bactérias, indicando também que os nanocompósitos podem ser aperfeiçoados para a utilização no sensoriamento de bactérias. Estes resultados mostram que os nanocompósitos formados possuem diversas funções interessantes, que podem ser utilizados como materiais de proteção, identificação e controle de alguns patógenos. Entretanto, é importante ressaltar que para a utilização nestes campos, serão necessários testes mais específicos e detalhados para uma efetiva aplicação.

Palavras-chave: Nanocompósitos. Nanotubos de carbono. Quitosana. Cumarinas. Agentes antimicrobianos.

ABSTRACT

Nanocomposites formed with carbon nanotubes (CNT) have interesting properties due to their contributions in thermal, electrical and mechanical properties. The combination of carbon nanotubes with fluorescent particles on a polymer base results in materials with interesting properties. Among the polymer bases available, chitosan was chosen because it has the ability to form films easily and presents attractive properties. The addition of nanocomposites of carbon nanotubes with polystyrene-coumarin nanoparticles for the formation of chitosan films, makes possible the application in the sensing and growth control of pathogenic bacteria. Thus, the present work aimed to synthesize multifunctional nanocomposite films of chitosan with carbon nanotubes decorated with polystyrene / coumarin nanoparticles. Initially, comparative studies of CNT purification and functionalization methods were performed, as well as anchoring of fluorescent nanoparticles to carbon nanotubes. Thereafter, the films were produced through the blends of the dispersions. The synthesis of nanocomposites in the form of films was evaluated by comparative studies of chitosan concentration and percentage of carbon nanotubes decorated with polystyrene/coumarin nanoparticles (CNT / PS-Coumarin) to form homogeneous films. At the end, chitosan films with 3% (m / m) and 10% (m / m) CNT / PS-Coumarin were produced using coumarins 6 and 30 as fluorescent dyes. In general, purification procedures, functionalization and decoration of the CNTs were efficient and did not damage their structure. In the chitosan films, the MWCNT / PS-Coumarin composite is better dispersed in the chitosan matrix, and exhibits fluorescence in the region of 480 nm, with few variations in intensity or wavelength due to coumarin used or formation of agglomerated nanoparticles. In general, the films are very flexible, homogeneous, good dispersion of the nanoparticles and strong interaction between the materials. From the measurements of electrochemical impedance, higher concentrations of CNTs (10% m/m) favor better conduction of electrons on the surface of the electrode. Measurements of the degree of gradual swelling also showed that films with 10% m/m of MWCNT/PS-coumarin absorb a smaller amount of water, exhibiting a percentage of hydrophobicity. In addition, the sedimentation of the nanotubes favors small changes in the hydrophobicity of the surfaces, which promotes the application in materials that need different surfaces. When investigating the antimicrobial activity, it was observed that the films based on chitosan do not show zone of inhibition in solid medium, for both *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The films in contact with bacterial solution caused the partial

destruction of the cytoplasmic membrane of *E. coli* and *Salmonella*. In addition, the fluorescence intensity was also altered according to the bacterial concentration and contact time with the bacteria, also indicating that the nanocomposites can be optimized for use in the sensing of bacteria. These results show that the formed nanocomposites have several interesting functions that can be used as protection materials, identification and control of some pathogens. However, it is important to emphasize that for use in these fields, more specific and detailed tests will be required for an effective application.

Keywords: Nanocomposites. Carbon nanotubes. Chitosan. Coumarins. Antimicrobial agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas de arranjo de uma folha de grafeno.....	22
Figura 2 - Possíveis orientações de nanotubos de carbono	24
Figura 3 - Representação esquemática da densidade de estados para nanotubos metálico e semicondutor.....	24
Figura 4 - Representações esquemáticas das resistências à tensão e à torção de um NTC.....	26
Figura 5 - Modelo molecular de um nanotubo CNx contendo átomos de N.....	28
Figura 6 - Estrutura da cumarina e derivados	35
Figura 7 - Diagrama de Jablónski.....	36
Figura 8 - Estruturas químicas da quitina e da quitosana.....	41
Figura 9 - Procedimentos de purificação dos CNTs.....	47
Figura 10 - Representação da decoração dos CNTs com látex de nanopartículas de poliestireno/cumarina.....	51
Figura 11 - Micrografia de CNx funcionalizados.....	59
Figura 12 - Micrografias de MWCNT funcionalizados.....	59
Figura 13 - Espectro Raman CNx pristine, purificados e funcionalizados.....	60
Figura 14 - Espectro Raman dos MWCNT pristine, purificados e funcionalizados.....	61
Figura 15 - Espectro de FTIR dos CNx.....	62
Figura 16 - Espectro de FTIR dos MWCNTs.....	63
Figura 17 - Micrografia de MEV para poliestireno pura e partículas PS/C-6 e PS/C-30.....	64
Figura 18 - Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas.....	65
Figura 19 - Espectros de fluorescência das nanopartículas..	66
Figura 20 - Espectro de absorção e emissão da PS-C6.....	67
Figura 21 - Espectro de absorção e emissão da PS-C30.....	67
Figura 22 - Espectro Raman dos CNTs decorados com PS-C6.....	68
Figura 23 - Micrografias dos CNTs decorados com nanoartículas PS-C6.....	69
Figura 24 - Espectros Raman para os CNTs decorados com PS-C30.....	70
Figura 25 - Micrografias dos CNTs decorados com nanoartículas de PS-C30.....	70
Figura 26 - Espectro de FTIR dos CNx decorados com cumarinas.....	71
Figura 27 - Espectro de FTIR dos MWCNTs decorados com cumarinas.....	72

Figura 28 - Espectros de emissão para MWCNT/PS-6 e CN _x /PS-C6.....	73
Figura 29 - Espectros de emissão para MWCNT/PS-30 e CN _x /PS-C30.....	73
Figura 30 - Fotografias dos filmes utilizados nesta dissertação.....	76
Figura 31 - Fotografias dos filmes utilizados nesta dissertação.....	76
Figura 32 - Fotografias dos filmes utilizados nesta dissertação.....	77
Figura 33 - Micrografia eletrônica de varredura da superfície de filme de quitosana.....	77
Figura 34 - Micrografia eletrônica de varredura da superfície do filme MWCNT/C6-3.....	78
Figura 35 - Micrografias do filme MW/C6-10.....	79
Figura 36 - Micrografias das superfícies do filme MW/C30-3.....	80
Figura 37 - Micrografias da superfície do CN _x /C6-3.....	81
Figura 38 - Micrografia de MEV da superfície dos filmes CN _x /C6-10.....	81
Figura 39 - Micrografias da superfície do filme CN _x /C30-3 e CN _x /C30-10.....	82
Figura 40 - Impedância eletroquímica dos nanocompósitos MWCNT/PS-cumarina.....	85
Figura 41 - Espectros de fluorescência dos filmes.....	86
Figura 42 - Micrografias do filme MW/C6-3 após contato com <i>E.coli</i>	88
Figura 43 - Micrografias do filme MW/C6-10 após contato com <i>E.coli</i>	89
Figura 44 - Micrografias do filme MW/C30-3 após contato com <i>E.coli</i>	89
Figura 45 - Micrografias do filme MW/C30-10 após contato com <i>E.coli</i>	90
Figura 46 - Micrografias do filme MW/C6-3 após contato com <i>Salmonella typhimurium</i>	91
Figura 47 - Micrografias do filme MW/C6-10 após contato com <i>Salmonella Typhimurium</i>	91
Figura 48 - Micrografias do filme MW/C30-3 após contato com <i>Salmonella Typhimurium</i>	92
Figura 49 - Micrografias do filme MW/C30-10 após contato com <i>Salmonella Typhimurium</i>	92
Figura 50 - Espectros de fluorescência do filme MW/C6-3 após contato com <i>E.coli</i>	94
Figura 51 - Espectros de fluorescência do filme MWCNT/C6-10 em contato com <i>E.coli</i>	95
Figura 52 - Espectros de fluorescência do MWCNT/C6-3 em contato com a <i>Salmonella Typhimurium</i>	96
Figura 53 - Espectros de fluorescência do MWCNT/C6-10 em contato com a <i>Salmonella Typhimurium</i>	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Materiais e reagentes utilizados durante o trabalho.....	46
Tabela 2 - Condições experimentais para ancoragem de nanotubos de carbono.....	49
Tabela 3 - Condições de preparo para as amostras de nanocompósitos.....	51
Tabela 4 - Parâmetros analisados para filme MW/C6-3 em contato soluções de microrganismos.....	57
Tabela 5 - Potencial Zeta das nanopartículas de poliestireno.....	67
Tabela 6 - Percentual de absorção de água dos filmes.....	83

LISTA DE ABREVIACÕES

CNT	Nanotubos de carbono
MWCNT	Nanotubos de carbono com múltiplas paredes
DWCNT	Nanotubos de carbono de parede dupla
SWCNT	Nanotubo de carbono de parede simples
CNx	Nanotubos de carbono dopados com nitrogênio
PS	Poliestireno
NPs	Nanopartículas
PS/C6	Poliestireno com cumarina 6
PS/C30	Poliestireno com cumarina 30
SDS	Dodecil sulfato de sódio
MWCNT/C6-3	Filme de quitosana com 3 mg de nanotubos de carbono com múltiplas camadas decorados com cumarina 6
MWCNT/C6-10	Filme de quitosana com 10 mg de nanotubos de carbono com múltiplas camadas decorados com cumarina 6
MWCNT/C30-3	Filme de quitosana com 3 mg de nanotubos de carbono com múltiplas camadas decorados com cumarina 30
MWCNT/C30-10	Filme de quitosana com 10 mg de nanotubos de carbono com múltiplas camadas decorados com cumarina 30
CNx/C6-3	Filme de quitosana com 3 mg de nanotubos de carbono dopados com nitrogênio decorados com cumarina 6
CNx/C6-10	Filme de quitosana com 10 mg de nanotubos de carbono dopados com nitrogênio decorados com cumarina 6
CNx/C30-3	Filme de quitosana com 3 mg de nanotubos de carbono dopado com nitrogênio decorados com cumarina 30
CNx/C30-10	Filme de quitosana com 10 mg de nanotubos de carbono dopado com nitrogênio decorados com cumarina 30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1	Nanotubos de carbono	21
3.1.1	Estrutura e propriedades.....	23
3.1.2	Modificação da estrutura dos nanotubos de carbono.....	26
3.1.3	Fotoluminescência em nanotubos de carbono	28
3.2	Látex.....	29
3.2.1	Látex de nanopartículas de poliestireno	30
3.2.2	Látex de poliestireno com partículas fluorescentes	31
3.2.3	Látex de poliestireno fluorescente e nanotubos de carbono	33
3.3	Corantes orgânicos	34
3.3.1	Cumarinas	34
3.3.2	Propriedades fotofísicas das cumarinas	35
3.3.3	Influência dos grupos substituintes nas propriedades fotofísicas das cumarinas.....	37
3.3.4	Influência do meio para as propriedades fotofísicas das cumarinas	38
3.3.5	Efeito nas propriedades fotofísicas a partir de variações do pH	40
3.4	Quitosana.....	41
3.4.1	Propriedades	43
3.4.2	Nanocompósitos de quitosana e nanotubos de carbono.....	43
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	46
4.1	Materiais e reagentes.....	46
4.2	Processo de purificação dos nanotubos de carbono.....	47
4.3	Processo de funcionalização para os nanotubos de carbono.....	48
4.4	Síntese de látex de nanopartículas de poliestireno com cumarina.....	48
4.5	Decoração de nanotubos de carbono com látex de nanopartículas de poliestireno/cumarina.....	48
4.6	Síntese de nanocompósito de nanotubos de carbono e quitosana.....	50
4.7	Métodos de caracterização.....	52
4.7.1	Espectroscopia Raman.....	52

4.7.2	Infravermelho com transformada de Fourier.....	52
4.7.3	Microscopia eletrônica de transmissão.....	52
4.7.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	53
4.7.5	Capacidade de absorção dos nanocompósitos.....	53
4.7.6	Potencial Zeta.....	54
4.7.7	Espectroscopia de absorção no UV-visível.....	54
4.7.8	Espectroscopia de emissão.....	54
4.7.9	Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	54
4.8	Ensaaios microbiológicos.....	55
4.8.1	Método de difusão em Ágar.....	56
4.8.2	Avaliação do comportamento dos filmes em contato com soluções de microrganismos.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
5.1	Processo de purificação e funcionalização dos nanotubos de carbono.....	58
5.2	Caracterização das nanopartículas de poliestireno/cumarina.....	64
5.3	Decoração de nanotubos de carbono com nanopartículas de poliestireno/cumarina.....	67
5.4	Caracterização química da quitosana.....	73
5.5	Otimização do processo de formação de filmes de quitosana com nanotubos de carbono/poliestireno-cumarina.....	74
5.6	Caracterização estrutural dos filmes de quitosana com nanotubos de carbono/poliestireno-cumarina.....	75
5.7	Capacidade de absorção dos filmes de quitosana/nanotubos de carbono.....	83
5.8	Medidas de Impedância eletroquímica nos filmes de MWCNT/PS-Cumarina.....	84
5.9	Fluorescência dos filmes nanocompósitos MWCNT/OS-cumarina em quitosana.....	86
5.10	Ensaaios microbiológicos.....	87
5.10.1	Teste de difusão em ágar.....	87
5.10.2	Estudo sobre a interação dos microrganismos com a superfície dos filmes....	88
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
7	PERSPECTIVAS.....	100

REFERÊNCIAS	101
--------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

Nanocompósitos consistem em materiais multifásicos que exibem uma proporção significativa das propriedades de ambas as fases que os constituem, de modo que é obtida uma melhor combinação de propriedades. De acordo com esse princípio de ação combinada, melhores propriedades são criadas por uma combinação judiciosa de dois ou mais materiais distintos, sendo um considerado a matriz e outro o reforço (CALLISTER, 2008).

Por sua vez, os nanocompósitos formados com nanotubos de carbono apresentam interessantes propriedades, devido as suas contribuições nas propriedades térmica, elétrica e mecânicas. A adição de nanotubos, juntamente com outras partículas, inclusive fluorescentes, viabiliza a aplicação em filmes e sensores utilizados tanto em embalagens ativa como em embalagens inteligentes para alimentos, além de possuírem potenciais aplicações em materiais biomédicos, devido à elevada área superficial, que possibilita o transporte de biomoléculas e fármacos (LIAO e ZHANG 2012). Os sensores estão baseados na detecção, de forma mais rápida e simples, de vários agentes patogênicos e toxinas bacterianas, que podem ser transmitidas pelos alimentos (GÜNER *et al.* 2017).

Um biopolímero, formador de filmes, que possui múltiplas características, inclusive no controle de crescimento das principais bactérias e fungos encontrados em alimentos, é a quitosana (RABEA *et al.* 2003). Além disso, a quitosana também é bastante utilizada em materiais de proteção devido a capacidade de acelerar o processo de cicatrização, aprimorando as funções de células inflamatórias, macrófagos e fibroblastos (CAETANO *et al.* 2015).

Os patógenos transmitidos em alimentos são uma das principais causas de doença e morte em todo o mundo (GÜNER *et al.* 2017). De acordo o Ministério da Saúde e dos dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 95% dos agentes etiológicos identificados em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causados por bactérias, sendo a *Salmonella* a principal contribuinte, seguida por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, considerando os anos de 2007 a 2017. (BRASIL, 2017)

Em todo o mundo, são aproximadamente 80,3 milhões de casos de infecção e 155 mil mortes por ano decorrentes da salmonela (MAJOWICZ *et al.* 2010). Para minimizar o risco de contaminação, o armazenamento de alimentos perecíveis e prontos para o consumo na geladeira é uma prática comum. No entanto, algumas bactérias podem sobreviver a temperaturas inferiores a 5° C (IVANCIC, JAMNIK, AND STOPAR 2013). Por estas razões, um desafio

secundário em combinação com baixa temperatura deve ser empregado para controlar de forma mais eficaz algumas bactérias em alimentos durante o armazenamento.

A partir disso, a síntese de nanocompósitos com materiais que apresentem possibilidades de controlar e/ou identificar alguns patógenos é de extrema importância para evitar contaminações. Além disso, até a presente data não foi registrado trabalhos que envolvessem a decoração de nanotubos com nanopartículas de poliestireno/cumarina em filmes de quitosana.

No entanto, a utilização dessas nanopartículas de forma isolada é bastante discutida na literatura. As nanopartículas de poliestireno com incorporação de cumarina, por exemplo, são utilizadas no sensoriamento de microambientes (SAKUMA *et al.* 2015), enquanto que as nanopartículas de poliestireno apresentam toxicidade para células cancerígenas e bacterianas (LUNOV *et al.* 2011; NOMURA *et al.* 2016). Já a formação de nanocompósitos entre nanotubos de carbono e quitosana é bastante citado na literatura, com aplicações em embalagens, terapia fotodinâmica, materiais de proteção, entre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

A síntese de filmes nanocompósitos multifuncionais de quitosana com nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de poliestireno/cumarina, assim como a caracterização deste material.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar filmes de quitosana com nanotubos de carbono e nanopartículas de poliestireno/cumarina em diferentes concentrações;
- Estudar as condições de secagem e processamento dos nanocompósitos;
- Avaliar a morfologia e dispersão dos filmes nanocompósitos;
- Investigar as propriedades fotoluminescentes e de condução dos filmes;
- Analisar as propriedades antibacteriana dos filmes *in vitro*;
- Examinar o efeito dos filmes no crescimento das bactérias *Eschechiria coli* e *Salmonela tyfimurium*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Nanotubos de carbono

A capacidade única que os átomos de carbonos apresentam para participar em ligações covalentes fortes com diferentes estados de hibridação, ou com elementos não-metálicos permitem a formação de diversas estruturas e propriedades. Uma série de novos materiais de carbono com propriedades surpreendentes e diversas aplicações em tecnologia vem sendo identificado e estudado. (GEORGAKILAS et al. 2014)

Os nanotubos de carbono (CNT) foram vistos inicialmente pelo grupo de S. Iijima em 1991 enquanto estudava outros métodos para produção de fulereno. Ao analisar através do microscópio eletrônico de transmissão, foram observadas as áreas de linhas equidistantes simetricamente dispostas em torno de um vazio central. Os pesquisadores perceberam que estas faixas seriam a projeção de objetos tubulares. Logo, as estruturas são tubos encaixados um no outro, chamados de nanotubos de parede múltiplas. Posteriormente, o mesmo grupo, ao modificar as condições de síntese descreveu sobre os nanotubos de parede simples (KRUEGER, 2010).

Formados a partir de uma rede hexagonal de átomos de carbono sp^2 , tais como o grafeno, os CNTs apresentam as bordas da folha de grafeno fundidas para formar o tubo cilíndrico com alta relação de comprimento e diâmetro, conforme mostra a Figura 1. Os nanotubos mais simples têm uma única parede grafênica (SWCNT), que está terminado em ambas as extremidades com diâmetros de cerca de 0,4 - 2 nm e vários micrometros de comprimento. Há também, os nanotubos com parede dupla (DWCNT) ou multicamadas (MWCNT), dependendo do número de camadas grafênicas nas paredes da estrutura cilíndrica. (GEORGAKILAS et al. 2014)

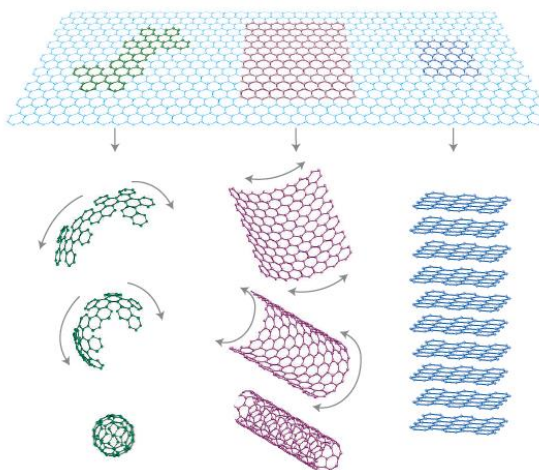


Figura 1: Diversas formas de arranjo de uma folha de grafeno para formar os nanotubos de carbono, grafite ou fulereno. (GEIM e NOVOSELOV, 2007)

Os nanotubos de carbono SWCNTs e MWCNTs podem ser aplicados em vários campos. Tais como em dispositivos eletrônicos, devido a compatibilidade com substratos flexíveis, rigidez excepcional, além das propriedades térmica e eletrônica, que serão discutidas adiante. São também aplicados em catálise, carregamento de fármacos, dispositivos biomédicos, células fotovoltaicas, materiais de alta resistência (considerando como nanofibras na concepção de novos compósitos com polímero). (SAKELLARIOU, PRIFTIS, e BASKARAN, 2013)

Em sensores, por exemplo, para a detecção do cloridrato de difenhidramina (DPH) através dos nanocompósitos MWCNTs-Cys-AuNPs, devido a notável condutividade e a grande área superficial desses nanocompósitos, o sensor apresenta uma ampla faixa linear, baixo limite de detecção, boa reprodutibilidade e estabilidade aceitável (MIAO *et al.* 2015). Além disso, devido a estas características, os CNTs são também bastante utilizados como adsorventes de metais pesado e diferentes materiais orgânicos. (XIE *et al.* 2015)

Entretanto, de forma geral a aplicação de CNTs requer uma boa dispersão em polímeros, solução orgânica e aquosa. Uma combinação entre grande área de superfície, elevada relação de aspecto, e uma interação de Van der Waal atrativa permitem aos CNTs existir em agregados, tornando-os difíceis de misturar com outros materiais. (SAKELLARIOU, PRIFTIS e BASKARAN, 2013)

Entre outras aplicações dos nanotubos de carbono, seu uso também é atribuído como material de reforço em filmes e sensores utilizados tanto em embalagens ativa como em embalagens inteligentes para alimentos. Estes sensores estão baseados na detecção, de forma mais rápida e simples, de vários agentes patogênicos e toxinas bacterianas transmitidas pelos alimentos. Um exemplo do uso de MWCNTs em embalagens é o bionanocompósito formado

por poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) reforçado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (PHBV-g-MWCNTs). Nesse material, os filmes obtidos são uniformemente dispersos na matriz de PHBV e assim possuem melhores propriedades mecânicas, estabilidade térmica, de barreira e de migração (YU et al. 2014).

3.1.1 Estrutura e propriedades

Além do diâmetro e comprimento, a forma como cada camada de grafeno é enrolada ao longo do eixo do tubo tem influência sobre as propriedades, obtendo-se arranjos quirais e não quirais. A simetria do sistema planar é quebrada com o enrolamento da folha de grafeno e uma direção distinta com relação à estrutura hexagonal é imposta, a direção axial. Em consequência, os nanotubos podem assumir ou não uma densidade de estados não-nula no nível de Fermi (ou seja, podem ser metálico ou semicondutor), interferindo nas propriedades óticas e de transporte elétrico (EBBESEN *et al.* 1996 e KRUEGER, 2010).

De acordo com a direção axial, os nanotubos de carbono podem ser classificados em Zig-zag, armchair e quiral (Figura 2). Nos nanotubos em zig-zag a camada de grafeno é enrolada de uma maneira que as extremidades do tubo aberto tenham a borda em zig-zag. Os armchair (braço-cadeira), em comparação com os tubos zig-zag, a folha de grafeno é ligada em 30° antes de começar a enrolar. Em consequência, os lados da última fileira consistem em anéis de seis membros. Nos nanotubos quirais, o ângulo de enrolamento da camada de grafeno é entre 0° e 30°, o que acarreta em perda de simetria e da não presença de centros de inversão. (KRUEGER, 2010)

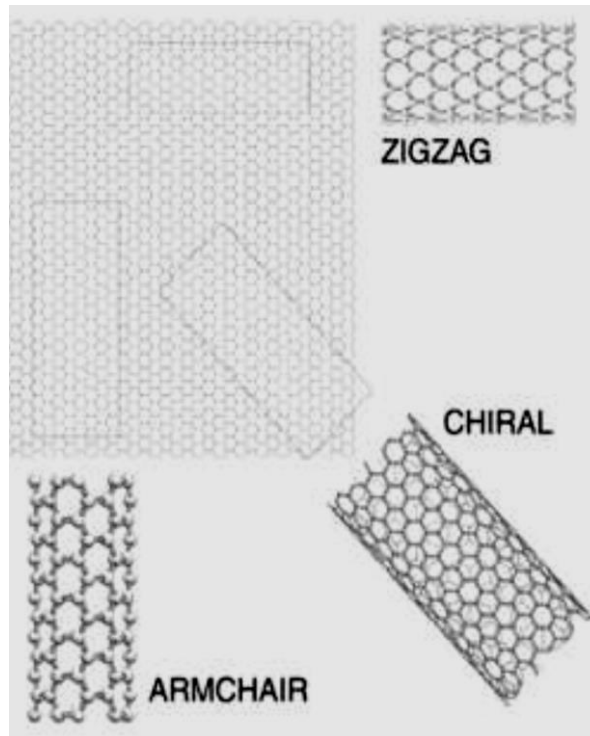


Figura 2: Orientações de nanotubos de carbono zigzag, chiral e armchair (no caso, representadas estruturas de única camada) obtidas a partir do enrolamento de uma folha de grafeno (O' Connell, 2006)

Os nanotubos de carbono podem ser considerados como um nanomaterial quase unidimensional, devido ao confinamento quântico ao longo da direção transversal de um único nanotubo. SWCNTs apresentam uma máxima densidade eletrônica dos estados muito fina, chamada de singularidades de Van Hove no diagrama de energia de banda. As energias de van Hove máxima de SWCNTs, em um diagrama de banda, são principalmente dependentes do diâmetro e do ângulo quiral em que o nanotubo específico é enrolado (HONG, *et al* 2015). A Figura 3 apresenta a densidade de estados eletrônicos de um nanotubo semicondutor (que pode ser um nanotubo em zig-zag ou quiral) e de um nanotubo metálico (armchair).

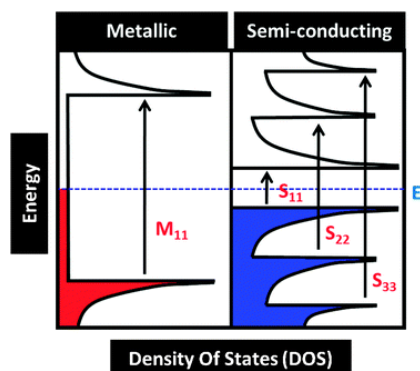


Figura 3: Representação esquemática da densidade de estados para nanotubos metálico e semicondutor. Onde E_f corresponde à energia do nível de Fermi e as setas estão representando as transições eletrônicas permitidas entre as singularidades de van Hove. Retirado de Kozák et al. (2016).

Para os nanotubos semicondutores, os estados preenchidos (estados de valência π) estão localizados abaixo do nível de Fermi e existe uma lacuna de energia (“*band gap*”) entre o primeiro estado preenchido da banda de valência e o primeiro estado vazio (estados de valência π^*) da banda de condução, esse *band gap* é de aproximadamente 0,5 eV e varia inversamente com o diâmetro do tubo. Para os nanotubos metálicos, o nível de Fermi é ocupado e não existe lacuna de estados entre os níveis vazios e preenchidos (DE SOUZA FILHO e FAGAN, 2007).

As propriedades elétricas dos nanotubos de carbono foram previstas teoricamente e verificada experimentalmente por vários pesquisadores. No entanto, deve-se ressaltar que essas características eletrônicas são alteradas pela presença de defeitos, incluindo pentágonos, vagância e impurezas. O fato é que os nanotubos de carbono metálicos têm excelente condutividade (ou seja, baixa resistividade). Contudo, quando os nanotubos estão organizados em superestruturas, tais como fibras 1D, membranas, aerogels, entre outros, as resistividades dessas estruturas são mais elevadas do que em nanotubos isolados. Esse aumento pode ser conferido à resistência de contato que surge nos pontos de ligação entre os nanotubos individuais e à presença de impurezas, que afetam o transporte de elétrons, causando espalhamento (GEORGAKILAS *et al.* 2014).

Os MWCNTs sem defeitos têm propriedades elétricas semelhantes aos SWCNT, devido ao fraco acoplamento entre os cilindros de carbono concêntricos. Além disso, por se tratarem de estruturas quase unidimensionais, o transporte eletrônico nos nanotubos metálicos (tanto MWCNT quanto SWCNT) ocorre de forma balística, isto é, sem espalhamento, possibilitando a condução de corrente através de grandes extensões do nanotubo sem que ocorra o aquecimento dos mesmos (HERBST, FERNANDES MACÊDO e ROCCO, 2004). No caso dos MWCNTs é difícil prever suas propriedades eletrônicas, pois o enrolamento das folhas de grafeno pode variar ao longo das diferentes camadas.

Os nanotubos de carbono também apresentam propriedades mecânicas interessantes. Devido à elevada resistência das ligações covalentes C=C entre átomos de carbono sp^2 adjacentes em uma folha de grafeno, os nanotubos de carbono são materiais fortes e com elevada flexibilidade. Medições mostraram que os MWCNTs possuem módulos de Young entre 1,8 e 1,3 TPa, podendo variar de acordo com os métodos de produção. Já os SWCNTs apresentam um módulo de 1,25 TPa. Um aspecto interessante é que quando MWCNTs são submetidos a elevadas tensões (puxados nas extremidades), somente a última camada tende a romper, deslizando sobre as camadas mais internas (GEORGAKILAS *et al.* 2014).

Além disso, os CNTs podem ser tensionados e torcidos repetidamente, apresentando flexões completamente reversíveis até ângulos superiores a 110° , apesar da formação de complexas formas de torção (O' CONNELL, 2006). Além de poderem ser estirados (até 10% do seu comprimento) em grandes deformações, sem que danos estruturais significativos sejam causados (Figura 4), indicando que sua estrutura é notavelmente flexível e elástica.

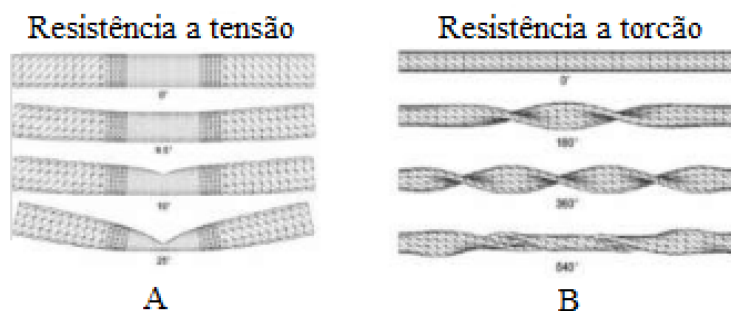


Figura 4: Representações esquemáticas das resistências (a) à tensão e (b) à torção de um NTC, retirado de O' Connell (2006).

3.1.2 Modificação da estrutura dos nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono são considerados como reforço ideal para preenchimentos de matrizes poliméricas, devido as suas interessantes propriedades. No entanto, as interações das cadeias moleculares do polímero com a superfície lisa dos nanotubos de carbono são criticamente importantes para uma eficiente transferência de carga da matriz para os nanotubos. A ligação química da matriz polimérica com os nanotubos aumentará consideravelmente suas combinações e consequentemente suas propriedades. (WANG, S.F. et al. 2005).

Uma maneira interessante de aumentar a interação entre os materiais é através da introdução de vários grupos funcionais na superfície dos nanotubos (WANG, S.F et al. 2005). Além disso, a introdução de grupos funcionais na superfície diminui a interação de van der Waals entre os carbonos, o que amplia o seu potencial em muitas aplicações. (SAKELLARIOU, PRIFTIS e BASKARAN 2013)

Existem vários métodos para modificar os nanotubos e para obter uma melhor dispersão, incluindo a oxidação superficial, a introdução de grupos funcionais hidrófilos, a modificação

por agentes químicos e o revestimento superficial não covalente com agentes tensioativos e cadeias de polímeros longas (KAROUSIS, TAGMATARCHIS e TISIS, 2010).

No caso de aplicações em biomateriais os nanotubos precisam ser modificados com moléculas naturais, como aminoácidos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e polímeros biodegradáveis (MALLAKPOUR e MADANI, 2015). Esses materiais podem ser utilizados na entrega controlada de fármacos para o tratamento terapêutico de tumores. Dessa forma, os nanotubos funcionalizados têm potencial aplicação no campo da nanobiotecnologia e da nanomedicina.

Dentre os procedimentos utilizados para a modificação dos nanotubos, a funcionalização não-covalente é a mais interessante, uma vez que as propriedades eletrônicas dos nanotubos são mantidas, pois a estrutura da ligação sp^2 e a conjugação dos átomos de carbono do tubo são conservadas.

A solubilização dos nanotubos de carbono em cadeias poliméricas lineares e surfactantes tais como dodecil sulfato de sódio (SDS), poliestireno, entre outros, é um exemplo dessa funcionalização. Através do processo de esfoliação de nanotubos, usando ultrassom, os nanotubos são dispersos e a região hidrofóbica das moléculas de surfactantes interage com a superfície dos nanotubos destruindo a interface hidrofóbica dos nanotubos com a água e a interação tubo-tubo (Van der Waals), que é a responsável pela formação dos agregados (ZANNOTTI et al. 2016).

Os grupos químicos também podem ser anexados à superfície dos nanotubos através da funcionalização covalente, no qual as moléculas são ligadas por meio de ligações covalentes, modificando a hibridização das ligações de sp^2 para sp^3 e consequentemente afetando a simetria e as propriedades elétricas dos nanotubos. Entre vários grupos usados para esta funcionalização destaca-se o grupo carboxílico. Na reação de carboxilação o átomo de carbono do COOH liga-se covalentemente com os átomos de carbono do nanotubo (KAROUSIS, TAGMATARCHIS e TISIS, 2010).

Outra forma de funcionalização covalente é a dopagem substitucional de átomos, no qual os nanotubos de carbono dopados com nitrogênio, boro ou ambos são os mais utilizados. Esses sistemas dopados são interessantes, pois eles aumentam a reatividade dos nanotubos (AYALA et al. 2010)

A incorporação de átomos de N em nanotubos de carbono puros é interessante para torná-los quimicamente ativos. Neste contexto, os defeitos superficiais e rugosidade das paredes exteriores são particularmente atraentes, pois esta é uma maneira para melhorar a

reatividade covalente do tubo, uma vez que a funcionalização pode servir para ancorar grupos ou partículas que são úteis para rotas de funcionalização adicionais.

Partindo de um ponto de vista conceitual, a dopagem substitutiva está relacionada principalmente à remoção de átomos de C da estrutura cristalina de um nanotubo *pristine*. Isso implica numa substituição direta de um átomo de C por um N, ou uma remoção múltipla de átomos de C incorporando N em seu lugar, mas não necessariamente com a mesma configuração de parede, induzindo defeitos estruturais que afetam as propriedades dos nanotubos, conforme mostra a Figura 5 (AYALA et al. 2010).

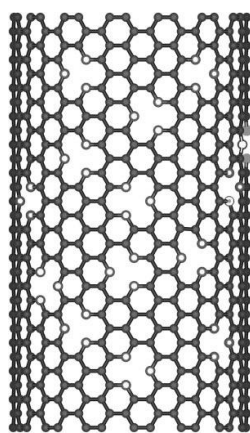


Figura 5: Modelo molecular de um nanotubo CN_x contendo átomos de N de forma piridina e altamente coordenada (esferas ocas) que substituem os átomos de C. Este modelo explica as energias de ligação encontradas experimentalmente pelos estudos EELS e XPS, retirado de Terrones (2003).

3.1.3 Fotoluminescência em nanotubos de carbono

De maneira geral, a fotoluminescência é a emissão de luz a partir de estados excitados eletronicamente que ocorre espontaneamente após o sistema absorver a luz. Basicamente, o processo de fotoluminescência pode ser descrito em termos do seu posicionamento espectral, dinâmica e eficiência. (KOZÁK et al. 2016)

O tempo de vida da luminescência característica dos nanotubos de carbono semicondutores de camada simples é inferior a 2ns, e estima-se um rendimento quântico da ordem de 10^{-3} , o que caracteriza como fluorescência. Esta atribuição é consistente com um pequeno desvio espectral entre a absorção e emissão, além disso, sugere apenas pequenas diferenças geométricas entre os estados eletrônicos excitado e fundamental. (HONG et al. 2015)

Para os nanomateriais de carbono, inclusive os nanotubos, a fluorescência com deslocamento normal de Stokes, tem sido relatada como uma propriedade óptica intrínseca, no qual há emissão de fluorescência com deslocamento para o vermelho após excitação com um comprimento de onda mais curto. No entanto, a fluorescência intrínseca de nanotubos de carbono é única com comprimentos de onda, sobretudo na segunda faixa do infravermelho próximo (NIR-II faixa, 1000-1700 nm), é observada apenas em nanotubos semicondutores de parede simples (KOZÁK et al. 2016), que não será discutida neste trabalho.

Já a fluorescência na região visível do espectro é observada em nanotubos de carbono oxidados ou funcionalizados, devido aos fluoróforos introduzidos na superfície dos nanotubos de carbono (podendo ser pequenas moléculas orgânicas fluorescentes, polímeros, complexos de metais de terras raras e quantum dots) (QIAN et al. 2013). Nesta dissertação foram introduzidas nanopartículas fluorescentes na superfície dos CNTs, e desta forma será abordada a fluorescência na região do visível.

3.2 Látex

Látex é uma dispersão coloidal estável de um polímero em meio aquoso. As partículas de polímero dispersas possuem formato esférico com diâmetro variando de 40 nm a 5 μ m (SPERLING, 2006). Os látices podem ser de origem natural ou sintética. O látex de borracha natural pode ser encontrado na *Hevea brasiliensis* (conhecida como seringueira) na forma de seiva leitosa, com partículas coloidais de polímero cis-1,4-poli-isopreno suspensas em meio líquido e com proteínas adsorvidas na superfície dessas partículas. Já o látex sintético, que foi utilizado neste trabalho, pode ser termoplástico ou elastômero. De forma genérica, pode ser produzido através da mistura de monômero, agente tensoativo e um iniciador (fonte de radicais livres) na água, que é ativado pelo calor (SPERLING, 2006).

Com a necessidade da redução do uso de solventes orgânicos, os látices vem ganhando destaque devido a sua base aquosa, isenta dos defeitos prejudiciais dos solventes orgânicos utilizados em outros produtos, o que potencializa sua aplicação em inúmeros produtos industriais (RIPPEL et al. 2003).

A síntese dos látices poliméricos pode ser feita por diversos métodos de polimerização radicalar, tais como, em massa, suspensão, solução e emulsão (CHERN, 2006). A técnica de

polimerização em emulsão é a mais utilizada, pois há eficiente remoção de calor através da fase aquosa durante a polimerização, o produto final tem baixa viscosidade e alta massa molar, o polímero é facilmente recuperado através de coagulação e/ou formação de filme (SPERLING, 2006). Além de permitir controlar as propriedades físico-químicas e morfológicas do látex (CHERN, 2006).

No entanto, pode haver contaminação pelo emulsificante, e são necessária lavagem e secagem para se obter o polímero. Além disso, a polimerização em emulsão é uma técnica bastante complexa, uma vez que a nucleação, crescimento e estabilização de partículas de polímero são controladas pelos mecanismos de polimerização de radicais livres em combinação com vários fenômenos coloidais (CHERN, 2006).

Estes polímeros em emulsão podem ser aplicados em borrachas sintéticas, termoplásticos, revestimentos, adesivos, ligantes, modificadores reológicos, pigmentos plásticos, padrões para a calibração de instrumentos, testes de imunodiagnóstico, suportes poliméricos para a purificação de proteínas e sistema de liberação de fármacos, entre outros (CHERN, 2006).

3.2.1 Látex de nanopartículas de poliestireno

As nanopartículas de poliestireno em látex apresentam baixa toxicidade (Liu et al., 2011), em relação poliestireno puro, além disso, podem ser sintetizadas facilmente com uma ampla variedade de modificações da superfície e tamanhos. Devido a essas propriedades, o látex de nanopartículas de poliestireno é bastante aplicado na avaliação e administração de novos fármacos, imagens, monitoramento da atividade enzimática e outros (LUNOV et al., 2011).

Entretanto, pesquisas apontam que a exposição oral as nanopartículas de poliestireno podem perturbar o transporte de ferro e a exposição crônica pode causar remodelação das vilosidades intestinais. Sendo a captação e o transporte influenciados pelo tamanho, concentração e carga das nanopartículas. Embora as consequências da exposição oral das nanopartículas, assim como o comportamento destas durante o ciclo celular ainda não foram completamente esclarecidos, a ecotoxicologia das nanopartículas de poliestireno tem estimulado muitas pesquisas na área (KAHRU e IVASK, 2013).

A citotoxicidade do látex de nanopartículas de poliestireno funcionalizada também tem sido investigada para células eucarionte (*Saccharomyces cerevisiae*) e procarionte (*Escherichia coli*), no qual, foi observado que as nanopartículas funcionalizadas com carga negativa mostraram pouca ou nenhuma toxicidade para ambos os tipos de células microbianas. Já as nanopartículas com carga positiva exibiram alta toxicidade apenas para a célula microbiana *E.coli* (NOMURA et al, 2015).

Nomura et al (2015) ao investigarem a toxicidade e o comportamento coloidal das nanopartículas de poliestireno em látex para a *L.lactis*, uma bactéria gram positiva, observaram que nas nanopartículas carregadas negativamente quase todas as células permaneceram vivas, uma vez que as nanopartículas não aderiram à superfície celular, como resultado da força eletrostática repulsiva. Em contrapartida, as nanopartículas carregadas positivamente aderiram na superfície da célula de *L. lactis*, causando a ruptura e morte celular.

Miyazaki et al (2015) investigaram a citotoxicidade das nanopartículas de poliestireno em látex modificadas com aminas carregadas positivamente para *S. cerevisiae* em diferentes ambientes. Ao dispersar, as células de levedura *S. cerevisiae*, em glucose ou solução aquosa de eletrólito de baixa resistência iônica com as nanopartículas de poliestireno em látex Miyazaki et al (2015) observaram alta toxicidade das nanopartículas que aderiram à superfície celular, com o aumento da toxicidade proporcional a concentração de NaCl, independentemente da concentração de glicose no meio de dispersão. Por conseguinte, a forte atração eletrostática entre as células de levedura carregadas negativamente e NPs carregadas positivamente resultou na adesão destas à superfície celular e subsequente morte celular.

Essas pesquisas nos sugerem que as nanopartículas de poliestireno em látex podem ser combinadas com diversos materiais, inclusive fluorescentes, e empregado em várias áreas, com diferentes propriedades.

3.2.2 Látex de poliestireno com partículas fluorescentes

A incorporação de partículas fluorescentes em matrizes poliméricas vem se destacando devido às facilidades e flexibilidade nos métodos de síntese, além disso, a elevada área superficial das micro/nanopartículas fornece uma excelente matriz para anexar moléculas

biológicas, enquanto que as propriedades fluorescentes destas partículas permitem detectá-las com alta sensibilidade (MA et al. 2013).

Esses materiais apresentam potencial aplicação na área biológica, como sensores, na imobilização enzimática e biomarcadores, uma vez que são menores que as células e têm tamanhos similares aos das moléculas biológicas, além das propriedades fluorescentes dos corantes orgânicos (LI et al. 2012).

As partículas fluorescentes podem ser incorporadas ao látex através de métodos *in situ*, no qual o corante é incorporado durante a síntese do polímero. Também através de métodos *ex situ*, onde o corante é incorporado em partículas de polímeros pré-formadas, através da fixação da superfície (marcação externa) ou do preenchimento do corante (rotulagem interna). Contudo, os métodos *ex situ* são mais sensíveis a migração do corante na matriz polimérica, esses defeitos podem ser originados da fraca interação entre o corante e as cadeias poliméricas (LI et al. 2012 e LEE et al. 2011).

Com a finalidade de reduzir a migração do corante na matriz polimérica e aumentar a solidez à luz, Gu e colaboradores prepararam o látex colorido através da encapsulação do corante hidrofílico com poliestireno, usando a polimerização em miniemulsão. Embora esses métodos tenham proporcionado estabilidade ao corante na matriz polimérica, a migração de corantes ainda pode ser observada após armazenamento a longo prazo (LI et al. 2012).

S. Sakuma et al. investigaram o encapsulamento da cumarina-6 em nanopartículas de poliestireno conjugadas com aglutinina de amendoim e poli (N-vinilacetamida), para o uso como uma sonda para detecção do câncer colorretal através da colonoscopia de fluorescência. O corante orgânico cumarina-6, assim como será discutido na seção 4.3, é um corante bastante aplicado como sondas ou marcadores biológicos porque possui elevada fluorescência, alta eficiência quântica, e ao ser encapsulado no núcleo da nanoesfera produz intensidade de fluorescência que é endoscopicamente detectável. Com essas partículas, o câncer colorretal pode ser detectado através de uma fluorescência de contraste entre os tecidos normais e os com câncer (SAKUMA et al. 2015).

Dessa forma, a combinação de corantes orgânicos fluorescentes e polímeros tem uso potencial como ferramenta de imagem na detecção precoce de doenças. Contudo, várias questões devem ainda ser abordadas para os testes clínicos.

3.2.3 Látex de poliestireno fluorescente e nanotubos de carbono

O látex de partículas de poliestireno, conforme discutido na seção 3.2.1, tem aplicações atrativas na área de biodiagnóstico e liberação controlada de fármacos (WU e CHEN, 2008). Ao incorporar aos nanotubos de carbono, nanopartículas de poliestireno fluorescentes podem ser produzidos materiais que possuem tanto as características das nanopartículas, quanto as dos nanotubos, o que amplia os campos de aplicações.

A ancoragem de nanopartículas poliméricas em nanotubos de carbono, assim como foi discutido na seção 3.1.2, pode ser realizada através de ligações covalentes e não covalentes. A modificação covalente envolve vários métodos de síntese, tais como polimerização *in situ*, polimerização radicalar e amidação. (SPITALSKY et al. 2010)

A modificação não covalente dos nanotubos de carbono diz respeito à adsorção e/ou acondicionamento de polímeros em sua superfície. As paredes laterais gráficas dos nanotubos de carbono oferecem interações de empilhamento π com polímeros conjugados, assim como polímeros orgânicos contendo heteroátomos com par de elétrons livres. Essa modificação preserva a parede lateral do nanotubos, assim como as suas propriedades. (SPITALSKY et al. 2010).

Outra abordagem relativamente recente para incorporar nanotubos de carbono em um polímero é a tecnologia do látex (WU e CHEN, 2008). Nesse método os nanotubos são incorporados após a polimerização do polímero. A primeira etapa do processo consiste na dispersão e estabilização dos nanotubos, que pode ser em solução aquosa ou em solvente orgânico. Depois, a dispersão dos nanotubos é misturada ao polímero na forma de látex, seguido pelo processo de secagem que pode ser por *casting* (moldagem) ou ainda por liofilização, seguida de fusão.

Wu e Chen (2008) e Junrong Yu et al (2007) produziram nanocompósitos de MWCNT-PS através da tecnologia do látex, onde foi observado que os MWCNTs estão bem dispersos e uniformemente distribuídos na matriz. Além disso, a condutividade dos MWCNT-PS é de quatro a dez ordens de grandeza superior comparada a do poliestireno puro, sendo que a dispersão máxima dos nanotubos está relacionada com o aumento da condutividade, transporte de carga e distribuição dos nanotubos na matriz polimérica.

Com relação à CNTs decorados não covalentemente com nanopartículas de poliestireno/cumarina em látex não foi encontrado pesquisas que discutam sobre sua síntese e propriedades.

3.3 Corantes orgânicos

O uso de corantes orgânicos em diversos materiais, principalmente como sensores tem muitas vantagens, uma vez que a toxicidade dos corantes orgânicos é baixa, também possui elevada fluorescência, alto rendimento quântico e um menor custo. Devido a estes fatores, foram utilizados corantes orgânicos fluorescentes da classe das cumarinas para atribuir aos nanotubos de carbono propriedades fluorescentes e consequentemente maior campo de aplicação.

3.3.1 Cumarinas

O primeiro composto da classe das cumarinas, também conhecida como benzopirona (Figura 6a) foi isolado por Vogel, em 1820, de vegetais da espécie *Coumarona odorata* (MIRANDA, 2001). É uma importante classe de corante orgânico com emissão na região espectral do violeta ao verde (VIJILA et al. 2001).

Muitos derivados de cumarina são fortemente fluorescentes com o seu rendimento quântico muitas vezes próximo da unidade (NEDUMPARA et al. 2007). Propriedades medicinais, como anticâncer, antioxidante, anticoagulante e anti-HIV também foram observadas em derivados de cumarinas. Devido ao alto rendimento quântico, diversas cumarinas são empregadas como meio ativo em lasers de corante e oferecem potencial para outras aplicações no campo da fotônica, como sondas biológicas, dentre outras. (VIJILA et al. 2001; SOUZA, 2014).

Neste trabalho foram utilizados os seguintes derivados de cumarinas: 3-(2-benzotiazolil)-7-dietilaminocumarina, (Cumarina 6); 3-(2-*N*-metilbenzimidazol)-7-*N,N*-dietilaminocumarina, (cumarina 30), cuja estruturas são mostradas, respectivamente, nas figuras 6b e 6c. Estes derivados possuem alta eficiência quântica, têm emissão dual com máximo de fluorescência aproximadamente em 500 e 570 nm, região do espectro correspondente ao azul-verde.

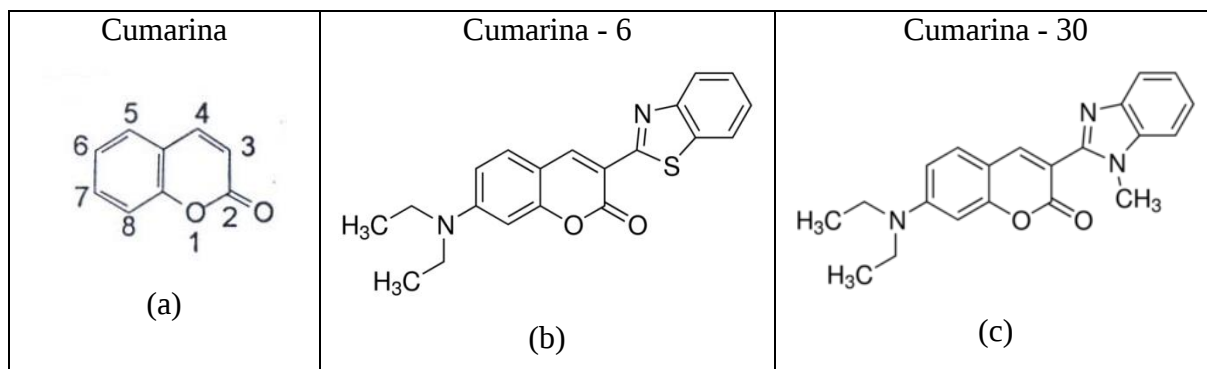


Figura 6: Estrutura da cumarina (a). Estrutura do derivado de cumarina-6 (b). Estrutura do derivado de cumarina-30 (c).

Devido as suas propriedades, as cumarinas 6 e 30 são utilizadas como laser de corante (NEDUMPARA et al. 2007), sondas fluorescentes (MAKWANA, JETHVA, e ROY, 2011), coletor de energia solar, dopante em OLED (diodo orgânico emissor de luz) (UDDIN, LEE, e ANDERSSON 2010), marcadores fluorescentes, entre outros. Esses corantes também são amplamente utilizados como sondas de fluorescência para a compreensão dos microambientes de diferentes meios heterogêneos. Além disso, também são utilizados para estudar a dinâmica de diferentes processos químicos e físico-químicos, como reações de transferência de elétrons, dinâmicas de solvatação, dinâmica rotacional. (SENTHILKUMAR et al. 2004).

3.3.2 Propriedades fotofísicas das cumarinas

As propriedades fotofísicas de um corante podem ser discutidas em termos do diagrama de Jablonski, que é o ponto de partida para o estudo sobre a absorção e emissão de luz para compostos orgânicos. No diagrama, representado na Figura 7, é possível observar os processos fotofísicos para os compostos moleculares.

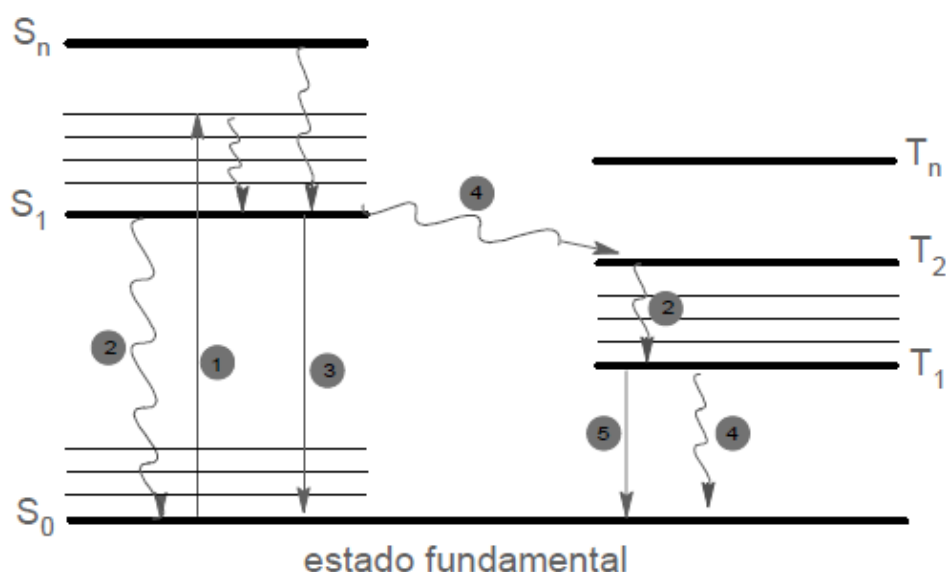


Figura 7: Diagrama de Jablonski, onde os processos fotofísicos são representados por (1) absorção de luz, (2) conversão interna (IC), (3) fluorescência (processo radiativo, com tempo da ordem de 10^{-9} s), (4) cruzamento entre sistemas (ISC) e (5) fosforescência (processo radiativo, com tempo da ordem de 10^{-6} s). Adaptado de Paula (2003).

No diagrama de Jablonski (Figura 7), os estados eletrônicos singlete fundamental, primeiro e segundo estados excitados são descritos por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente.

As transições eletrônicas entre estados são indicadas por linhas verticais, ilustrando a natureza quase instantânea da absorção e emissão de luz. A absorção da radiação eletromagnética ocorre em aproximadamente 10^{-15} s, um tempo muito curto comparado ao movimento nuclear. Dessa forma, a transição eletrônica mais provável será aquela em que não estão envolvidas mudanças nas coordenadas nucleares (UDDIN, LEE, e ANDERSSON, 2010). Essa transição é chamada de máximo de Franck-Condon (FC), e representa uma transição vertical no diagrama de energia potencial. O máximo de FC corresponde à sobreposição máxima entre a função de onda vibracional do estado fundamental e a função de onda do estado excitado (RIBEIRO, 2003).

Após a excitação eletrônica da molécula para um estado eletrônico superior ($n > 1$), a tendência usual é que haja desexcitação por conversão interna (IC), (2), até o primeiro estado singlete excitado. Esse processo envolve a desexcitação da molécula a partir dos níveis vibracionais que unem esses estados (DE PAULA, 2003).

A partir do primeiro estado excitado singlete, a molécula poderá fluorescer, (3), no qual o elétron preservará, no estado excitado, a multiplicidade que tinha no estado fundamental, permitindo um retorno ao estado fundamental mais rápido, com a emissão de um fóton. Essa

molécula também poderá desativar-se por conversão interna. Além disso, é possível, obter-se uma população de um estado triplete (T_n), desde que $E(T_n) \leq E(S_1)$, (4), e algumas restrições de simetria orbital sejam obedecidas. Esse processo ocorria por cruzamento entre sistemas (ISC), o qual é um processo de desativação vibracional que envolve a mudança de multiplicidade do spin eletrônico (LAKOWICZ, 2006).

A partir do estado triplete, se $n > 1$, a espécie excitada tende a perder vibracionalmente parte do excesso de energia por conversão interna, até atingir o estado T_1 . A partir desse estado, a molécula excitada pode desativar-se para o estado fundamental por dois caminhos: cruzamento entre sistemas e fosforescência (SOUZA, 2014).

A depender do tempo de vida dos estados S_1 e T_1 , outros processos podem ocorrer, tais como transferência de energia, transferência de elétron, etc., que podem levar à desativação da molécula ao estado fundamental, ou a transformações químicas, resultando em novas moléculas. Esses são chamados processo de supressão (DE PAULA, 2003).

3.3.3 Influência dos grupos substituintes nas propriedades fotofísicas das cumarinas

As características fotofísicas das cumarinas podem ser alteradas através da inclusão de substituintes no anel cumarínico, da polaridade do meio e do pH, com desvios da lei de Lippert-Mataga, devido a interações específicas com o solvente (DE MIRANDA, 2001).

A inclusão de grupos substituintes retiradores ou doadores de elétrons na benzopirona em determinadas posições altera as propriedades fotofísicas, tais como a intensificação ou diminuição da emissão de fluorescência (DE MIRANDA, 2001).

Ao incluir um substituinte retirador de elétrons na posição 3, o caráter fluorescente é intensificado. Este caráter também pode ser intensificado ao adicionar um substituinte doador de elétrons na posição 7. Além disso, a utilização desses substituintes nesta posição permite um deslocamento no máximo de absorção do composto (DE MIRANDA, 2001).

As cumarinas que possuem um substituinte dialquilamino na posição 7, como a cumarina 6 e a cumarina 30 (fig. 6b e 6c), tendem a apresentar características solvatocrômicas e fotofísicas não usuais. Essas cumarinas podem apresentar fluorescência dual. Tendo como um dos modelos mais aceitos para explicar a emissão dual, o modelo de Grabowski e colaboradores, no qual propõe a formação de um estado excitado fortemente polar (NEDUMPARA et al. 2007;

SATPATI et al. 2005; RAIKAR et al. 2006), resultado da rotação do grupo doador com relação ao grupo aceptor, com transferência de carga intramolecular e consequente desacoplamento eletrônico entre os dois grupos.

Devido a rotação, esse modelo, propõe que o estado S_2 passa a apresentar energia menor que a do estado S_1 , sendo o estado S_2 (com menor energia) conhecido como o estado de transferência intramolecular de carga torcido, ou do inglês, TICT.

3.3.4 Influência do meio para as propriedades fotofísicas das cumarinas

Além dos substituintes, os corantes de cumarina são sensíveis a polaridade dos solventes e a microambientes. Raikar et al. (2006) observaram um desvio da banda de transferência de carga de cerca de 01-33 nm no espectro de absorção, alterando o solvente a partir de etanol (λ_{abs} 457 nm) para *n*-hexano (λ_{abs} 425,8 nm). Os espectros de emissão mostram maior mudança em comparação com os espectros de absorção. Os pesquisadores acreditam que a mudança nos espectros de absorção menos pronunciada de acordo com o solvente é devido a distribuição de energia do estado fundamental ser menos afetada, possivelmente por causa da natureza menos polar dos corantes no estado fundamental ao invés do estado excitado (RAIKAR et al. 2006).

Os corantes de cumarina que possuem o grupo 7-dietilamino também apresentam comportamento incomum em certos solventes apolares. É relatado que os corantes adotam conformações diferentes deste grupo em solventes apolares e alguns outros (NEDUMPARA et al. 2007; SATPATI et al. 2005; RAIKAR et al. 2006). É observada uma relação linear entre o rendimento quântico e a polaridade do solvente em elevada e moderada polaridade, mas se desvia para valores mais elevados em solventes apolares (NEDUMPARA et al. 2007).

Para entender o comportamento da Cumarina 6 frente a solventes com diferentes polaridades, Satpati e col. (2005) realizaram estudos teóricos para prever a estrutura da Cumarina 6 no estado fundamental e excitado em fase gasosa. Nesse estudo, a estrutura otimizada da Cumarina 6 no estado fundamental indica que os dois grupos etilamino estão fora do plano da 1,2-benzopirona com ângulos diedros de $-67,3^\circ$ e $-23,0^\circ$. Uma vez que nenhuma interação dielétrica significativa é esperada em solventes apolares, é esperado que a estrutura de Cumarina 6 nestes solventes seja semelhante à fase gasosa, e assim suporta a atribuição da estrutura não planar (SATPATI et al. 2005).

Para estudar o efeito da polaridade do solvente na estrutura da Cumarina 6, a geometria molecular em fase gasosa foi reotimizada e incorporada 10 moléculas de água em volta da Cumarina 6. Com a inclusão deste efeito do solvente, os dois grupos etilamino apresentaram ângulos diedro de apenas $4,0^\circ$ e $-3,4^\circ$. A inclusão do efeito do solvente também aumenta o valor do μ_g (momento de dipolo no estado fundamental) do corante para 14,4 D a partir do seu valor de 6,0 D na estrutura isolada em fase gasosa. A partir desses resultados é sugerido que o corante Cumarina 6 adota conformações diferentes em seus grupos etilamino em solventes apolares (SATPATI et al. 2005).

Ao comparar os resultados com outros derivados de cumarina, que não possuem o grupo benzotiazol, foi sugerido que o grupo 3-benzotiazol de Cumarina 6 não tem qualquer influência significativa sobre as alterações observadas nas propriedades do corante em solventes apolares e outros (RAIKAR et al. 2006).

Além da polaridade, a constante dielétrica, índice de refração e consequentemente viscosidade do solvente também afetam a formação dos estados S_1 (LE) e S_2 (TICT). Sendo esses parâmetros relacionados pela lei de Lippert-Mataga, no qual se considera que a diferença do número de onda ($1/\lambda$) entre os estados fundamental e excitado é uma propriedade do índice de refração (n) e da constante dielétrica (ϵ). (DE PAULA, 2003)

Os desvios na Lei de Lippert-Mataga têm sido atribuídos a ligações de hidrogênio com o solvente e a formação de estados ICT e TICT. Satpati et al (2005) verificaram que na C6, os valores de K_F (constante de decaimento radiativo) e K_{nr} (constante de decaimento não radiativo), Φ_f (rendimento quântico) e τ_f (tempo de vida) variam quase linearmente com Δf (polarizabilidade do meio) para solventes de moderada a alta polaridade, no entanto em solventes apolares, todas essas propriedades se desviam bastante, o que também sugere um tipo de mudança estrutural para o corante sobre a alteração dos solventes para apolar (SATPATI et al. 2005).

Kaholek *et al* (2000) estudaram propriedades espectrais de derivados da cumarina substituídos na posição 3 em solventes de diferentes viscosidades e em matrizes poliméricas. No qual, verificaram que em solventes de baixa viscosidade estas substâncias exibem bandas largas e baixo rendimento quântico de fluorescência. Já em solventes de alta viscosidade e filmes poliméricos os rendimentos quânticos e tempos de vida de fluorescência são maiores (KAHOLEK, HRDLOVIC e BARTOS, 2000).

Com relação a cumarina 30, Senthilkumar et al. (2004) também analisaram o comportamento das propriedades fotofísicas frente a solventes com diferentes polaridades, e

também observaram os mesmos desvios discutidos para a cumarina 6, no qual o alto valor de μg (7.6 D) sugere que o estado fundamental da Cumarina 30 seja de natureza bastante polar. Os autores ainda indicam uma transferência de carga intramolecular (TIC) do grupo 7-NEt₂ para a fração 1,2-benzopirona. Já em solventes próticos de polaridade moderada a alta é observada que a ligação de hidrogênio intermolecular entre corante-solvente provoca aparentemente um aumento na diferença entre os momentos de dipolo do estado fundamental e do estado excitado.

3.3.5 Efeito nas propriedades fotofísicas a partir de variações do pH

As características espectrais dos corantes de cumarina podem sofrer alterações de acordo com pH. Com o intuito de estudar o comportamento dos ácidos em solventes orgânicos e o mecanismo de protonação da Cumarina 6, Mina, Puzyk, and Puzyk (2013) verificaram que os espectros de fluorescência em acetona, acetonitrila, butanol-1 e etanol são semelhantes.

No entanto, em acetona observou que existe algum intervalo de concentração dentro do qual a fluorescência da Cumarina 6 muda de forma semelhante com a adição de ácidos clorídrico, clórico e nítrico; ou seja, a intensidade do comprimento de onda máxima ($\sim 507\text{ nm}$) diminui de forma acentuada, enquanto que a intensidade do segundo máximo ($\sim 560\text{ nm}$) permanece quase constante (MINA, PUZYK, e PUZYK 2013).

Entretanto, foi observado que soluções de ácido acético em concentrações de 10^{-1} – 10^{-6} M não causam alterações pronunciadas no espectro de fluorescência da Cumarina 6, com exceção de uma ligeira mudança batocrômica, que, provavelmente é causado por ressolvatação de moléculas de Cumarina 6. Indicando que em ácido acético se comporta como um não-eletrólito nestes solventes. Segundo os autores, na molécula de Cumarina 6, cinco heteroátomos são centros de potenciais protonação. No entanto, em consonância com o grupo de Corrent (1998) é apenas o átomo de nitrogênio do anel tiazol, que sofre protonação, no qual o próton é transferido para o anel da benzopirona por ressonância.

Além disso, Corrent et al (1998) ainda afirmam que em concentrações acima de 10^{-3} M há a formação de excímeros e agregados, pela observação de uma banda adicional em 620 nm no espectro de fluorescência, que se desloca para o azul e diminui de intensidade, ao diluir a solução. No espectro de absorção, a banda desloca-se para o vermelho atribuída a formação de dímeros.

3.4 Quitosana

Neste trabalho a quitosana foi escolhida como suporte para formação de filmes de nanocompósitos de CNT/PS-Cumarina devido as suas interessantes propriedades e disponibilidade.

É um copolímero natural, composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a N-acetilglucosamina, distribuídas aleatoriamente ao longo da cadeia (Figura 8) (CHATTERJEE et al. 2005). A quitosana é obtida através da desacetilação da quitina presente em cascas de camarão, caranguejo e insetos, é insolúvel em água e o segundo polímero natural mais abundante (LI et al. 2010).

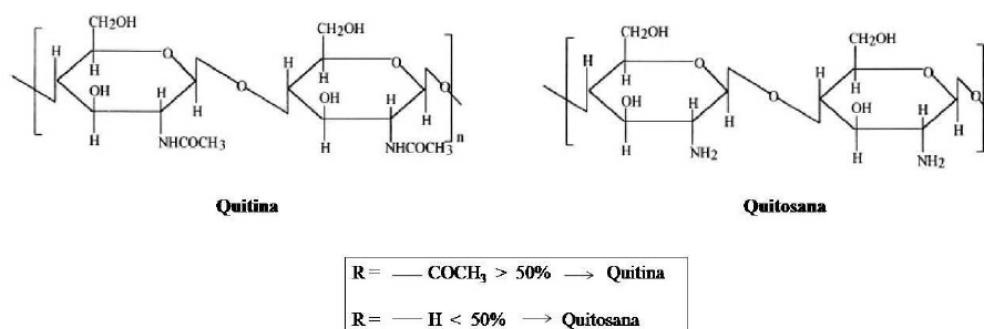


Figura 8: Estruturas químicas da quitina e da quitosana, retirado de Khor and Lim (2003).

Na desacetilação da quitina ocorre a substituição de grupo acetilas (COCH₃) por grupos aminos livres (-NH₂) que podem ser protonados em meio ácido (-NH₃⁺) tornando a quitosana solúvel em diferentes soluções ácidas. O grau de desacetilação da quitosana comercialmente disponível varia entre 70 e 95% e sua massa molar, entre 10 a 1000 kDa (MALAFAYA, SILVA, e REIS, 2007). Produzindo quitosanas com diferentes pesos moleculares e diferentes disposições dos grupos N-acetil residuais na cadeia do polímero. (ZHONG, SONG e LI 2011).

Segundo Regiel et al. (2013) a atividade antimicrobiana da quitosana é proporcional ao seu grau de desacetilação. Um alto grau de desacetilação indica que há um maior número de grupos protonados, os quais interagem com as paredes negativamente carregadas dos micro-organismos. Assim, a atividade antimicrobiana da quitosana é fortemente afetada pelo pH, sendo mais elevada em condições de baixo pH.

Uma vez que, em meio ácido, a quitosana, se comporta como um polieletrólito, por apresentar uma alta densidade de cargas positivas (uma por unidade de glicosamina), pode interagir com biomoléculas que apresentam cargas negativas, tais como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos e ácidos graxos (DALLAN, 2005).

3.4.1 Propriedades da quitosana

Desde a descoberta do grande potencial de aplicações, a quitosana vem sendo extensivamente estudada. Apresenta excelente biocompatibilidade; quase nenhuma toxicidade ao ser humano e animais; alta bioatividade; biodegradabilidade; reatividade do grupo amino desacetilado; permeabilidade seletiva; ação polieletrólítica; atividade antimicrobiana; habilidade em formar gel e filme; habilidade de quelação e capacidade adsortiva. (STAMFORD-ARNAUD, 2012)

Essas propriedades conferem a quitosana aplicabilidade em diversas áreas, tais como, carreador de fármacos de liberação gradual, regeneração de tecidos epiteliais, confecção de membranas artificiais, absorção de gordura e redução do colesterol sérico, componente de cosméticos, agente flocculante no tratamento de efluentes, agente antimicrobiano, formação de biofilmes, etc (FAI, STAMFORD e STAMFORD, 2008).

Além disso, no pH biológico a quitosana apresenta-se como um polícatión. Em meio ácido os grupos amino da quitosana captam íons hidrogênio do meio, resultando em uma carga global positiva no polímero. Esta característica permite a sua interação com moléculas carregadas negativamente tais como: gorduras, tecido animais ou vegetais, membrana celular, entre outras formas (STAMFORD-ARNAUD, 2012).

Outras características apresentadas pelos filmes à base de quitosana são as propriedades de barreira moderada ao oxigênio, boas propriedades de barreira ao dióxido de carbono, mas alta permeabilidade ao vapor de água, devido à sua natureza hidrofílica, (SANCHEZ-GONZALEZ et al. 2010) o que restringe a sua utilização.

O controle efetivo da transferência de água é uma propriedade desejável para a maioria dos alimentos (PEREDA, AMICA, e MARCOVICH, 2012). Essa limitação dos filmes de quitosana pode ser minimizada pela adição de aditivos hidrófobos tais como, nanotubos de carbono, ácidos graxos, lipídeos e agentes tensoativos (DIAS, 2013).

Além do mais, há a necessidade de se melhorar as propriedades térmicas, mecânicas e de barreira dos filmes de quitosana. Estratégias utilizando blendas de polímeros, adição de

plastificantes como a glicerina, nanopartículas de prata e nanotubos de carbono, têm sido usados para melhorar o desempenho de polímeros biodegradáveis, como a quitosana. (ZHONG, SONG, e LI, 2011)

A quitosana também é muito estudada como agente antimicrobiano. Numa matriz sólida de quitosana, tais como, filmes, fibras e hidrogéis, apenas são exibidos comportamentos antibacterianos, parcialmente na superfície microbiana através da reação de contato interfacial. O mecanismo de ação antibacteriana ainda não é totalmente esclarecido (RABEA et al. 2003), mas o modelo de interação fornece uma possibilidade de descrever as atividade antibacterianas da quitosana como um seguimento sequencial, onde inicialmente, ocorre uma série de interações física e bioquímicas, e depois a morte celular (KONG et al. 2008).

A massa da quitosana também influencia o mecanismo de atuação. Na quitosana com alto peso molecular, a quitosana dissociada pode interagir com a membrana da célula para alterar a permeabilidade celular, ou pode atuar como um agente quelante que se liga seletivamente aos metais traços e, assim, inibe a produção de toxinas e crescimento microbiano (KONG et al. 2008).

3.4.2 Nanocompósitos de quitosana e nanotubos de carbono

Assim como já foi discutido na sessão 3.1, os nanotubos de carbono são materiais ideais para o reforço em matrizes poliméricas, devido as suas excelentes propriedades mecânicas, além da alta condutividade térmica e elétrica, que podem ser atreladas às propriedades do polímero e produzir um material com alto desempenho e multifunções (WANG et al. 2005; Oh et al. 2015). A quitosana, por sua vez possui inúmeras vantagens, utilizada em vários campos, como tratamento de água, membranas de separação, embalagem de alimentos, engenharia de tecidos e entrega de drogas. Com a adição de nanotubos de carbono em sua estrutura a permeabilidade ao vapor de água diminui, além de aumentar as suas propriedades mecânicas, o que amplia suas aplicações (WANG et al. 2005; OH et al. 2015).

Dos vários métodos de processamento disponíveis para fabricação de nanocompósito CNT/polímero baseados em polímeros termoplásticos ou termofixos, a mistura de soluções, polimerização *in situ*, mistura de processos de fusão e modificação química são os mais utilizados. De forma geral, os métodos de processamento de soluções incluem a dispersão do CNT em um líquido, por meio de agitação vigorosa e/ou sonicação, mistura da dispersão de CNT com uma solução de polímero, e consequentemente evaporação do solvente com ou sem

condições de vácuo em um molde adequado (SPITALSKY et al. 2010). Para quaisquer metodologias utilizadas na síntese de nanocompósitos, são formados produtos com propriedades superiores aos materiais puros.

Wang et al. (2005) produziram nanocompósitos através do método de mistura de dispersões, no qual observaram que a adição de MWCNTs melhora significativamente as propriedades de tração da matriz de quitosana, as propriedades mecânicas aumentam com o aumento do carregamento de MWCNTs. Essa melhoria é resultante da compatibilidade e a forte interação entre os enchimentos de MWCNT e a matriz, aumentando a dispersão, bem como a adesão interfacial.

Com apenas 0,4% em peso de MWCNT, o módulo de tração do nanocompósito aumenta drasticamente em cerca de 78% em comparação com os filmes sem MWCNT. Eles ainda observaram que a medida que o nível de carga de MWCNTs aumenta para 0,8% em peso, o módulo de resistência à tração e a resistência do composto de quitosana/MWCNTs são reforçados em cerca de 93% e 99%, respectivamente. No entanto, em concentrações mais alta de MWCNTs há maior tendência em formar agregados dentro da matriz, devido a isso o módulo de tração só aumenta ligeiramente, enquanto a resistência à tração mantém-se estável. (WANG et al. 2005).

Os mesmos pesquisadores ainda afirmam que esse melhoramento nas propriedades pode ser devido ao efeito do reforço dos MWCNTs de alto desempenho, finamente dispersos ao longo da matriz de biopolímero, além da forte interação entre MWCNTs funcionalizados e a matriz de quitosana. Uma vez que os MWCNTs tratados com ácido contêm muitos defeitos e grupos hidrofílicos, tais como -OH e -COOH, que são muito úteis para melhorar a dissolubilidade de MWCNTs na água.

A quitosana, um biopolímero hidrofílico, possui três tipos de grupos funcionais, amino, e grupos hidroxilo primários e secundários, em uma unidade de glucosamina, que podem formar uma forte ligação de hidrogênio entre quitosana e MWCNTs. A compatibilidade e a forte interação entre os enchimentos MWCNT e a matriz do polímero aumentam muito a dispersão, bem como a adesão interfacial, aumentando significativamente as propriedades mecânicas da matriz (WANG et al. 2005).

Os nanocompósitos MWCNT/quitosana também apresentam um aumento da condutividade elétrica em várias ordens de grandeza em limiares de percolação muito baixos (<0,1% em massa) de CNTs em matrizes poliméricas sem comprometer outros aspectos de desempenho dos polímeros, como seu baixo peso, clareza óptica e baixas viscosidades de fusão.

A presença da rede de nanotubos interligados resulta em um aumento dramático de sua condutividade elétrica nesses compósitos. No entanto, numerosos estudos mostram que o limiar de percolação e a condutividade dependem fortemente do tipo de polímero, método de síntese, proporção de nanotubos de carbono, presença de nanotubos aglomerado, sua distribuição uniforme e o grau de alinhamento.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e reagentes

Tabela 1: Materiais e reagentes utilizados durante o trabalho.

Materiais/Reagentes	Marca	Pureza
Nanotubos de carbono de múltiplas paredes	-	-
Nanotubos de carbono de múltiplas paredes dopados	-	-
Quitosana	Sigma Aldrich	93,0 %
Glicerina	Dinâmica	99,5%
Metanol	Neon	99,8%
N,N-Dimetilformamida	Sigma Aldrich	99,8
Ácido acético	Sigma Adrich	99,7 %
Água deionizada	-	-
Ácido clorídrico	ACS Fmaia	37,0 %

Síntese dos nanotubos de carbono utilizados neste trabalho

Em todo estudo aqui descrito foram utilizadas amostras de MWCNT e nanotubos de carbono dopados com nitrogênio (CNx) sintetizadas pelo processo de pirólise em aerossol, cuja rota de síntese foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa (NyN-IPICYT, SLP-MEX) no laboratório de Nanoestruturas de Carbono baixo assessoria dos professores I. Vega-Cantú.

A partir dos métodos relatados por Meneses-Rodrigues et al. (2010), Kamalakaran et al. (2011) e Navarro et al. (2008), o processo de pirólise em aerossol envolve o uso de soluções precursoras de carbono e partículas metálicas. Para a produção de MWCNT esta mistura é dissolvida em tolueno e para os CNx-MWCNT utiliza-se a benzilamina. O aerossol é formado em um tubo de quartzo localizado dentro de um sistema de dois fornos aquecido a 850 °C, durante 30 minutos. Os MWCNTs e CNx sintetizados são depositados na parede do tubo, e têm diâmetro na ordem de 40 nm-70 nm e comprimento 10µm -20 µm.

É importante ressaltar que todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados tanto para os MWCNTs quanto para os CNx. Portanto, ao utilizar o termo CNTs refere-se à utilização de ambos os nanotubos nos procedimentos.

4.2 Processo de purificação dos nanotubos de carbono

Dentre os vários processos de purificação analisados, o que apresentou melhores resultados foi o método descrito abaixo e foi o método utilizado em todos os procedimentos de purificação. Para o processo de purificação escolhido foram utilizadas duas etapas, a primeira etapa teve como objetivo a remoção parcial do carbono amorfo, uma vez que ao retirá-los, as espécies metálicas ficam mais expostas, facilitando a sua oxidação numa segunda etapa de digestão ácida. Conforme, mostrados no esquema abaixo (Figura 9).

Na primeira etapa os CNTs foram ultrasonificados, usando ponta ultrassônica durante 12 h, com amplitude de 30%, com pulsos operando em 9 segundos *on* e 5 segundos *off*. Após o término da ultrasonicação, a nata formada na superfície, conhecida como carbono amorfo, foi removida com espátula e em seguida a mistura foi filtrada, sob vácuo, em membrana de nylon (Millipore) com tamanho do poro de 0,45 μm e seco em estufa à vácuo numa temperatura de 100 °C durante a noite.

Na segunda etapa da purificação foram adicionados 200 mg de CNT a um balão de fundo redondo de 500 mL contendo 500 mL de uma solução de ácido clorídrico (HCl) 6 M. O balão foi acoplado a um condensador de bolas com água circundante e, com o auxílio de uma manta aquecedora, foi realizado o refluxo da mistura durante 6 horas numa temperatura de 100 °C. Em seguida, a mistura foi filtrada, sob vácuo, em membrana de teflon (Millipore) com tamanho de poro de 0,45 μm e lavada com água destilada até pH próximo da neutralidade. Os CNTs foram secos em estufa a vácuo numa temperatura de 100 °C.

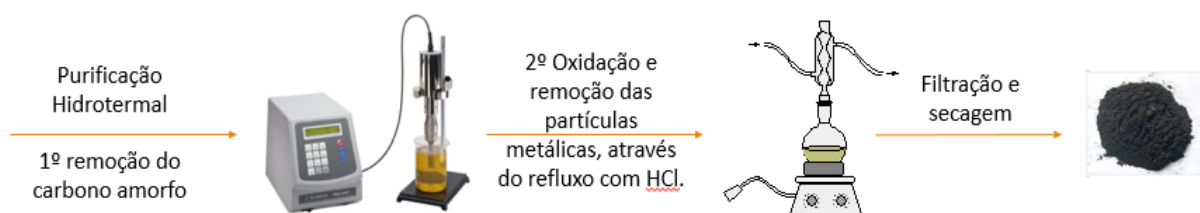


Figura 9: Procedimentos de purificação dos CNTs.

4.3 Processo de funcionalização para os nanotubos de carbono

Na funcionalização não covalente foram utilizadas amostras de CNx e MWNT, seguindo o método proposto pela patente intitulada de “processo para obtenção de nanocompósitos decorados formados por nanoestruturas de carbono com látex ou látex luminescente” depositada em 2016.

4.4 Síntese de látex de nanopartículas de poliestireno com cumarina

As nanopartículas de poliestireno/cumarina foram sintetizadas através do método de minemulsão. Para um melhor estudo do comportamento da fluorescência, foram utilizadas as cumarina 6 e cumarina 30, no qual foram formadas, respectivamente, as nanopartículas PS/C-6, PS/C-30.

Estas nanopartículas foram sintetizadas por Sidicleia Bezerra, também vinculada ao laboratório de Compostos híbridos Interfaces e Coloídes, localizado no Departamento de Química Fundamental – UFPE.

4.5 Decoração de nanotubos de carbono com látex de nanopartículas de poliestireno/cumarina

Os nanotubos de carbono CNx e MWCNT foram decorados com nanopartículas de poliestireno/cumarina através da mistura das dispersões. Nesta etapa do processo foram dispersos 5 mg de CNTs funcionalizados em 5mL de dimetilformamida (DMF) durante 1 hora em banho ultrasônico. Em seguida, 50 mg de nanopartículas de poliestireno/cumarina (PS/C-6 e PS/C-30) foram dispersas em 5 mL de água deionizada durante 2 horas em banho ultrassônico, seguido por agitação magnética durante 1 hora.

Posteriormente, as dispersões do látex foram misturadas à dispersão de CNT e levada ao banho ultrassônico durante 1 hora. Em seguida, a mistura foi agitada mecanicamente e aquecida até 45 °C, em banho de silicone para uniformizar a temperatura, durante até 120 horas.

Em seguida, as dispersões foram transferidas para tubos *eppendorf* e centrifugadas durante 30 minutos a 15.000 RPM para remoção do excesso de DMF e partículas de poliestireno. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes, e depois, foi deixado secar em dessecador.

Nessa etapa foram produzidas 6 amostras para cada tipo de CNT (CNx e MWCNT) decorrentes da variação do tempo utilizado na decoração dos CNTs, e considerando apenas um tipo de nanopartícula. As condições experimentais utilizadas nas sínteses estão resumidamente na Tabela 2.

Tabela 2: Condições experimentais para ancoragem de nanotubos de carbono

Amostra	CNT	PS/C6	Tempo
1	MWCNT – 5 mg	50 mg	6 h
2	MWCNT – 5 mg	50 mg	24h
3	MWCNT – 5 mg	50 mg	48h
4	MWCNT – 5 mg	50 mg	72 h
5	MWCNT – 5 mg	50 mg	96 h
6	MWCNT – 5mg	50 mg	120 h
7	CNx – 5 mg	50 mg	6 h
8	CNx – 5 mg	50 mg	24 h
9	CNx – 5mg	50 mg	48 h
10	CNx – 5 mg	50 mg	72 h
11	CNx – 5 mg	50 mg	96 h
12	CNx – 5mg	50 mg	120 h

Após análises de Raman e microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi selecionado o melhor tempo de agitação para ancoragem de nanopartículas nas superfícies dos nanotubos. Neste trabalho foi escolhido o tempo de 72 horas, e consequentemente esta etapa foi repetida para todas as nanopartículas (PS/C-6 e PS/C-30), mantendo todos os outros parâmetros citados a cima.

Resumidamente, todo o processo descrito anteriormente para a decoração dos CNTs com látex de nanopartículas de poliestireno/cumarina é apresentado no esquema abaixo (Figura 10).



Figura 10: Representação da decoração dos CNTs com látex de nanopartículas de poliestireno/cumarina

4.6 Síntese de nanocompósito de nanotubos de carbono e quitosana

Após a ancoragem das nanopartículas na superfície dos nanotubos, os nanocompósitos de CNT-PS-C/quitosana, em forma de filmes, também foram sintetizados a partir da mistura das dispersões.

Os filmes a base de quitosana foram preparados de acordo com Zhong et al (2011), com algumas modificações. A solução filmogênica de quitosana foi preparada dissolvendo 1,5 g de quitosana em 80 mL de solução de ácido acético 2% (v/v) e deixada em agitação, utilizando um agitador magnético à temperatura ambiente (24 °C) durante 24 horas. Em seguida foi adicionada 0,3% de glicerina¹ e mantida a solução em agitação por mais 1 hora. A solução foi mantida em repouso para decantação da quitosana não solubilizada. Esta solução foi utilizada para o desenvolvimento de todos os filmes. Para futuras dispersões de CNT/PS-C foram reservados 20 mL da solução de ácido acético preparada para solubilizar a quitosana.

Amostras de CNT/PS-C foram dispersas em 2 mL da solução de ácido acético (2%), reservada previamente. Esta dispersão permaneceu em banho ultrassônico durante 2 h. Em seguida, a dispersão de CNT/PS-C foi vertida em 8 mL de solução filmogênica de quitosana, sob agitação magnética durante 3 horas. Depois, a mistura foi levada ao banho de ultrassom por mais 1 hora, que além de auxiliar na etapa de mistura, serve também para a remoção das bolhas formadas durante o processo de agitação.

Finalmente a mistura foi colocada em um molde de material plástico (2,5x2,5cm), conectado a uma placa de aquecimento numa temperatura de 35 °C até a completa secagem do

¹ O percentual de 0,3% de glicerina foi escolhido após um estudo comparativo entre diferentes quantidades de glicerina (0,3%, 0,5% e 1,0%). Com 0,3% de glicerina foi obtido um filme parcialmente elástico e com relativa resistência.

material. O protocolo usado na preparação dos nanocompósitos está representado na Tabela 3. Para estudo comparativo das propriedades dos filmes foram utilizados diferentes percentuais de CNT/PS-C na formação dos filmes, resultando em sete diferentes filmes, que serão listados na Tabela abaixo.

Após completa evaporação do solvente, os filmes foram removidos das placas e separados por folhas de papel branco, estocados em sacos plásticos em temperatura ambiente para análises posteriores. Foram produzidos filmes com concentrações diferentes de CNT/PS-C, 0,03 e 0,1 m/m, sendo que o filme controle (0 %) foi representado pelo filme de quitosana sem a incorporação das nanopartículas. A espessura de cada filme foi obtida pela média de aferições tomadas em 6 diferentes pontos do filme, ao acaso, utilizando micrômetro Mitutoyo (0-25 mm).

Tabela 3: Condições de preparo para as amostras de nanocompósitos.

Amostra	Compósito	Massa de CNT (mg)	Massa de Quitosana* (g)
Quitosana	-	-	9,47
MW/C6-3	MWCNT - PS/C6	3 mg	9,47
MW/C6-10	MWCNT – PS/C6	10 mg	9,47
MW/C30-3	MWCNT – PS/C30	3 mg	9,47
MW/C30-10	MWCNT – PS/C30	10 mg	9,47
CNx/C6-3	CNx- PS/C6	3 mg	9,47
CNx/C6-10	CNx – PS/C6	10 mg	9,47
CNx/C30-3	CNx – PS/C30	3 mg	9,47
CNx/C30-10	CNx – PS/C30	10 mg	9,47

* A massa da quitosana apresentada corresponde a massa de 10 mL da solução de quitosana, que inclui solução de ácido acético e glicerina.

4.7 Métodos de caracterização

4.7.1 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica importante e amplamente usada para identificar a desordem da rede sp^2 de diferentes estruturas de carbono.

Os espectros Raman foram obtidos num equipamento modelo Alpha 300s acoplado a um microscópio óptico (e detector). Para os nanotubos de carbonos *pristine*, purificados e funcionalizados foi utilizado comprimento de onda de 532 nm, com uma potência de 63 mW e um tempo de aquisição de 10 s. Os espectros de nanotubos de carbono decorados com poliestireno/cumarina foram obtidos utilizando o laser com comprimento de onda de 633 com uma potência 28 mW e tempo de aquisição de 10s, devido à alta fluorescência apresentada pela amostra. Para uma melhor análise, em todos os ensaios, foram obtidos 3 espectros de diferentes regiões da amostra. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LAMM) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE.

4.7.2 Infravermelho com Transformada de Fourier

Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para analisar a eficiência dos procedimentos realizados nos nanotubos de carbono, através das alterações da interação intermoleculares entre os materiais. As amostras foram caracterizadas em um equipamento IRTracer – 100 (Shimadzu), no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando resolução espectral de 4 cm^{-1} , em modo de transmissão. Para cada espectro foram acumuladas 128 varreduras. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e mantidas sob o vácuo. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Polímeros Não Convencionais – do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco.

4.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão utilizado foi um Tecnai G² da marca FEI, operando com tensão de aceleração de elétrons de 200 kV, localizado Laboratório de Microscopia e Microanálise (LAMM) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE. As amostras analisadas foram dispersas em iso-propanol e gotejados diretamente no

grid (holley carbono de 300 mesh, Fed Pella). As telas contendo as amostras foram secas à temperatura ambiente, sob atmosfera de ar, e foram analisadas posteriormente.

4.7.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos filmes, das nanopartículas e a estrutura celular das bactérias foram avaliadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio, modelo Quanta 200 FEG FEI, operando em alto vácuo, disponível no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE.

Para as análises, as amostras de filme e as nanopartículas (dispersas em álcool isopropílico) foram fixadas em um stub apropriado, com o auxílio de uma fita condutora de carbono, e metalizadas através da deposição de uma fina camada de ouro em sua superfície, aproximadamente 20 nm de espessura. Para a avaliação da secção transversal dos filmes, as amostras foram criofraturadas em nitrogênio líquido antes de sua metalização.

Para análises da superfície dos filmes em contato com os microrganismos, os mesmos foram preparados de forma adequada, através da utilização de solução fixadora, tratamento de pós-fixação, desidratação, secagem em ponto crítico, fixação em stub e metalização.

4.7.5 Capacidade de absorção dos nanocompósitos

A capacidade de absorção dos filmes foi determinada por meio do grau de intumescimento paulatino em água deionizada. Para os ensaios de intumescimento, amostras com cerca de 0,8 cm x 2,0 cm e 0,7 mm de espessura foram recortadas e suas dimensões foram medidas com um micrômetro Mitutoyo e a massa foi pesada em balança analítica. O solvente escolhido foi a água. A massa inicial das amostras foi determinada antes da imersão em 10 mL de água deionizada. Após 24 h da imersão, o excesso de solvente da superfície do filme foi removido com papel filtro. Depois, a amostra foi submetida à pesagem em balança analítica, para a determinação das massas úmidas finais (M_u). Todo o procedimento foi realizado em duplicata. A capacidade de absorção (A) para cada filme foi calculada através da Equação 1:

$$A = \frac{(M_u - M_i)}{M_i}$$

Onde M_i corresponde a massa seca inicial.

4.7.6 Potencial Zeta

A medida do potencial Zeta fornece informações sobre a carga superficial das nanopartículas, que é uma característica importante para avaliar a presença de carga disponível para ligações com outros materiais. Estas cargas mudam com a variação dos parâmetros experimentais e através deste potencial pode-se medir a magnitude das interações repulsivas entre partículas e avaliar a estabilidade destas em solução. O potencial Zeta para cada amostra foi medido em triplicata.

4.7.7 Espectroscopia de absorção no UV-visível

As análises de absorção na região do UV-Vis foram realizadas utilizando-se uma cubeta retangular de quartzo em um espectrofotômetro da Ocean Optics modelo DH-2000 com lâmpadas de deutério e tungstênio. As medidas foram realizadas em modo de refletância para as amostras.

4.7.8 Espectroscopia de emissão

Os espectros de emissão e excitação das cumarinas C6 e C30 encapsuladas nas nanopartículas de poliestireno foram registrados utilizando o equipamento Horiba Fluorolog. Inicialmente foi feito um mapa de excitação, através do comprimento de onda de absorção, em seguida, os espectros de emissão foram obtidos através do comprimento de onda máximo de excitação, que foi considerado 395 nm.

Os espectros foram obtidos através das amostras em pó ou em filmes, no qual foram fixadas adequadamente através de fitas de carbono em temperatura ambiente.

4.7.9 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) é uma técnica poderosa fundamentada na aplicação de um estímulo elétrico (contínuo) fixo (uma voltagem ou corrente conhecida) ao eletrodo de trabalho, onde adicionalmente é sobreposto outro estímulo elétrico (alternado) de amplitude fixa e frequência variante com o tempo. Esta abordagem permite se

observar a impedância (resposta) frente a perturbação alternada realizada num extenso intervalo de frequência. (SILVA, 2013)

Assim, torna-se necessário definir certos termos que são de comum uso na EIE. Impedância (Z): Resistência genérica a passagem de corrente elétrica que reúne tanto uma resistência pura “R” (ôhmica, independente da frequência), apresentada por elementos resistores, quanto uma reatância “X” (resistência que é dependente da frequência aplicada ao sistema) apresentada por elementos indutores, capacitores. (SILVA, 2013)

Embora ambas as resistências e a reatâncias sejam de caráter físico real, a teoria de números complexos é amplamente empregada para o estudo de EIE. A impedância no plano complexo é representada pela seguinte expressão genérica:

$$Z = Z' - jZ''$$

Onde:

Z' = componente real que incorpora as resistências ôhmicas.

Z'' = componente imaginário que incorpora as reatâncias, juntamente com j.

Assim, toda a álgebra desenvolvida para o estudo dos números complexos se aplica nos estudos de EIE.

Os resultados obtidos são demonstrados através do diagrama de “Nyquist” ou diagrama de impedância. O diagrama é um plano complexo (real imaginário) de coordenadas cartesianas, em que se tem na abscissa a parte real (termos resistivos) e na ordenada a parte imaginária (termos capacitivos ou indutivos).

Para a realização destas medidas foi utilizado o Impedanciometro Solarton modelo 1260 Impedance/Gain phase Analyser, que permite a aplicação de uma amplitude de tensão de 0 a 3V num intervalo de frequência de 1 Hz a 1 MHz. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Polímeros Não Convencionais – do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco, pelo doutorando Romário Justino da Silva.

4.8 Ensaios microbiológicos

Os testes microbiológicos foram realizados para determinar se os filmes de quitosana, assim como as nanopartículas de PS/Cumarina adsorvidas aos CNTs são capazes de inibir o

crescimento de bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli*) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*).

Além de analisar a interação/crescimento da *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* com a superfície dos filmes, ambas bactérias Gram-negativas e as principais bactérias identificadas em surtos de doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2017). As análises foram realizadas em colaboração com a doutoranda Tayane Mendes no Laboratório de Bioprocessos, no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE.

4.8.1 Método de difusão em Ágar

A atividade antibacteriana dos filmes foi determinada utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) Gram-positiva, e *Escherichia coli* (ATCC 25922) Gram-negativa, pelo método de difusão em Ágar, e comparados a sua eficiência com antibiótico. O meio de cultura utilizado nas placas de petri foi o ágar PCA (padrão para contagem), e após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h.

Amostras dos filmes, com diâmetro de 1,2 cm e o antibiótico foram depositados assepticamente sobre a superfície dos meios inoculados, os quais foram incubados a 37 °C por 24 h. Após a incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento bacteriano e, nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido com auxílio do software ImageJ® a partir das imagens das placas. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados apresentados correspondem aos valores médios. Os filmes foram esterilizados através de radiação ultravioleta.

4.8.2 Avaliação do comportamento dos filmes em contato com soluções de microrganismos

Esta análise tem o objetivo de analisar a fluorescência dos filmes em contato com *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, assim como a interação desses microrganismos com a superfície dos filmes. Amostras de filmes esterilizadas, com luz UV, foram submersas em soluções de ambas as bactérias com concentrações 10^6 , 10^4 e 10^2 UFC/mL, e retirados após 1h e 24 h de contato. Todos os parâmetros estão listados na tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros analisados para filme MWCNT/C6-3 em contato soluções de microrganismos.

Amostra	Micro-organismo	Concentração	Tempo em contato
			com a solução
MW/C6-3	<i>E.coli</i>	10^2	1 h
	<i>E.coli</i>	10^2	24 h
	<i>E.coli</i>	10^4	1 h
	<i>E.coli</i>	10^4	24 h
	<i>E.coli</i>	10^6	1 h
	<i>E.coli</i>	10^6	24 h
	<i>Salmonela</i>	10^2	1 h
	<i>Salmonela</i>	10^2	24 h
	<i>Salmonela</i>	10^4	1 h
	<i>Salmonela</i>	10^4	24 h
	<i>Salmonela</i>	10^6	1 h
	<i>Salmonela</i>	10^6	24h

Assim como foi ilustrado, na Tabela 4, para o filme MWCNT/C6-3, o mesmo procedimento foi realizado para os filmes MWCNT/C6-10, MWCNT/C30-3, MWCNT/C30-10. Dessa forma, para cada filme foram originadas 12 amostras, resultando em 48 filmes.

Após a retirada dos filmes das soluções de bactérias, estes foram colocados em tubos eppendorf com 1 mL de solução de fixador, uma solução com de Glutaraldeído (2,5%) em tampão Cacodilato de sódio (0,1M) e mantidas em refrigeração, esta solução fixadora tem a função de preservar a estrutura dos microrganismos e impedir o crescimento das células nos filmes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, com o foco na preparação de filmes de nanotubos de carbono-quitosana, caracterização e avaliação das propriedades dos filmes de quitosana puro, diferentes percentuais de nanotubos de carbono e corantes orgânicos.

5.1 Processo de purificação e funcionalização dos nanotubos de carbono

Os CNTs utilizados nesse trabalho apresentam como característica principal a presença de ferro metálico e outras estruturas de carbono inseridas nas cavidades dos tubos. Ao realizar os processos de purificação por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_4\text{OH}$, proposto por Datsyuk et al. (2008) e o tratamento com $\text{H}_2\text{H}_2/\text{HCl}$, elaborado por Wang et al. (2007), foi observado, através de micrografias de MET (dados não apresentados) que os CNTs estavam com bastante carbono amorfo e partículas metálicas em sua estrutura.

Sabe-se que o processo ideal de purificação tem o objetivo de eliminar as outras formas de carbono e resíduos metálicos, sem afetar, significativamente, as propriedades das paredes dos CNTs. Este tipo de tratamento visa a obtenção de dispersões adequadas permitindo a formação de nanocompósitos mais homogêneos. Nesse caso, é necessário que a purificação seja realizada em duas etapas, tendo como objetivo a remoção de carbono amorfo na primeira etapa e a remoção de partículas metálicas na segunda.

Nesse trabalho, a remoção parcial do carbono amorfo foi conseguida através da forte sonicação durante 12 horas, através desta sonicação as moléculas dos solventes são capazes de interagir com os CNTs, levando a uma diminuição da interação tubo-tubo e consequentemente os CNTs vão sendo dispersos na solução (Y. WANG et al. 2007). Devido a uma diferença de densidade, o carbono amorfo e outros produtos da síntese vão sendo depositados na superfície do béquer, formando uma nata, na qual foi retirada com o auxílio de uma espátula.

Após a filtração e secagem, foi realizado o refluxo com ácido clorídrico (HCl), um oxidante fraco que não cria defeitos sobre a superfície dos tubos, mas que remove as partículas metálicas até certa extensão limite. Nessa etapa o HCl dissolve as nanopartículas de ferro presente nos NTCs, após sua exposição e consequentemente o surgimento de íons ferrosos

formados durante a oxidação dos NTCs, caracterizado pela coloração amarela da solução ácida. (HOU, LIU e CHENG 2008) e (CHIANG et al. 2001).

A partir das micrografias de MET foi possível observar que a estrutura dos CNTs não foi danificada, assim como o carbono amorfo foi removido, também foi observado que as partículas metálicas não foram completamente retiradas, o que já era previsto através da escolha de um oxidante fraco. Os MWCNTs e CNx funcionalizados não tiveram as paredes danificadas de forma significativa, no entanto foi observado a abertura em algumas partes das paredes laterais e extremidades dos nanotubos devido a funcionalização.

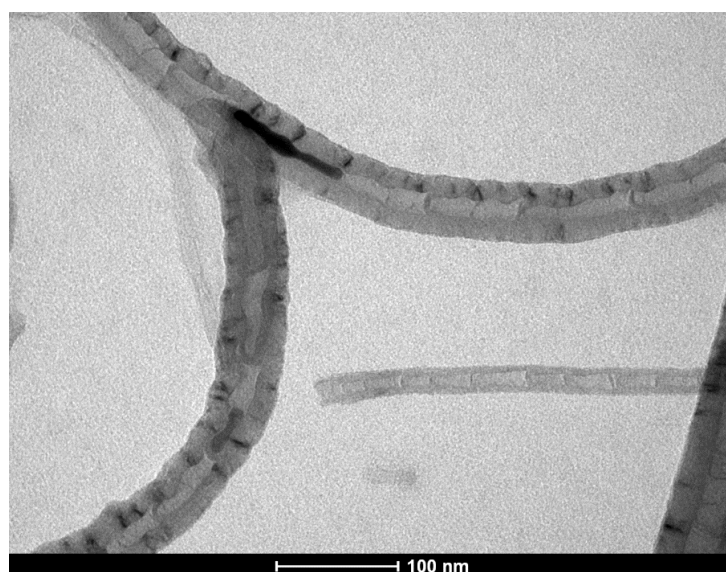


Figura 11: Micrografia de CNx funcionalizados.

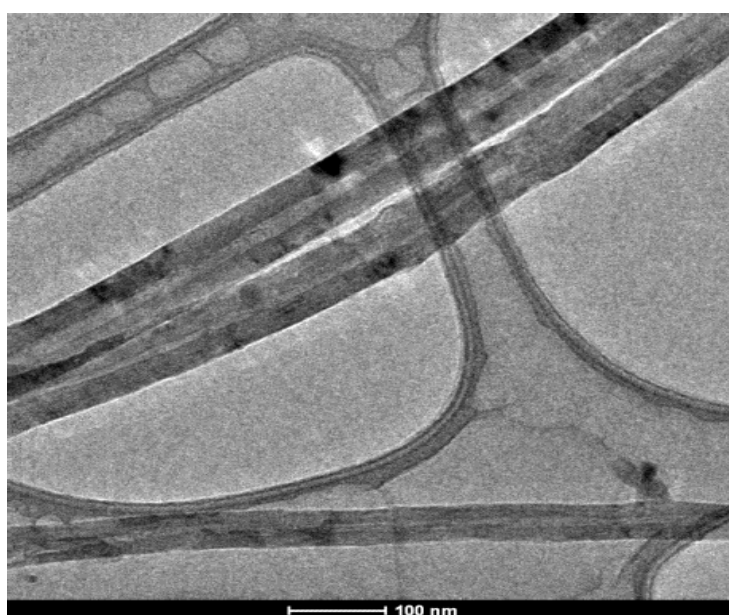


Figura 12: Micrografia de MWCNT funcionalizados

A partir dos espectros Raman para as amostras de CNx (Figura 13) e MWCNTs (Figura 14), pode-se observar a presença de bandas características para os nanotubos de carbono. A primeira banda, em torno de 1350 cm^{-1} chamada de banda D se refere a relaxação induzida por defeitos (heteroátomos, vacâncias, carbonos com hibridização diferentes dos átomos da rede, entre outros). A segunda banda, em torno de 1580 cm^{-1} , a banda G, é associada à vibração entre dois átomos de carbono vizinhos no plano, ou seja, está relacionada ao grau de cristalinidade e simetria dos nanotubos (GEORGAKILAS et al. 2014) e (KRUEGER, 2010).

A qualidade dos CNTs pode ser avaliada a partir da razão das intensidades entre as bandas D e G. Com isso, pode-se observar que os CNx's *pristine* (sem tratamento) possuem uma relação I_D/I_G de 0,72 que se refere a presença de carbono amorfo, átomos de nitrogênio introduzidos na dopagem, além de outros defeitos. Após a purificação é observada que há uma diminuição desta relação, que pode ser associada a retirada de carbono amorfo. No processo de funcionalização também há favorecimento da organização da estrutura, pode-se observar que em todos os procedimentos realizados a relação I_D/I_G sofreu redução, indicando que a estrutura dos CNx está sendo ordenada em cada processo, com um aumento da cristalinidade e eliminação do carbono amorfo.

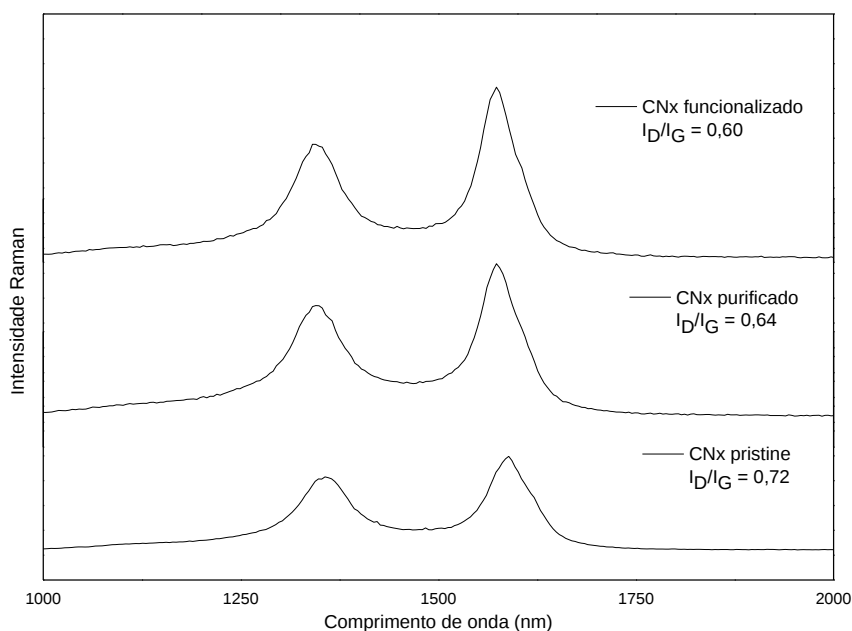


Figura 13: Espectro Raman de CNx funcionalizados

Com relação aos espectros Raman dos MWCNTs (Figura 14), pode-se observar que a relação das intensidades I_D/I_G é consideravelmente menor do que a apresentada pelos CNx, pois

a presença de heteroátomos aumenta o grau de desordem (HE *et al.* 2005). Além disso, é observado que os picos dos MWCNTs são mais estreitos, o que indica uma melhor cristalização dos nanotubos ou um tamanho maior do cristal e, conseqüentemente, um menor grau de desordem. É possível observar que os procedimentos realizados nos MWCNTs também favoreceram a organização da estrutura, uma vez que a intensidade I_D/I_G dos MWCNTs funcionalizados é menor que os *pristine*.

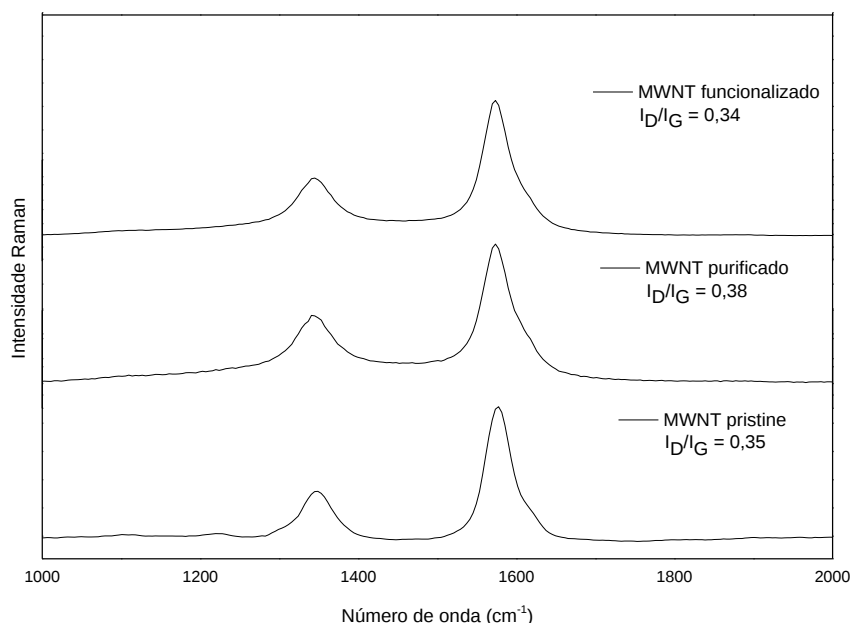


Figura 14: Espectro Raman dos MWCNT *pristine*, purificados e funcionalizados.

A partir dos espectros de FTIR (Figura 15) dos CNx *pristine* pode-se observar os modos vibracionais associados as ligações C=C em 1552 cm^{-1} . Além disso, são observadas bandas que podem ser associadas a grupos funcionais adsorvidos sobre os tubos, tais como, aldeídos em 1702 e 1380 cm^{-1} , relacionados as vibrações de deformação axial da ligação C=O e deformação angular na ligação C-H, respectivamente. Pode-se também relacionar bandas em 1662 cm^{-1} a deformação axial da ligação C=O em amidas, e em 1486 e 747 cm^{-1} correspondem, respectivamente a deformação axial da ligação C-N e deformação angular da ligação N-H.

Após o tratamento de purificação com ácido clorídrico, também é possível observar a presença de grupos funcionais contendo oxigênio, tais como, o álcool em 1050 cm^{-1} referente a deformação C-O, ânion carboxilato em 1559 cm^{-1} associados a ligação C=O. A vibração em 1711 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação axial C=O de éster ou alcoóis com insaturação adjacente ao grupo C-O-, em 1695 cm^{-1} também corresponde a deformação axial de C=O que

pode ser relacionada a forma acetamida. Já em 1508 cm^{-1} sugere o acoplamento da deformação angular de amida, nas ligações N-H. A deformação axial da ligação C-N em amina pode ser observada em 1140 cm^{-1} . Além destas bandas, também estão presentes bandas que podem ser associadas a deformação das ligações C=C e N-H, respectivamente em 1646 e 856 cm^{-1} .

Ao realizar a funcionalização, pode-se observar a diminuição de alguns grupos funcionais, assim como o deslocamento de outros, o que sugere que houve efetiva funcionalização. Assim como nos CNx purificados, há uma banda em torno de 2900 cm^{-1} que pode ser associado ao estiramento simétrico e assimétrico do CH_2 . Além disso, pode-se observar que as bandas em 1515 , 1220 e 1140 cm^{-1} são referentes, respectivamente ao acoplamento da deformação de amida, nas ligações N-H, deformação axial e angular de C-C(=O)-C em cetonas, e deformação axial da ligação C-N em amina.

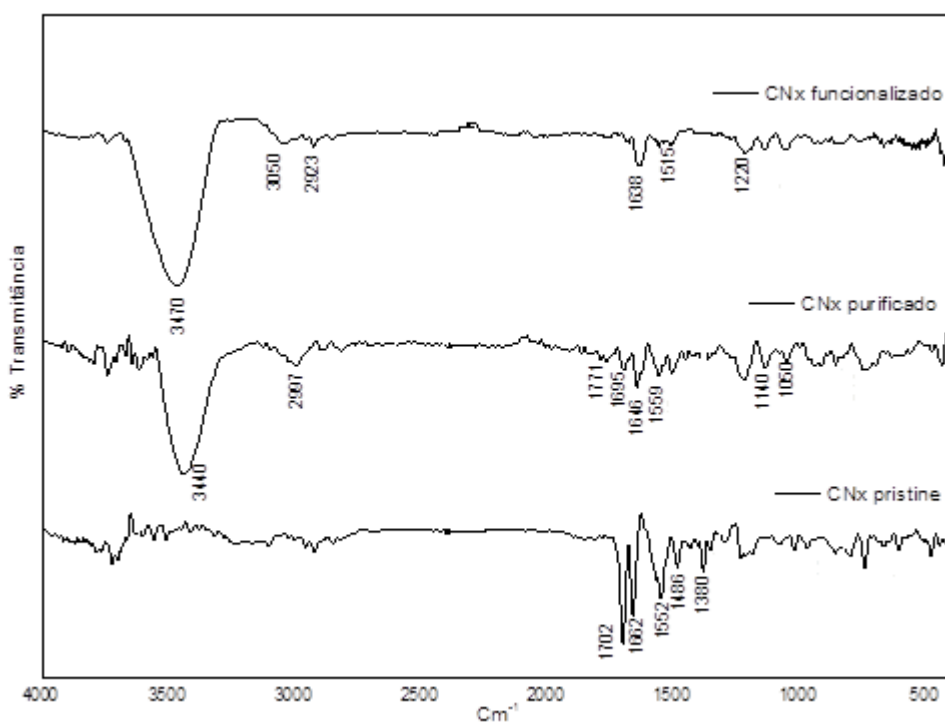


Figura 15: Espectro de infravermelho com Transformada de Fourier para CNx pristine, purificado e funcionalizado.

Nos espectros de FTIR de MWCNTs *pristine* (Figura 16) são observadas apenas vibrações características de materiais de carbono, que podem ser associados à deformação angular da ligação C-H em 1381 e 669 cm^{-1} e deformação axial da ligação C=C em 1640 cm^{-1} .

Ao realizar a purificação, pode-se observar o surgimento de bandas que podem ser associadas a grupos funcionais, tais como álcool em 1180 cm^{-1} com deformação da ligação C-O, as bandas em 1560 e 1402 cm^{-1} podem ser associadas ao ânion carboxilato. Além destas, podem ser observadas bandas associadas as ligações C=C em 1515 cm^{-1} e em 747 e 664 cm^{-1} referentes as ligações C-H.

Nos MWCNTs funcionalizados (Figura 16) também podem ser observados um aumento nas intensidades das bandas de vibrações associadas ao álcool em 1140 cm^{-1} , e bandas de carbonila em 1625 cm^{-1} que pode ser referente a ácidos carboxílicos ou amidas, esse aumento na intensidade pode ser resultado principalmente da indução de momentos de dipolo pela criação de defeitos, observada tanto nos CNx quanto nos MWCNTs.

Além disso, são observadas as bandas referentes as vibrações das ligações C=C em 1572 cm^{-1} , C-H em 2930 cm^{-1} e N-H em 667 cm^{-1} . A vibração em 2850 cm^{-1} refere-se ao estiramento simétrico do CH_3 , o que também indica que grupos foram adicionados a estrutura dos MWCNTs, assim como foi observado pelo espectro Raman.

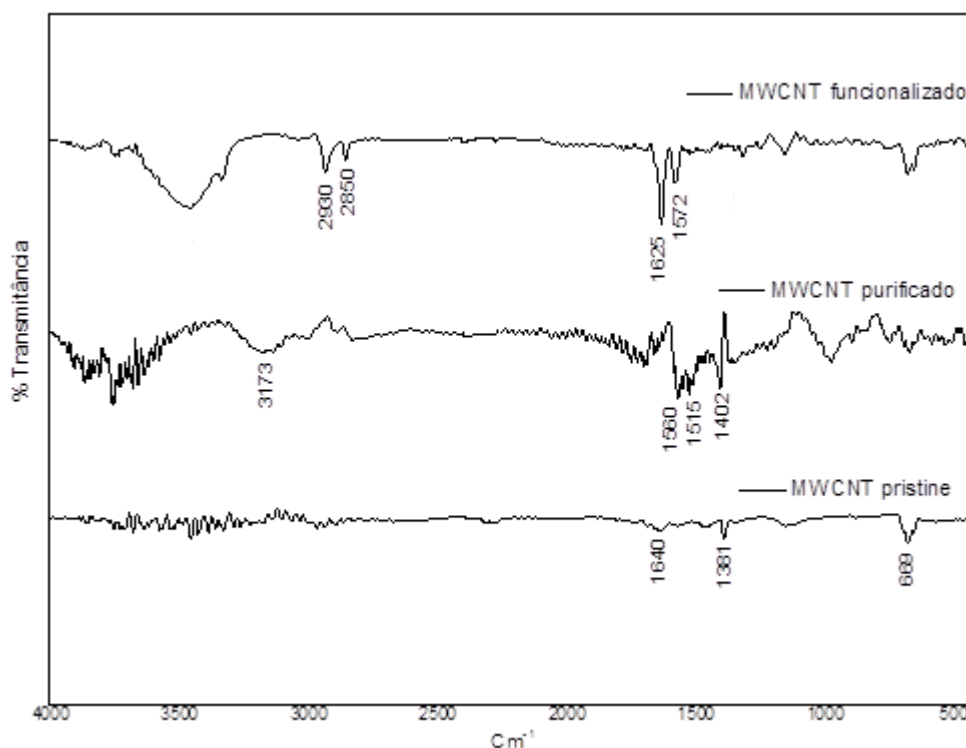


Figura 16: Espectro Infravermelho com Transformada de Fourier para os MWCNTs *pristine*, purificados e funcionalizados.

5.2 Caracterização das nanopartículas de poliestireno/cumarina

As nanopartículas de poliestireno/cumarina foram utilizadas como adquiridas e para caracterizá-las foram realizadas análises de MEV, MET, potencial zeta e o grau de monodispersidade no diâmetro das partículas, utilizando o software imageJ®.

A partir das micrografias de MEV foi observado que as partículas apresentam morfologia esférica. Embora as condições de síntese tenham sido mantidas para todas as partículas, a distribuição do diâmetro das partículas varia conforme o corante utilizado, indicando que o corante influencia no tamanho das partículas.

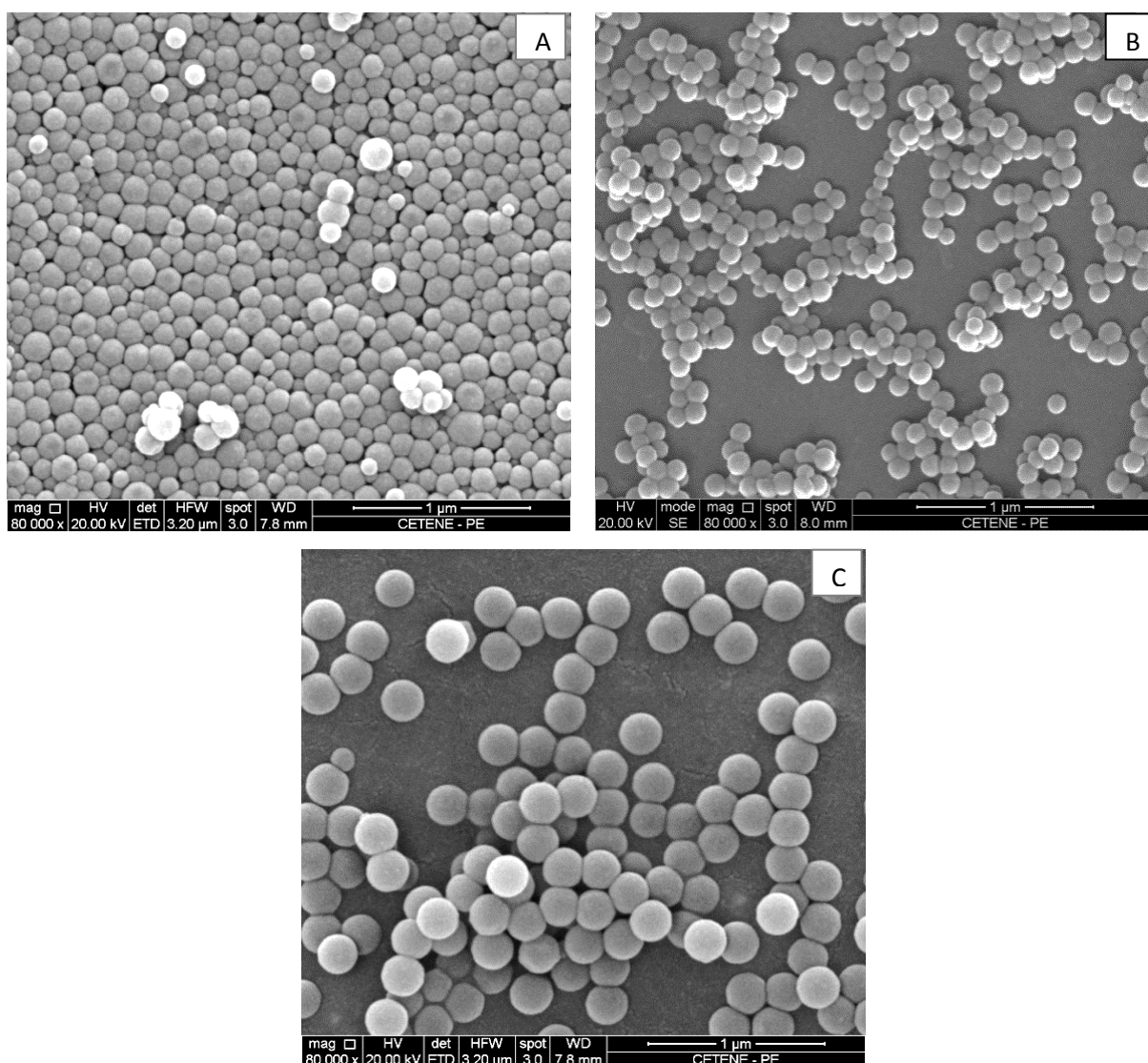


Figura 17: Micrografia de MEV. Partícula PS pura (A). Partícula PS/C-6 (B). Partícula PS/C-30 (C).

A partir do histograma para a distribuição do tamanho das partículas foi observado que a partícula PS pura possui menor tamanho de diâmetro, em torno de 70 nm. A partícula PS/C-6 tem tamanho médio de 110-130 nm, esse aumento está relacionado a incorporação do corante cumarina 6 em sua estrutura. A partícula PS/C-30 apresentou maior diâmetro médio, variando de 220 nm a 240 nm, possivelmente devido a estrutura da cumarina 30.

Esse aumento do diâmetro das partículas após a incorporação dos corantes também é relatado no trabalho de Lee et al. (2011), onde relata que após a adição da solução de corante numa suspensão de PS, as partículas incham e os corantes preferencialmente difundem no PS devido a uma diminuição da solubilidade dos corantes na mistura.

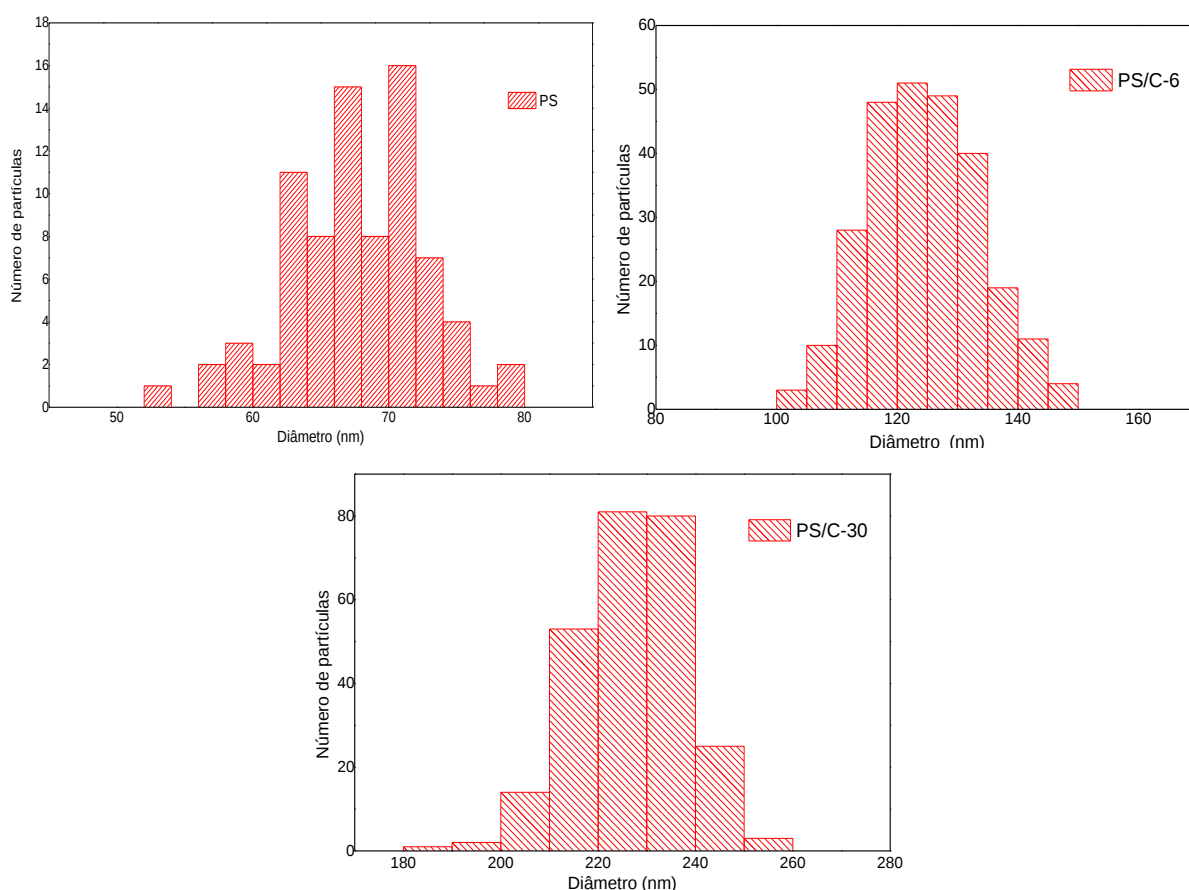


Figura 18: Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas de PS pura, PS-C6 e PS-C30.

Com base nos espectros de absorção e emissão no UV-Vis (Figuras 19-20) foi possível observar a incorporação dos corantes nas nanopartículas de poliestireno, bem como um deslocamento nas bandas, devido a interações dos corantes com o solvente ou pH ácido da solução. As nanopartículas de poliestireno puras têm fraca emissão de fluorescência na região

de 400 nm (Figura 19), ao incorporar as cumarinas 6 e 30 foram obtidas nanopartículas com altas fluorescência, evidenciando que a fluorescência foi mantida com as encapsulações das cumarinas. As nanopartículas PS/C6 apresentam máximos de fluorescência em 480 nm e 504 nm, já as nanopartículas PS/C30 emitem em 470 nm e 533 nm. Esses deslocamentos podem ser associados as interações das cumarinas com as nanopartículas de poliestireno, entre outros. Nos espectros de emissão das cumarinas há uma pequena banda em torno de 440 nm, que pode ser associada a contaminante durante a síntese, uma vez que a cumarina 6 e 30 não apresentam bandas nessa região, sendo necessárias futuras investigações.

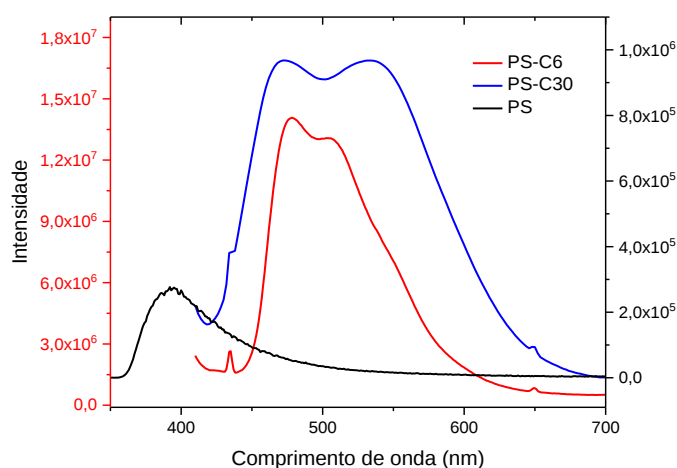


Figura 19: Espectros de fluorescência das nanopartículas de poliestireno pura (PS); poliestireno/cumarina 6 (PS/C6); poliestireno/cumarina 30 (PS/C30)

Os espectros de absorção das nanopartículas PS/C6 e PS/C30 mostram que há absorção máxima em 447 nm (Figuras 20 e 21), apresentando também bandas em torno de 298 nm, assim como são relatados em outros trabalhos (EL-KEMARY e RETTIG 2003; MIRANDA, 2001). As Figuras 20 e 21 também mostram que a banda de emissão de fluorescência está localizada em comprimentos de onda com menor energia, assim como foi relatado por Stokes. Uma causa comum da mudança de Stokes é a rápida deterioração para o nível vibracional mais baixo de S_1 . Além disso, para esses efeitos, os fluoróforos podem exibir mais mudanças de Stokes devido a efeitos do solvente, reações do estado excitado, complexo formação e/ou transferência de energia (MIRANDA, 2001).

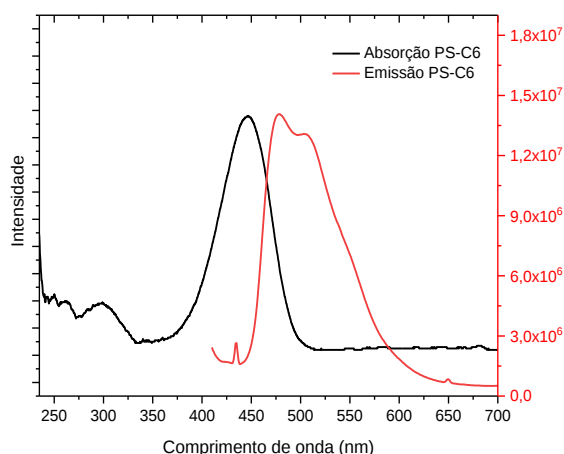


Figura 20: Espectro de Absorção da PS-C6 (linha preta). Espectro de emissão da PS-C6 (linha vermelha).

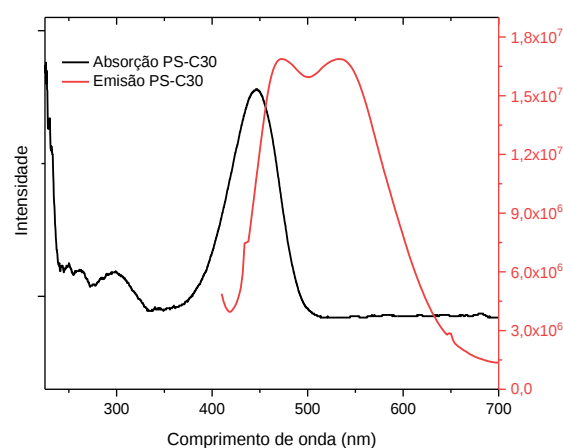


Figura 21: Espectro de Absorção da PS-C30 (linha preta). Espectro de emissão da PS-C30 (linha vermelha).

Ao realizar medidas do potencial Zeta para as nanopartículas de poliestireno foi observado que a suspensão apresenta boa estabilidade e disponibilidade de interações com os nanotubos de carbono. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, as nanopartículas de poliestireno/cumarina apresentaram maior estabilidade coloidal, pois quanto maior o valor das cargas em módulo, maior a repulsão eletrostática entre as partículas e menor o estado de agregação e a probabilidade de floculação ou sedimentação.

Tabela 5: Potencial Zeta das nanopartículas de poliestireno

Amostra	Potencial Zeta
PS pura	- 49,60
PS-C6	-50,50
PS- C30	- 63,20

5.3 Decoração de nanotubos de carbono com nanopartículas de poliestireno/cumarina

Conforme foi relatado nos procedimentos experimentais, foi realizado um pequeno estudo acerca do melhor tempo de agitação para decoração dos CNTs. A partir das micrografias de MET (não apresentado) foi observado que os maiores períodos de agitação favorecem um maior número de partículas adsorvidas nas paredes dos tubos. No entanto, em períodos

superiores a 72 horas de agitação, as nanopartículas PS/Cumarina começam a polimerizar e/ou dissolver. Além disso, os espectros Raman indicam que a estrutura dos CNTs não é afetada em maiores períodos de agitação, indicando que o tempo mais adequado foi de 72 horas, dessa forma, este será o período considerado nas discussões e procedimentos seguintes.

Após a lavagem e secagem dos CNT/PS-Cumarina foi observado que a massa final dos MWCNTs era superior a massa dos CNx, indicando que nos MWCNTs a perda de massa de PS/cumarina com as lavagens era menor. Nos espectros Raman para os CNTs decorados com as nanopartículas PS/cumarina (Figuras 22 e 23) foi possível observar os sinais característicos deste polímero, sugerindo que houve efetiva decoração dos nanotubos de carbono. Em torno de 105 cm^{-1} é observado o pico base do poliestireno, em 1003 cm^{-1} há duplete intenso referente às ligações C-H no plano, além de outros picos característicos.

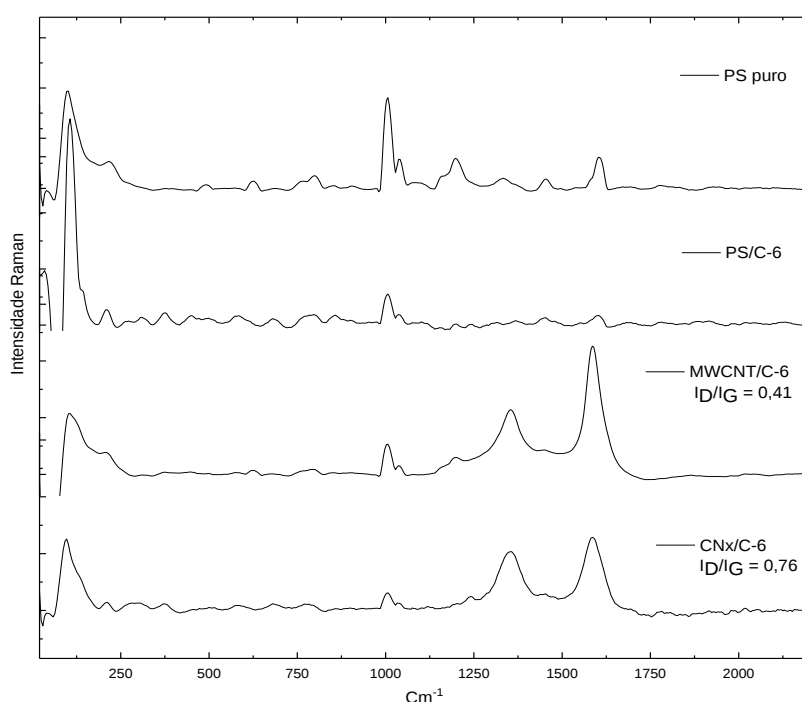


Figura 22: Espectros Raman dos CNTs decorados com PS/C6.

Além disso, a relação das intensidades das bandas D e G (I_D/I_G) mostra que a decoração da superfície dos CNTs não provocou defeitos na estrutura. Ao comparar as intensidades I_D/I_G dos MWCNTs após funcionalização, 0,34, (Figura 14) com a relação das intensidades das bandas após a decoração ($I_D/I_G = 0,41$, Figura 22) é observado que a estrutura eletrônica da superfície foi preservada. Os CNx, conforme foi discutido anteriormente, possui a relação I_D/I_G maior devido a dopagem durante a síntese. Depois da decoração com as nanopartículas PS/C6

foi notado um aumento na relação, mas sem comprometer as propriedades essenciais dos nanotubos. Com base em outros trabalhos, que mostravam alta relação das intensidades, esse método se mostrou bastante eficiente na decoração de CNTs através de interações eletrostáticas.

Através dos espectros Raman dos CNTs/PS-C6 também foi observado que houve interação das nanopartículas tanto com CNx quanto com MWCNTs, entretanto nas micrografias de MEV (Figuras 23 (a) e (b)) são mostradas que as superfícies dos CNx estão mais decoradas com nanopartículas de PS/C6 do que a MWCNT. Assim como foi relatado por Ayla et. al. (2010), no qual a incorporação de átomos de N em nanotubos de carbono puros torna-os quimicamente mais reativos, facilitando a ancoragem de grupos ou partículas em sua superfície.

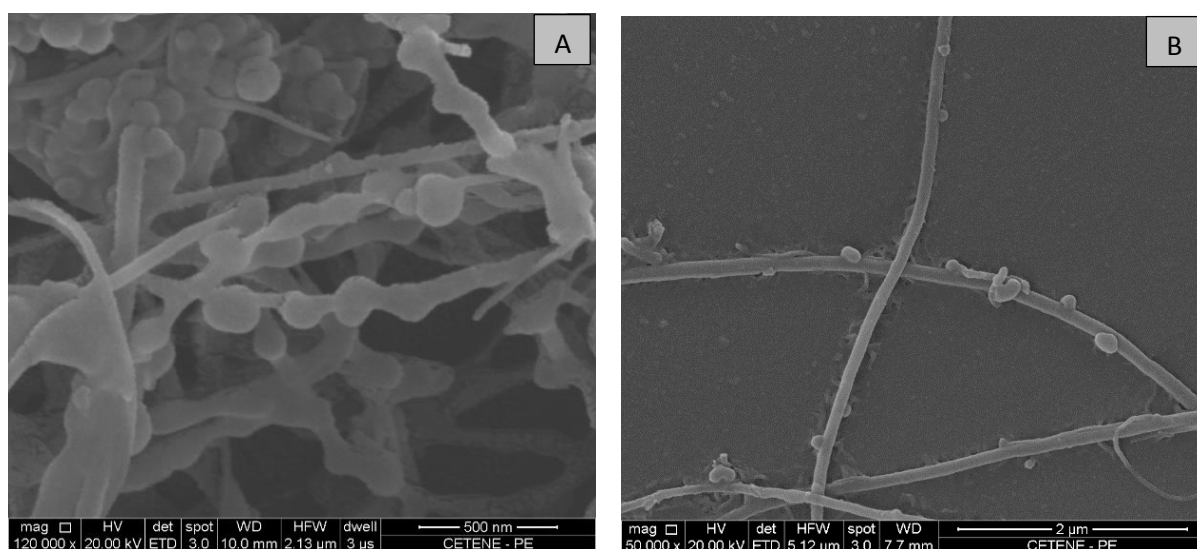


Figura 23: Micrografias dos nanotubos de carbono e nanoartículas de poliestireno com cumarina 6. (a) Superfície de CNx. (b) Superfície do MWCNT.

A decoração das superfícies dos CNTs com as nanopartículas PS/C30 também foi eficiente. Através dos espectros Raman (Figura 24) são observados picos característicos do poliestireno, assim como foi discutido anteriormente. Outro fato interessante é que a decoração dos CNTs não alterou a hibridação dos carbonos, uma vez que a relação das intensidades I_D/I_G para os CNx foi de 0,92 e para os MWCNTs foi de 0,63. Estes resultados mostram que a cumarina utilizada não interfere na decoração e que nenhuma mudança drástica foi causada nas propriedades dos CNTs.

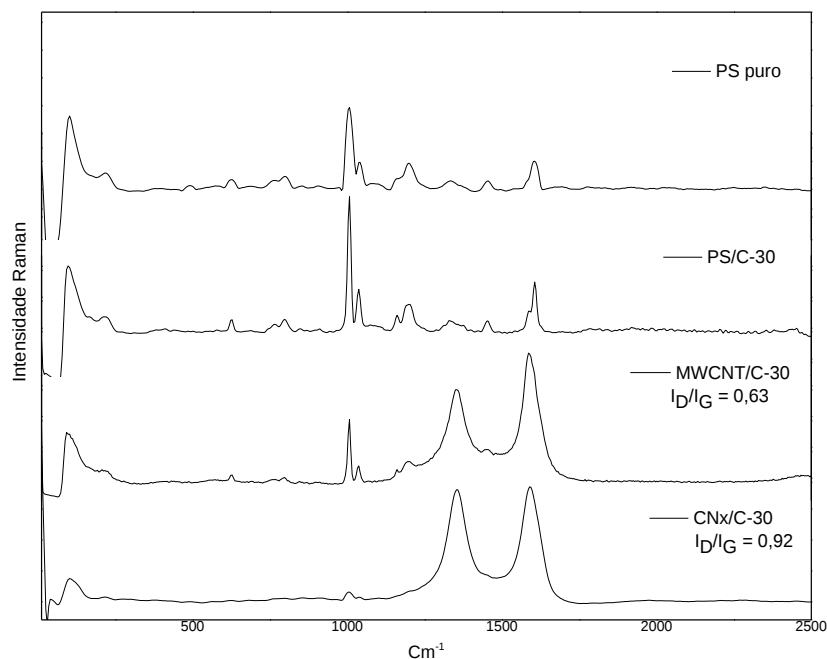


Figura 24: Espectros Raman para os CNTs decorados com PS/C-30.

De acordo com as micrografias de MEV (Figura 25) os CNTs apresentam nanopartículas PS/C30 adsorvidas em suas superfícies, nessas amostras os CNx também apresentaram mais nanopartículas que MWCNT nas superfícies, devido a sua maior reatividade.

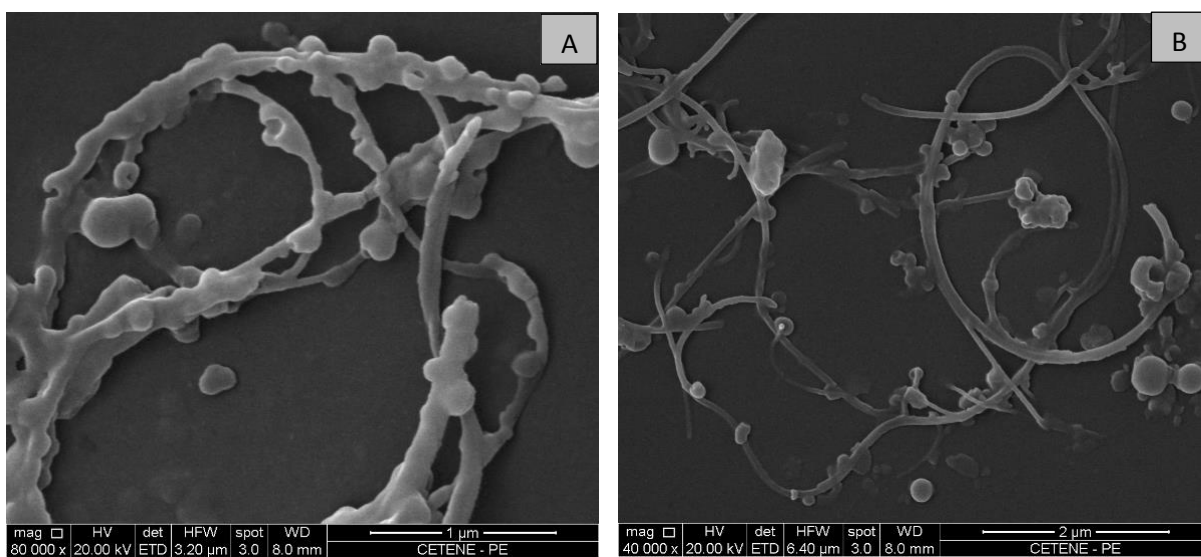


Figura 25: Micrografias dos nanotubos de carbono e nanoartículas de poliestireno com cumarina 30. (a) Superfície de CNx. (b) Superfície do MWCNT.

A decoração dos nanotubos de carbono com as nanopartículas de PS/cumarina também foi avaliada através dos espectros de FTIR. Na Figura 26 são mostradas bandas características tanto dos CNx quanto das nanopartículas adsorvidas em sua superfície, ressaltando que nas análises de Raman e FTIR não foram identificadas bandas referentes às cumarinas, devido a concentração utilizada. Dessa forma, os espectros das nanopartículas PS/6 e PS/C30 apresentam as mesmas bandas, e consequentemente os espectros dos CNx/PS-C6 e CNx/PS-C30 apresentam apenas alguns pequenos deslocamentos resultantes de interações eletrostáticas e ligação de hidrogênio entre os grupos químicos CNT e poliestireno.

Nos espectros de FTIR são identificadas bandas características do poliestireno em 702, 758, 1600 cm^{-1} que estão associadas ao estiramento da ligação C-H em aromáticos. As bandas em 2926 e 2850 cm^{-1} se referem ao estiramento do C-H (sp^3), indicando que grupos foram adicionados na superfície. Além disso, pode-se observar que as bandas em 1220 e 1140 cm^{-1} podem ser referentes, respectivamente a deformação axial e angular de C-C(=O)-C em cetonas, e deformação axial da ligação C-N em amina. (AL-KADHEMY, RASHEED, e SALIM, 2016)

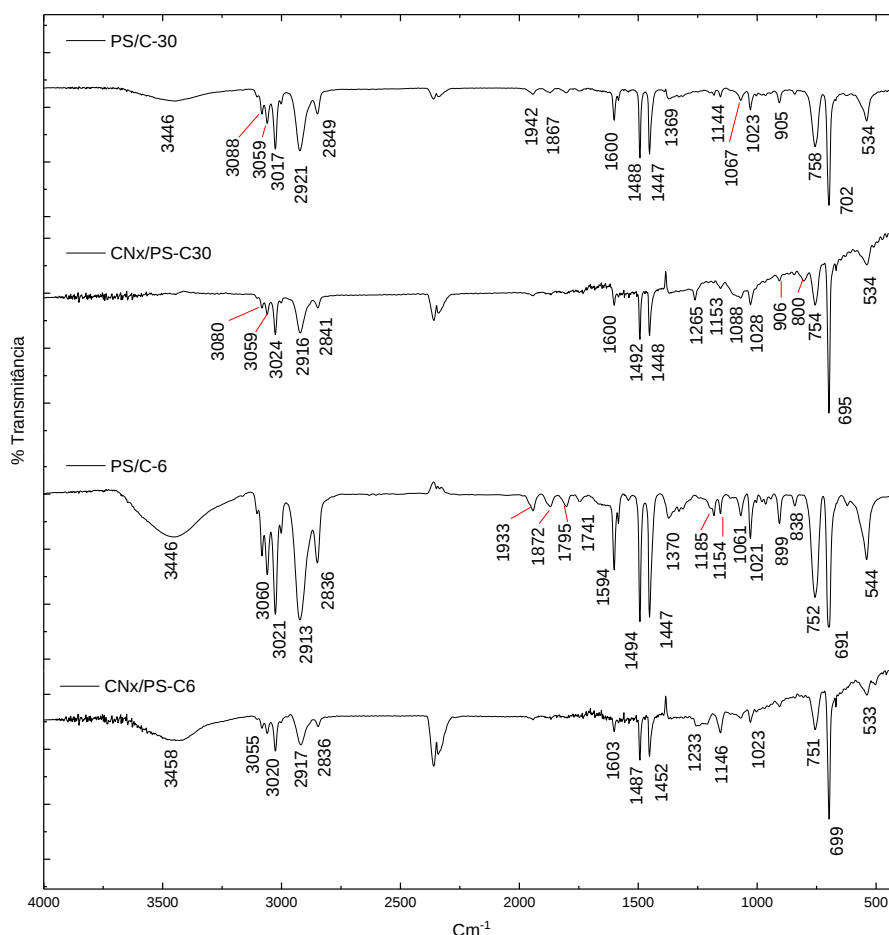


Figura 26: Espectros de FTIR dos CNx decorados.

Os espectros de FTIR dos MWCNT/PS-C6 e MWCNT/PS-C30 (Figura 27) também apresentam as mesmas bandas, com apenas alguns deslocamentos, devido a interações entre as nanopartículas de poliestireno e os MWCNTs. Também foram identificadas bandas referentes a ligação C-H do anel aromático, estiramento de ligações sp^2 e sp^3 e vibrações de alongamento do anel C=C foram observados na região de $1430-1620\text{ cm}^{-1}$. (Hu et al. 2012)

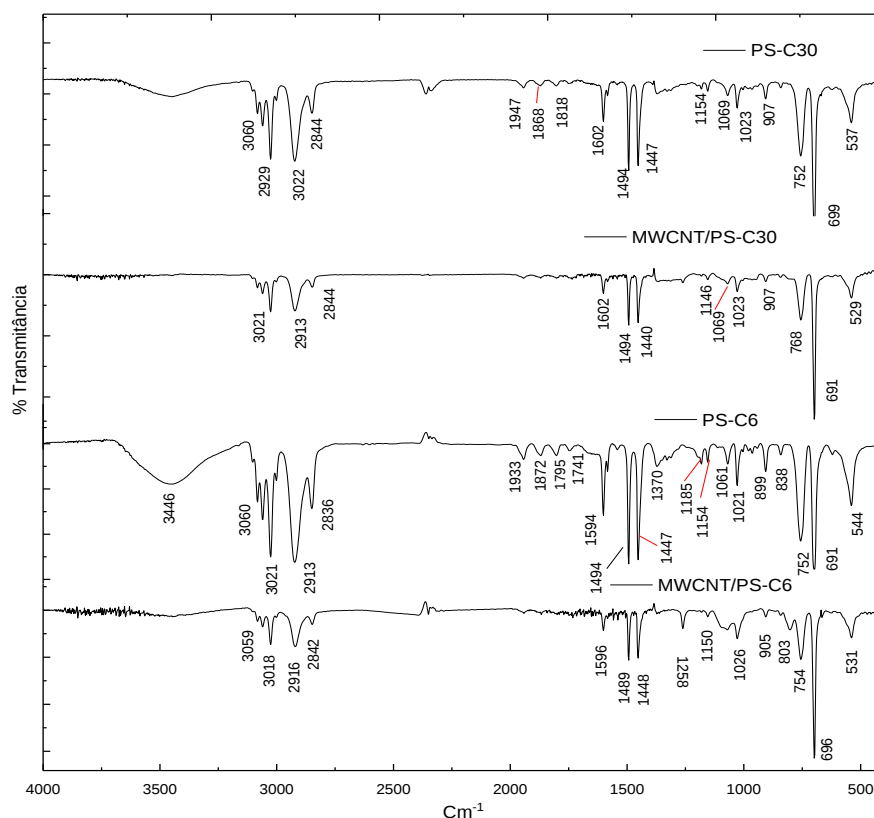


Figura 27: Espectros de FTIR dos MWCNTs decorados com cumarinas.

Os espectros de FTIR e Raman mostram que os métodos utilizados para tratamento e decoração dos CNTs são adequados, uma vez que a estrutura dos nanotubos é preservada, assim como as propriedades elétricas. A fluorescência desses nanocompósitos também foi investigada através dos espectros de emissão, nas Figuras 28 e 29.

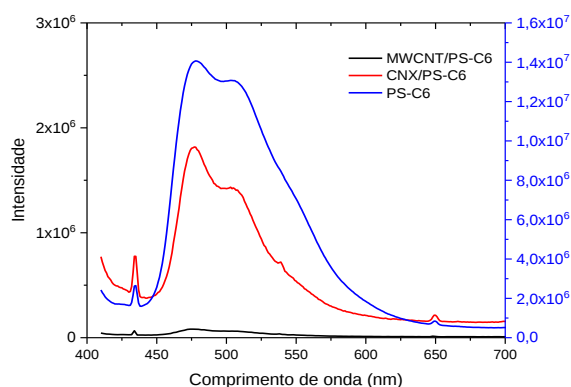


Figura 28: Espectros de emissão para MWCNT/PS-6 e CNx/PS-C6.

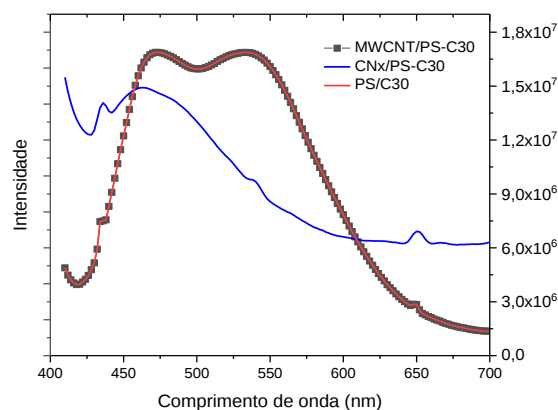


Figura 29: Espectros de emissão para MWCNT/PS-30 e CNx/PS-C30.

Os espectros de emissão dos CNT/PS-Cumarina mostram que o nanocompósito MWCNT/PS-C6 apresenta menor intensidade de fluorescência, essa diminuição pode estar relacionada a nanopartículas aglomeradas e ao quantitativo de nanopartículas PS/C-6 adsorvido na superfície dos nanotubos.

Os nanocompósitos com a cumarina 30 apresentam forte fluorescência, com bandas características da cumarina. A Figura 29 também mostra que a emissão dos MWCNT/PS-C30 é idêntica as nanopartículas PS/C-30, indicando que não houve nenhuma interferência durante a incorporação. Entretanto, para os CNx/PS-C30 é observado um deslocamento para menores comprimentos e uma diminuição nas intensidades de fluorescência, que pode ser resultado da agregação de nanopartículas e interações com outras partículas durante a decoração dos CNTs.

Estes resultados indicam que a simples metodologia utilizada é adequada para a decoração de nanotubos de carbono e que preserva as propriedades das nanopartículas utilizadas. Nos nanocompósitos CNT/PS existe interação de empilhamento de anel (π - π) entre o anel de poliestireno e os nanotubos de carbono, resultando em melhores dispersões e propriedades dos nanocompósitos. (AKRAM, KAUSAR, e SIDDIQ, 2016)

5.4 Caracterização química da quitosana

Conforme foi discutido na seção 3.4, foi utilizada neste trabalho uma quitosana comercial, extraída da carapaça de caranguejos, e desta forma é necessária a determinação da massa molecular média da quitosana e também do grau de desacetilação para que se tenha as características do material utilizado.

No trabalho intitulado de “Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata para Tratamento de Lesões de Cáries” depositada no Departamento de Química Fundamental – Universidade Federal de Pernambuco em 2015, foi utilizada a mesma quitosana comercial, onde foram realizados ensaios para determinação da massa molecular média da quitosana e percentual de desacetilação, os quais foram considerados neste trabalho.

A massa molecular média da quitosana foi determinada através da Viscosimetria, que é um dos métodos mais simples e rápido, onde foi considerado o tempo de escoamento do solvente e das soluções poliméricas diluídas, e relacionados ao valor da massa molecular. A partir dos dados apresentados no trabalho, a quitosana utilizada se refere a uma quitosana de alto peso molecular, apresentando massa molar média de $5,25 \times 10^5$ (g/mL), o que está de acordo com os valores reportados na literatura para a quitosana.

Outra análise importante para caracterizar a quitosana é a determinação do grau de desacetilação, que indica o conteúdo médio de unidades N-acetil-D-glucosamina. Para isto foi realizado uma análise elementar com a finalidade de determinar a razão carbono/nitrogênio. Na literatura os valores de 5,145 e 6,816 correspondem, respectivamente, a razão C/N de uma quitosana completamente desacetilada e uma completamente acetilada. A quitosana utilizada nesse trabalho apresentou o valor de 5,663 para a razão C/N, o que indica um grau de desatilação de 75,76 %, conforme os procedimentos descritos no trabalho de pesquisa citado anteriormente.

5.5 Otimização do processo de formação de filmes de quitosana com nanotubos de carbono/poliestireno-cumarina

Com objetivo de produzir um material com interessantes propriedades, a etapa de preparação dos filmes é uma das mais importantes etapas. Foram pesquisados diversos fatores nas condições de preparo e secagem, tais como concentração da matriz, temperatura de secagem, e o polímero utilizado na matriz. Para a escolha do polímero da matriz foram produzidos filmes utilizando os polímeros acetato de celulose e quitosana com 0,3%; 0,5% e 1,0% em massa de glicerina como plastificante.

Foi observado que os filmes de quitosana são menos rígidos e que baixos percentuais de glicerina são necessários para aumentar a flexibilidade. Além disso, os filmes com 1% em

massa de quitosana eram mais frágeis e apresentavam mais bolhas, já os filmes com 1,5 % de quitosana e 0,3 % de glicerina não exibiram consideráveis falhas e eram mais resistentes.

Além disso, a concentração da quitosana e a água adicionada influenciam na viscosidade da mistura, que está diretamente relacionada ao tempo de secagem do material e consequentemente à sedimentação dos nanotubos. Foi observado que um maior percentual de quitosana favorece a dispersão e dificulta a sedimentação dos nanotubos de carbono.

Outro fator que foi considerado é a temperatura de secagem dos filmes. A secagem em temperaturas acima de 50 °C, embora mais rápida, resultou na formação de filmes não uniformes e com muitas bolhas. Possivelmente, essas bolhas apareceram devido à dificuldade de evaporação do solvente causada pela formação de uma película sobre o filme no início da secagem. Já os filmes secos numa temperatura de 35 °C não apresentam bolhas e apresentam boa dispersão na matriz.

Dessa forma, as condições ótimas de preparo e secagem dos filmes acontecem quando são utilizados uma solução com de quitosana (1,5% em massa) e 0,3 % de glicerina como matriz polimérica, e secos numa temperatura de 35 °C.

5.6 Caracterização estrutural dos filmes de quitosana com nanotubos de carbono/poliestireno-cumarina

A produção de filmes de quitosana é um processo simples, porém, são necessários alguns cuidados para a obtenção de um produto com alta qualidade. De forma qualitativa e macroscópica, os filmes de quitosana obtidos neste trabalho se mostraram estáveis, translúcidos, elástico e com poucas falhas aparentes. A utilização de um pequeno percentual de glicerina (0,3%) aumentou a flexibilidade, e possivelmente melhorou as propriedades mecânicas, assim como a impediu a formação de rachaduras. O que também é relatado em Aryaei, Jayatissa, and Jayasuriya (2014); Zhong, Song, and Li, (2011).

De acordo com a Figura 30, os filmes com 0,03 m/m de MWCNT/PS-Cumarina em relação aos filmes CNx/PS-cumarina são mais uniformes, homogêneo e não apresentam engelhamento, assim como algumas pequenas bolhas.

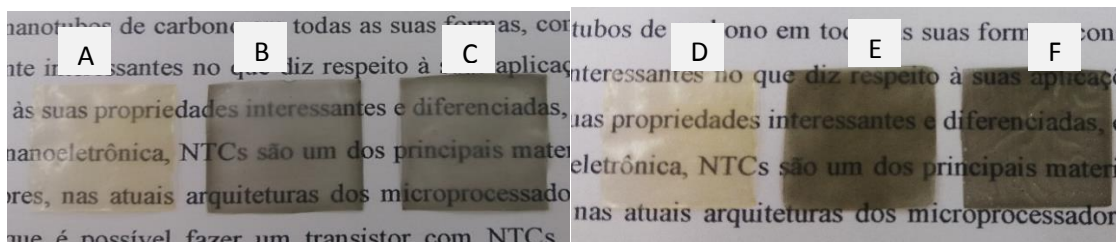


Figura 30: Fotografias dos filmes utilizados nesta dissertação. Filme de quitosana (A e D). MWCNT/C6-3 (B). MWCNT/C30-3 (C). CNx/C6-3 (E). CNx/C30-3 (F).

Os filmes com 0,1 (m/m) de MWCNT/PS-C (Figura 31) não apresentaram mesma dispersão de nanotubos na matriz de quitosana, pode ser devido a saturação dos CNT/PS-cumarina durante a dispersão em solução de ácido acético para formação dos filmes. Além disso, os CNTs com maior número de nanopartículas de PS/Cumarina adsorvidas na superfície dificultavam a dispersão na solução ácido acético (2%) devido a insolubilidade da cumarina em solução aquosa. No entanto, a Figura 30 demonstra que estas nanopartículas foram uniformemente distribuídas na matriz. O nível de distribuição foi aceitável em comparação com outros trabalhos semelhantes anteriores. (WANG *et al.* 2005; SPINKS *et al.* 2006)

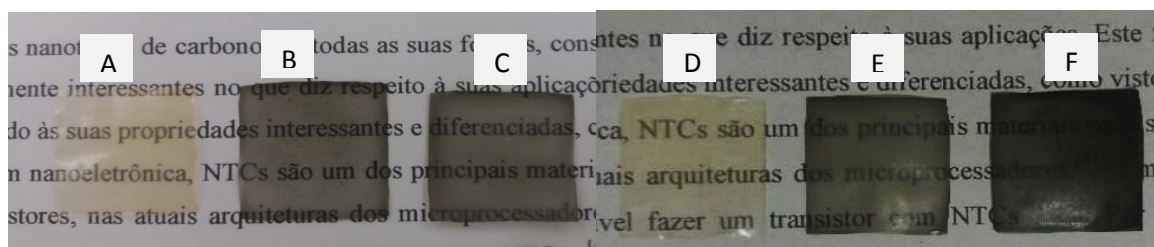


Figura 31: Fotografias dos filmes utilizados nesta dissertação. Filme de quitosana (A e D). MWCNT/C6-10 (B). MWCNT/C30-10 (C). CNx/C6-10 (E). CNx/C30-10 (F).

Os filmes produzidos também são visivelmente bem flexíveis e apresentam certo grau de elasticidade, devido a concentração de glicerina (0,3 %) e materiais utilizados, apesar de não ter realizados ensaios mecânicos, é possível considerar que estes filmes possuem interessantes propriedades mecânicas, uma vez que os CNT/PS-Cumarina estão homogeneamente dispersos na matriz de quitosana e também há forte interação entre eles, assim como serão mostradas nas micrografias de MEV. Na Figura 32 serão exibidos alguns exemplos de flexibilidades dos filmes.

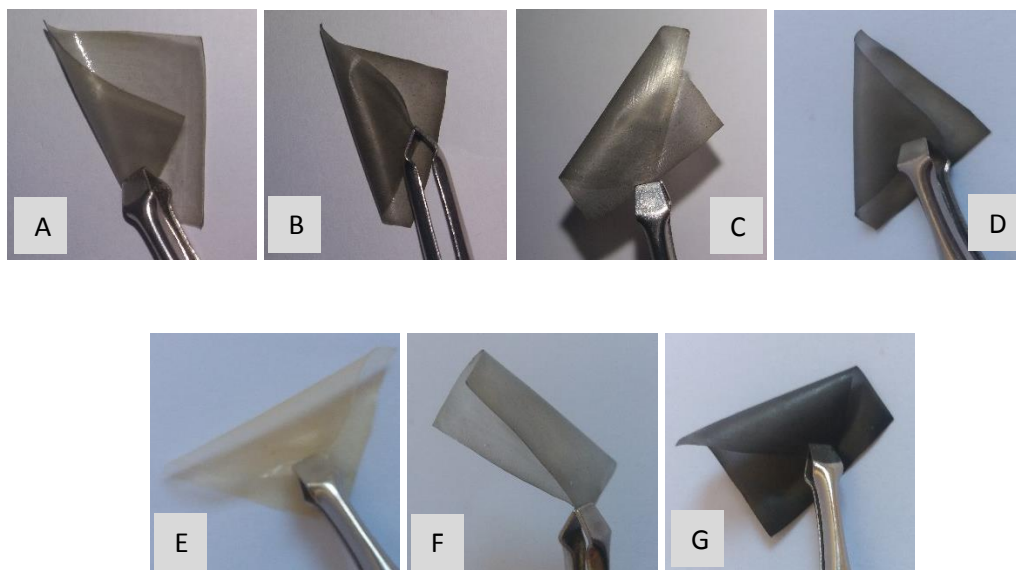


Figura 32: Fotografias dos filmes. MWCNT/C6-3(A). MWCNT/C6-10(b). MWCNT/C30-3(c). MWCNT/C30-10 (d). Filme de quitosana (E). CNx/C6-10 (F). CNx/C30-10 (G).

De forma microscópica, os filmes de quitosana puro possuem superfície rugosa, sem presença de poros ou relevos em sua superfície, a micrografia da seção transversal dos filmes mostra uma estrutura compacta (Figura 33).

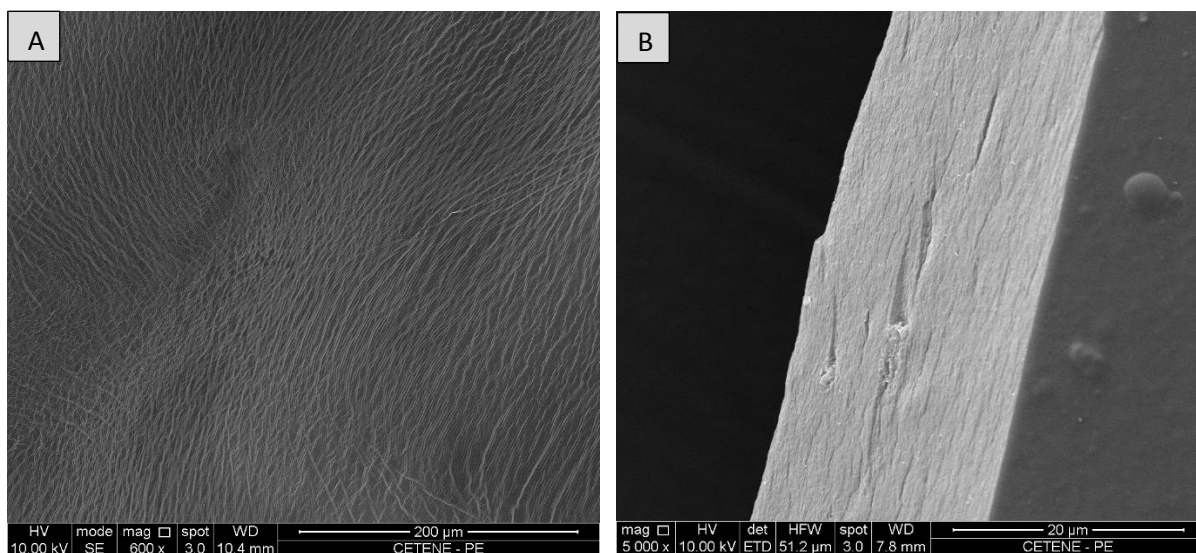


Figura 33: Micrografia eletrônica de varredura da superfície de filme de quitosana (A). Corte transversal de filme de quitosana (B).

Os filmes com CNT/PS-Cumarina exibiram os aspectos típicos para filmes MWCNT/quitosana. De forma geral, os filmes com nanotubos de carbono exibiram alta rugosidade, boa dispersão na matriz, mas com alguns aglomerados. A partir da Figura 34, pode-se visualizar a micrografia do filme MWCNT/C6-3, que possui 0,03m/m MWCNT, este filme apresenta boa dispersão na matriz, mas com alguns nanotubos aglomerados. A seção transversal (Figura 34 b) mostra que os MWCNTs estão dispersos em toda espessura do filme e que o mesmo adquire aspecto de folhas com a adição dos nanotubos.

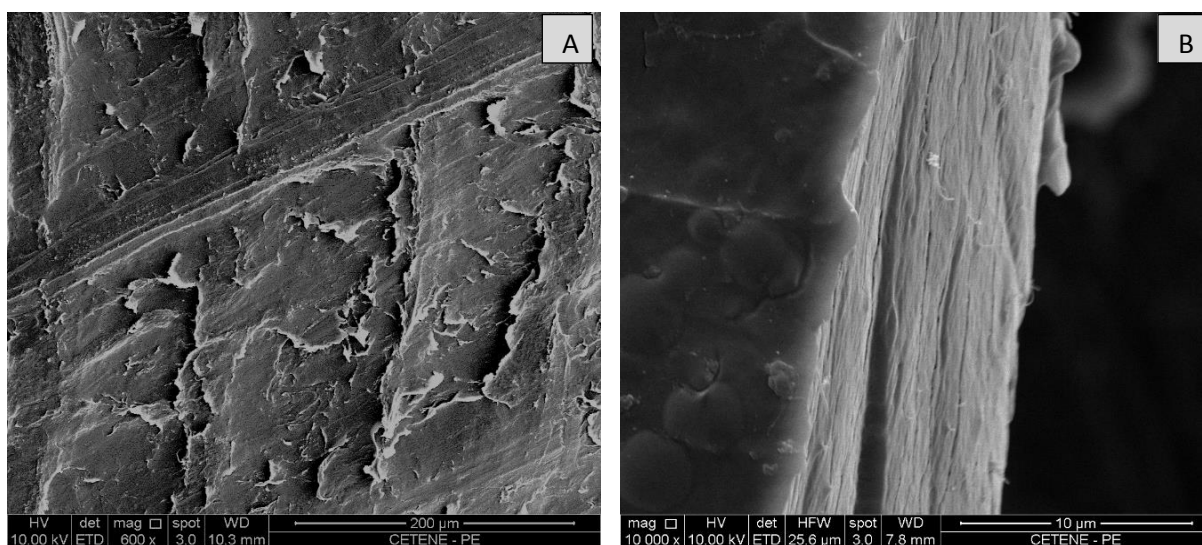


Figura 34: Micrografia eletrônica de varredura da superfície do filme (a). Seção transversal do filme MWCNT/C6-3 (b).

Os filmes MWCNT/C6-10, que apresentam 0,1 m/m MWCNT (Figura 35) possuem boa dispersão, mas com algumas partículas aglomeradas, além disso, apresentam basicamente dois tipos de superfície, uma superfície mais lisa (35 a) e outra mais rugosa (35 b), devido a sedimentação dos nanotubos no processo de secagem, indicada na micrografia da fratura do filme (Figura 35 c).

Na micrografia 35 (c) também é observado que as extremidades dos nanotubos são quebradas ao invés de puxadas, indicando ótima interação entre MWCNT e quitosana, assim como é relatado em Mallakpour and Madani (2015). Na micrografia 35 (d) pode-se observar que não há praticamente nanotubos agregados, o que contribui para melhores propriedades mecânicas.

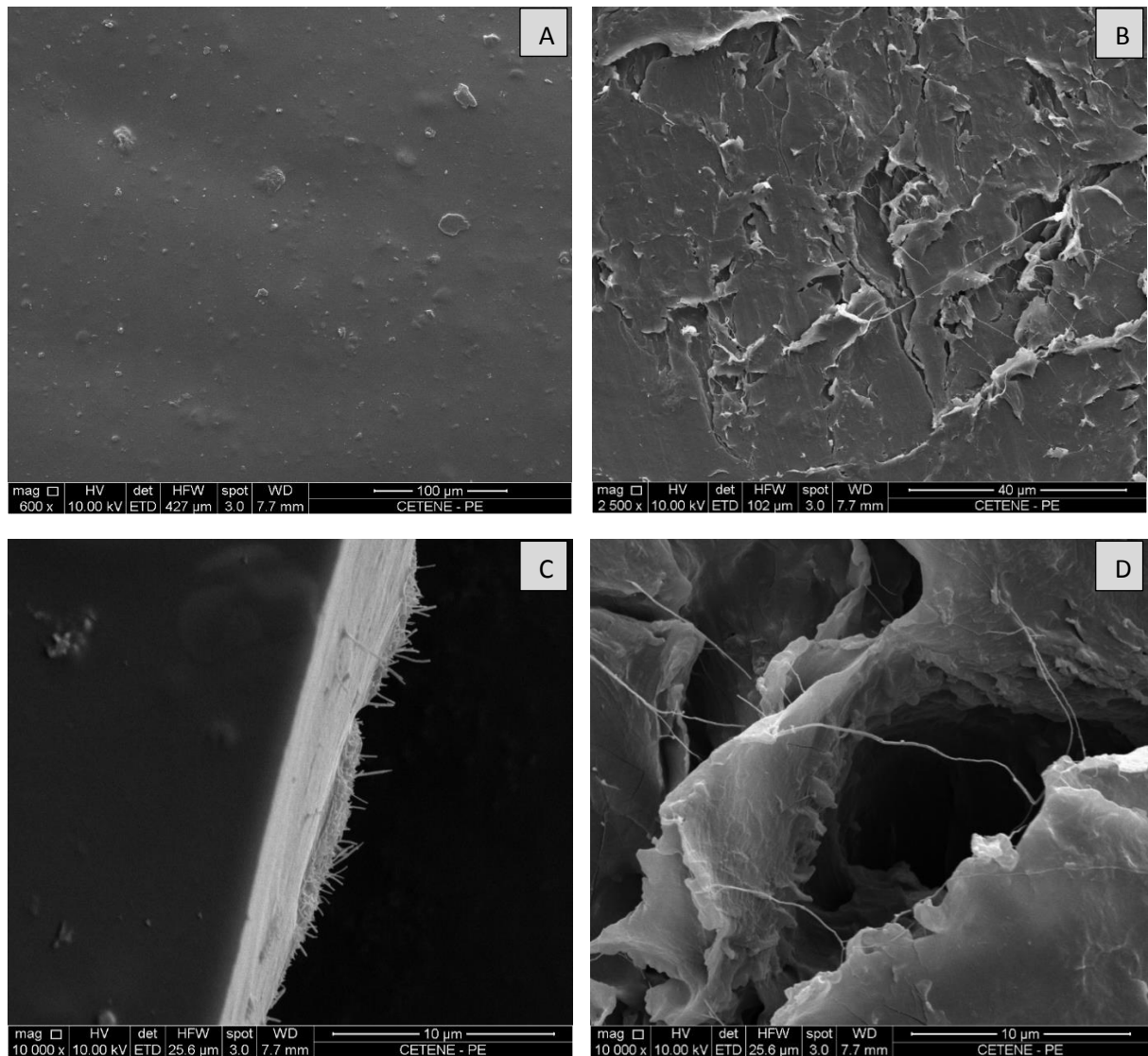


Figura 35: Micrografias do filme MWCNT/C6-10. Superfície do filme (a), (b) e (d). Seção transversal (c).

Os filmes MWCNT/C30-3 e MWCNT/C30-10 com respectivamente 0,03 m/m e 0,1 m/m de MWCNT são mostrados nas Figuras 36 (a - d). É possível observar que em todos os filmes houve sedimentação dos nanotubos na secagem. Além disso, o filme com menor concentração de nanotubos também apresenta melhor dispersão na matriz.

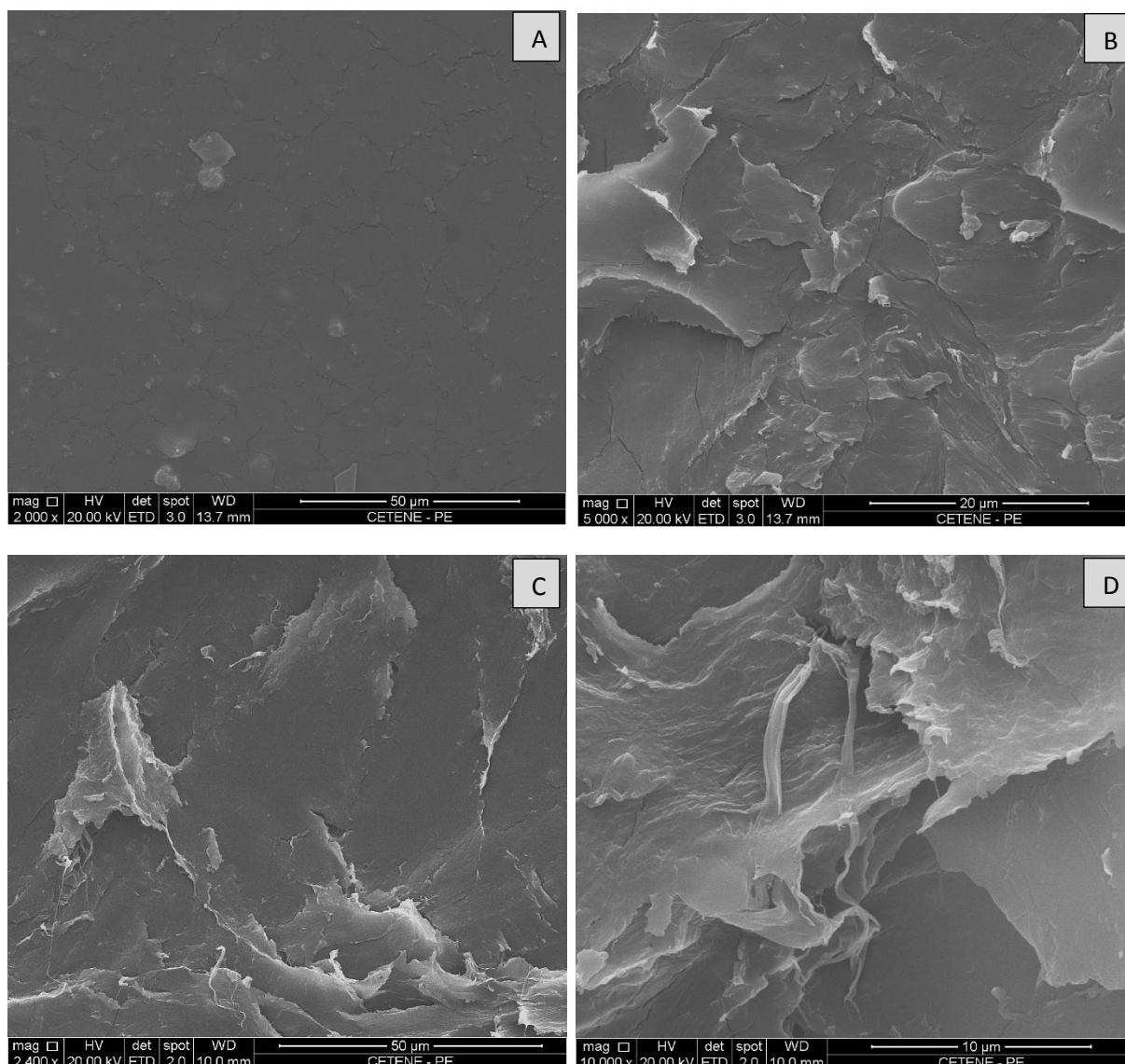


Figura 36: Micrografias das superfícies do filme MW/C30-3 (a) e (b). Superfícies do filme MW/C30-10 (c) e (d).

De forma geral, os MWCNTs apresentaram boa dispersão na matriz de quitosana, e esta pode estar relacionada à sua maior interação com o polímero. A presença de grupos aminos e hidroxilo da quitosana e grupos carboxílico e hidroxilo nos MWCNTs funcionalizados favorecem uma forte ligação de hidrogênio entre a quitosana e os MWCNTs (WANG *et al.* 2005). A sedimentação dos nanotubos de carbono é suavizada e a dispersão das nanopartículas na matriz é aumentada em menor carga de MWCNT. Em maior concentração (0,1 m/m) são encontradas maior número de nanopartículas aglomeradas, essas pequenas agregações isotrópicas eram inevitáveis porque o processo de sonicação não induz energia suficiente para superar a atração de van der Waals entre os nanotubos (BADAIRE *et al.* 2005). Entretanto,

mesmo nestes filmes com maior carga de MWCNT são encontradas melhores dispersões que nos trabalhos de Wang et al. (2005).

Nas Figuras 37 e 38 são apresentadas, respectivamente, as micrografias das superfícies dos filmes CNx/C6-3 e CNx/C6-10, onde foi possível identificar nanopartículas aglomeradas, principalmente nos filmes com maior concentração de CNx/PS-Cumarina. Conforme foi relatado anteriormente, um maior número de nanopartículas PS/Cumarina adsorvidas nas superfícies dos CNTs dificulta a dispersão na solução de ácido acético e consequentemente compromete a dispersão na matriz de quitosana.

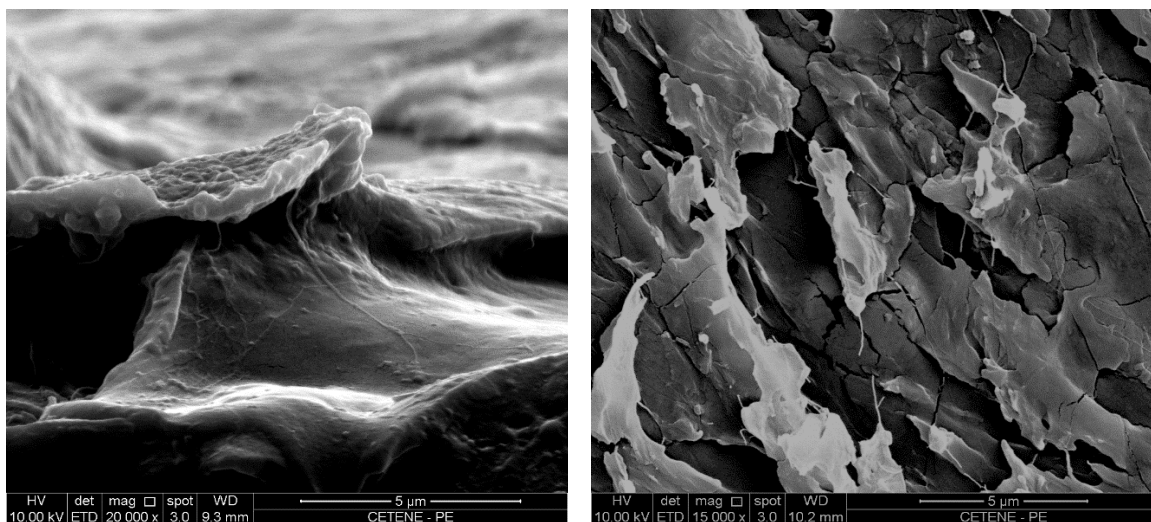


Figura 37: Micrografias da superfície do CNx/C6-3.

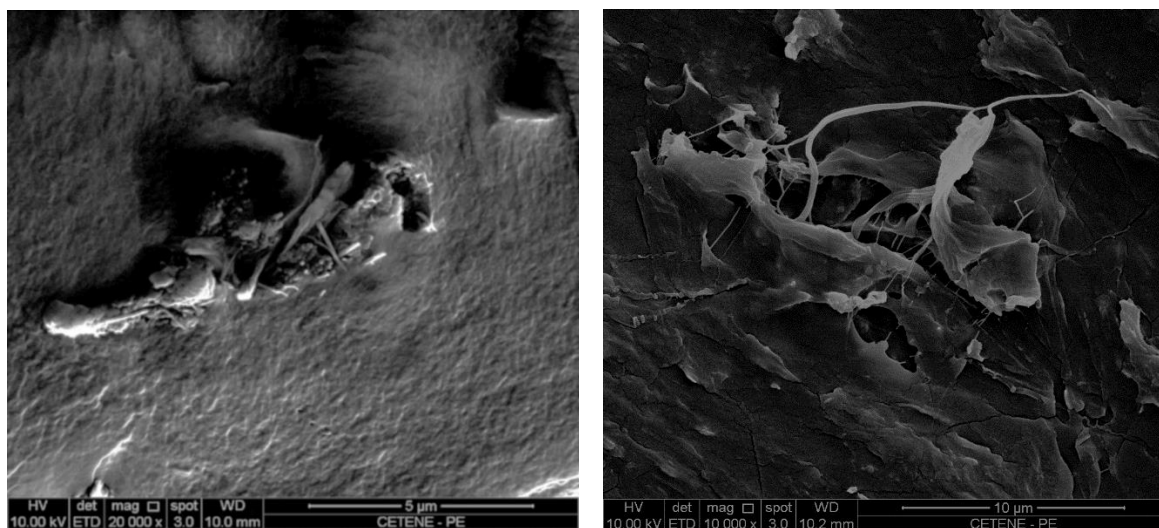


Figura 38: Micrografia de MEV da superfície dos filmes CNx/C6-10.

Os filmes com 0,03 m/m e 0,1 m/m de CNx/C30 na matriz de quitosana também exibiram nanotubos de carbono aglomerados. Na micrografia (Figura 39 a-b) há muitos CNx na superfície, produzindo filmes com alta rugosidade, entretanto, são identificadas muitas nanopartículas aglomeradas, o que pode interferir em algumas propriedades.

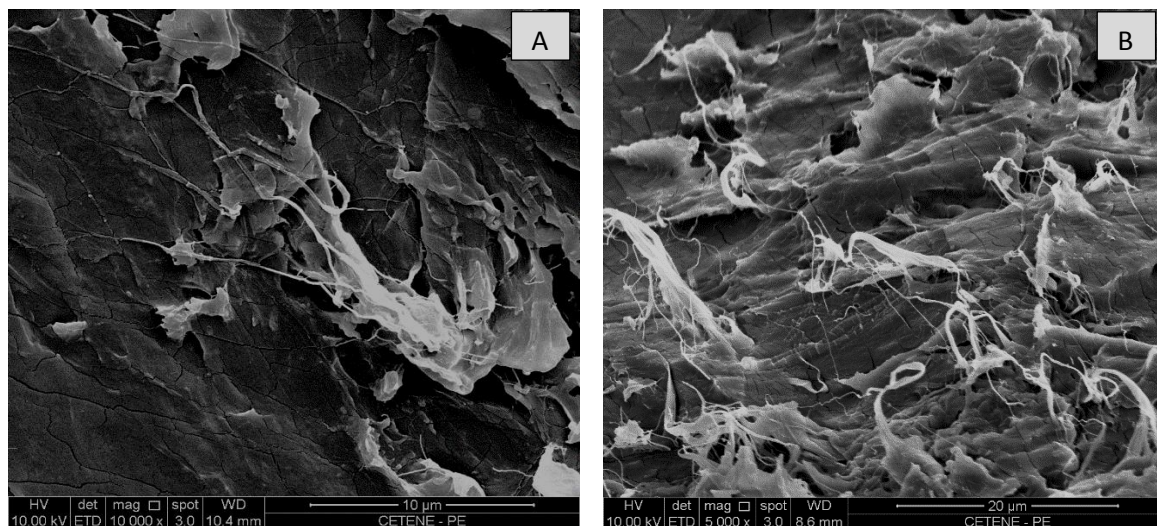


Figura 39: Micrografias da superfície do filme CNx/C30-3 (A) e CNx/C30-10 (B).

Outro fator interessante na morfologia dos filmes é que a superfície dos filmes de quitosana pura é pouco rugosa, sem presença de poros ou relevos em sua superfície (Figura 33). No entanto, ao adicionar nanotubos de carbono, os filmes passaram a apresentar uma morfologia com relevos, formando micro-poros que podem vir a favorecer a permeabilidade ao ar, regeneração e reprodução de células, evidenciando as excelentes perspectivas de desenvolvimento destes filmes no campo dos materiais biomédicos e de embalagem de alimentos.

Os filmes com CNx/PS-cumarina apresentaram muitas nanopartículas aglomeradas, isto pode ser devido à dificuldade de dispersão das nanopartículas na solução de ácido acético e quitosana, por causa da insolubilidade dos corantes em soluções aquosas. Uma dispersão ineficiente das nanopartículas pode afetar as propriedades fluorescentes, de condução, mecânicas, entre outras. Dessa forma, serão realizados e discutidos procedimentos apenas dos filmes com MWCNT/PS-cumarina.

É importante ressaltar que a decoração dos CNx com as nanopartículas resultou em nanocompósitos com alta fluorescência, devido a eficiente decoração, a única desvantagem encontrada foi a elevada dificuldade de dispersão em solução aquosa, devido as características da cumarina, e por este motivo, não serão mais considerados nos demais testes.

5.7 Capacidade de absorção dos filmes de quitosana/nanotubos de carbono

O estudo da absorção de solventes em nanocompósitos envolvendo polímeros é de grande interesse, tanto do ponto de vista científico, quanto industrial, devido à aplicabilidade em diversas áreas: como na liberação controlada de fármacos e cromatografia. Esse tipo de ensaio pode trazer informações importantes sobre o grau de interação entre o material de carga (MWCNT) e a matriz (BOKOBZA, 2006)

A capacidade de absorção das membranas foi determinada por meio do grau de intumescimento paulatino das membranas secas em água deionizada. A Tabela 6 mostra o percentual de absorção de água para cada filme durante 24 h.

Tabela 6: Percentual de absorção de água dos filmes.

	Quitosana pura	MWCNT/ C6-3	MWCNT/ C6-10	MWCNT/ C30-3	MWCNT/ C30-10
% de absorção	79%	78%	55%	59%	34%

De acordo com os percentuais de absorção apresentados na Tabela 6, o filme de quitosana pura apresenta maior percentual de absorção de água, devido aos grupos hidrofílicos presente na estrutura da quitosana, este resultado também foi apresentado em diversas (NIVETHAA *et al.* 2016; RABEA *et al.* 2003). Ao adicionar nanotubos de carbono, o percentual varia de acordo com a concentração de MWCNT/PS, os filmes com 0,1 (m/m) de MWCNT/PS apresentam menor percentual de absorção, devido as características hidrofóbicas dos nanotubos de carbono, além disso, Yang *et al.* (2010) relataram que filmes de MWCNT funcionalizado com poliestireno podem ser superhidrófobos, uma vez que o revestimento de poliestireno na superfície CNT pode inibir a absorção de moléculas de oxigênio.

Entretanto, o filme MWCNT/C6-3 exibiu praticamente a mesma absorção que o filme de quitosana pura, isto pode ser devido a grupos hidrofílicos tais como –OH, –COOH, presentes na superfície dos MWCNTs, após tratamento com ácido (WANG *et al.* 2005).

Para Yang *et al.* (2010) a capacidade de absorção da superfície é determinada pela morfologia e principalmente pela composição química da superfície. De acordo com o modelo de Wenzel (1936), o efeito de rugosidade pode amplificar a molhabilidade inerente do material. Se os CNTs são hidrofílicos, espera-se que um filme CNT rugoso seja

superhidrófilo; inversamente, se os CNTs são hidrofóbicos, então o modelo Wenzel prediz que um filme rugoso composto pelos CNT exibiria um comportamento superhidrofóbico. Dessa forma, a modificação da superfície dos nanotubos, juntamente com a morfologia são fatores determinantes para as características hidrofílicas ou hidrofóbicas.

Outro fator que pode ter contribuído para diferentes valores de absorção de água é sedimentação dos nanotubos durante a secagem, através de algumas micrografias, discutidas anteriormente, pode-se observar a sedimentação, o que pode favorecer superfícies com diferentes graus de hidrofobicidade.

5.8 Medidas de Impedância eletroquímica nos filmes de MWCNT/PS-Cumarina

Os resultados experimentais da impedância mostram que os nanocompósitos MWCNT/PS-quitosana 0,1 m/m formou uma melhor via de condução de elétrons na superfície do eletrodo, ou seja, os MWCNTs desempenharam um papel importante como mediador na transferência de elétrons. Isto é devido às características estruturais e morfológicas dos MWCNTs modificadas, a grande área de superfície e a excelente condutividade elétrica

Foi observado que os nanotubos presentes nos filmes são responsáveis pela melhor condução de elétrons, uma vez que o aumento da concentração de MWCNT/PS-Cumarina dispersos na matriz favoreceu a diminuição da impedância. Além disso, as cumarinas utilizadas não participaram ativamente nas mudanças de impedância, pequenas variações que ocorreram entre as cumarinas 6 e 30 foram aleatórias e podem ser devido a outros fatores. Assim como é mostrado pelo diagrama de Niquist, na Figura 40.

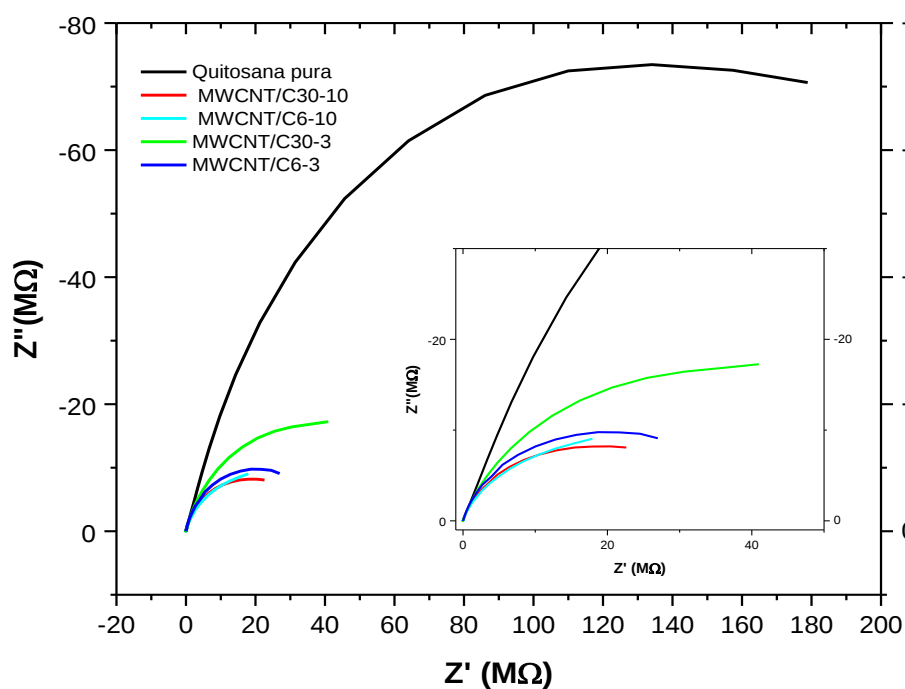


Figura 40: Impedância eletroquímica dos nanocompósitos MWCNT/PS-cumarina em filmes de quitosana.

Assim como foi mostrado pela Figura 40, houve uma diminuição da impedância com o aumento dos nanotubos, principalmente quando se observa a impedância para o filme de quitosana pura. No entanto, os semicírculos, que têm seus inícios mostrados nos gráficos, possuem elevado diâmetro, que está relacionado a baixos valores de condutividade.

5.9 Fluorescência dos filmes nanocompósitos MWCNT/PS-Cumarina em quitosana

Os espectros de fluorescência para os nanocompósitos em filme (Figura 41) mostram que os corantes incorporados nas nanopartículas de poliestireno exibem alta fluorescência. A cumarina 6 possui emissão máxima em 470 nm, nos filmes com 0,03 m/m é observada uma elevação na intensidade da fluorescência. Já nos filmes com maior concentração das nanopartículas (0,1 m/m) há diminuição na intensidade, isso pode ser devido a aglomeração de algumas nanopartículas (MINA, PUZYK, AND PUZYK 2013).

Os filmes de MWCNT com cumarina 30 apresentam maior intensidade de fluorescência, característica deste corante, e praticamente não há diferença entre os espectros de emissão dos filmes com 0,01 m/m e 0,03 m/m de MWCNT/PS-C30, indicando que as nanopartículas estão igualmente dispersas na matriz.

Contudo, os espectros de emissão dos filmes mostram que esta rota é eficiente para a síntese de filmes fluorescentes, onde são preservadas as características das nanopartículas utilizadas. Através dos resultados apresentados, pode-se afirmar que tanto os filmes com 0,1 m/m quanto 0,03m/m de MWCNT/PS-cumarina apresentam interessantes resultados, que podem ser selecionados e aperfeiçoados para futuras aplicações.

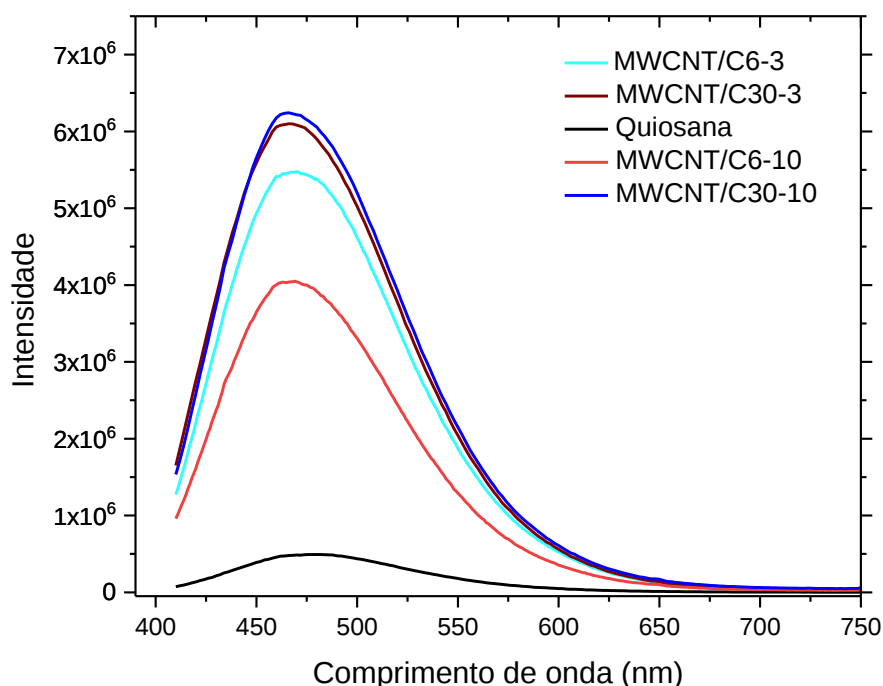


Figura 41: Espectros de fluorescência dos filmes.

5.10 Ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos realizados neste trabalho têm o objetivo inicial de avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes em relação a uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e outra Gram-negativa (*Escherichia coli*). E posteriormente, estudar a interação das nanopartículas presente nos filmes com a *Salmonella typhimurium* e a *Escherichia coli*. Estas bactérias Gram-negativas foram selecionadas por serem as principais bactérias identificadas em surtos de doenças transmitidas por alimentos.

5.10.1 Teste de difusão em ágar

O teste antimicrobiano foi realizado através do método de difusão em disco. A eficácia bactericida da quitosana depende de vários fatores, que podem ser classificados em quatro categorias: fatores microbianos relacionados as espécies de microrganismos; fator intrínseco da quitosana, incluindo peso molecular e concentração; estado físico, solução ou filme; e condições ambientais como pH e temperatura. (KONG *et al.* 2010)

A partir do teste de difusão foi observado que não houve zona de inibição em meio sólido, tanto para *Escherichia coli* quanto para a *Staphylococcus aureus*. Esta ausência de inibição pode ser justificada pela limitação da difusão de quitosana em meio ágar, assim como foi relatado nos trabalhos de Coma (2008) e Leceta *et al.* (2013). Além disso, foram utilizadas soluções com concentração de 10^7 UFC/mL, o que pode ter excedido a capacidade inibitória da quitosana e das nanopartículas de poliestireno no filme, assim como é relatado em Ponce *et al.* (2008).

Outros fatores que devem ser considerados é o tamanho das partículas presente nos filmes e a densidade de cargas, em algumas pesquisas foram relatadas que o efeito inibitório das nanopartículas de quitosana é maior, devido a capacidade de difusão e também do mecanismo de ação antimicrobiana. Além disso, quitosana comercial tem um valor intrínseco de pKa em torno de 6,5 e apenas cerca de 24% dos seus grupos amino primários são carregados positivamente nesta condição (MAO, 2006), considerando a interação eletrostática como um mecanismo determinante na atividade antibacteriana deste polímero.

5.10.2 Estudo sobre a interação dos microrganismos com a superfície dos filmes

Este teste teve o objetivo de avaliar o crescimento e interação da *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* após o contato com as superfícies dos filmes, assim como avaliar possíveis mudanças na fluorescência dos filmes. Através das micrografias de varredura dos filmes após contato com diferentes concentrações de suspensões de *E.coli* foi observado que houve crescimento microbiano, e pode-se considerar que em concentrações maiores de MWCNT/PS-cumarina o crescimento da *E.coli* foi relativamente menor, assim como mostram as figuras a seguir. Em todas micrografias abaixo são consideradas apenas a maior concentração (10^6 UFC/mL) durante 24 h em contato com os filmes.

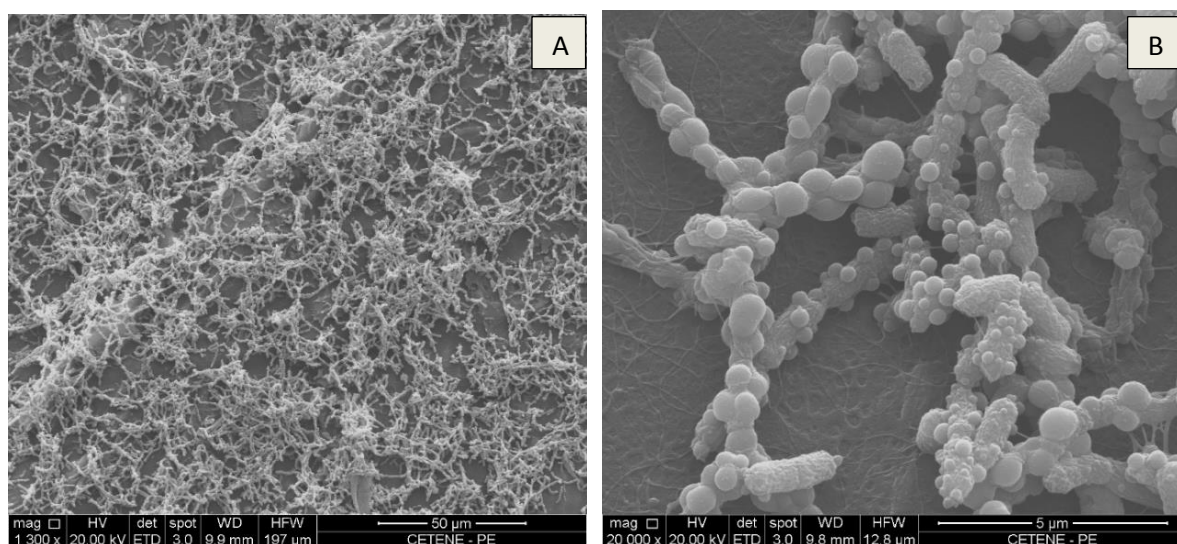


Figura 42: Micrografias do filme MWCNT/C6-3 após contato com *E.coli* 10^6 UFC/mL durante 24 h, com diferente magnificação. 1.300x (A), 20.000x (B).

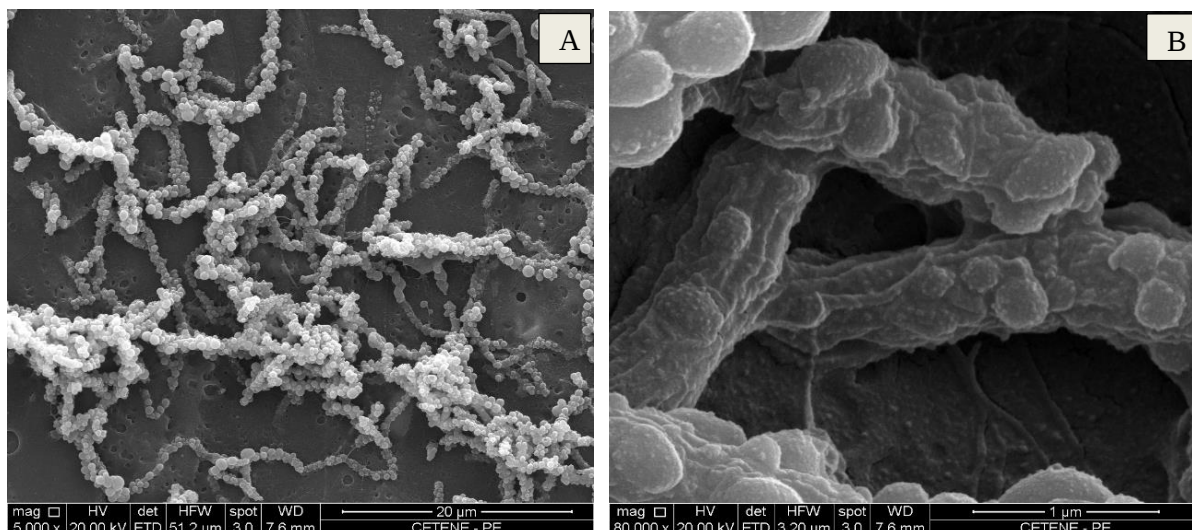


Figura 43: Micrografias do filme MWCNT/C6-10 após contato com *E.coli* 10^6 UFC/mL durante 24 h, com diferente magnificação. 5.000x (A), 80.000x (B).

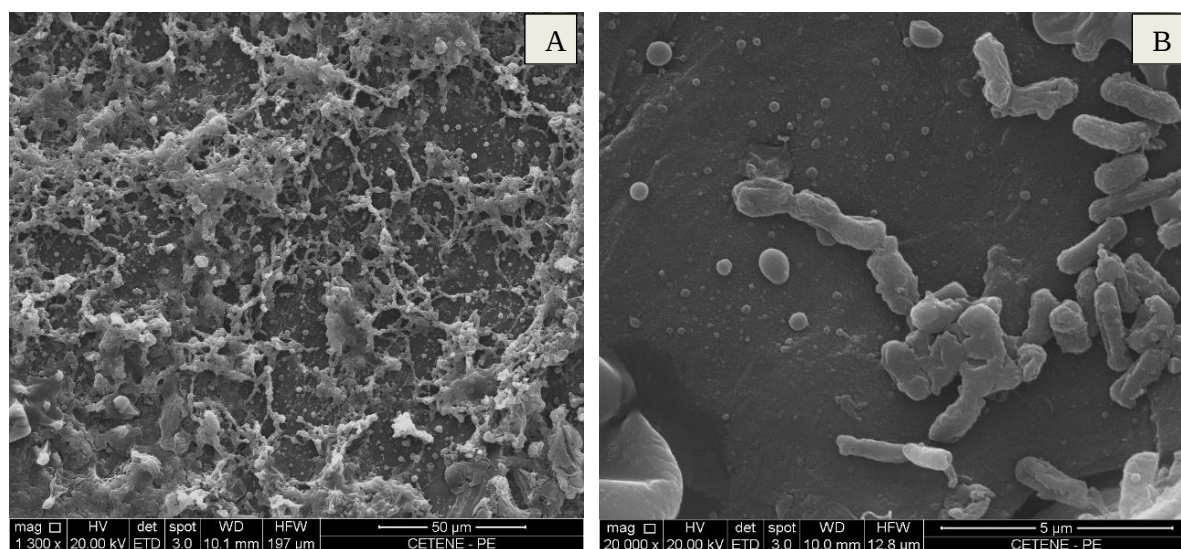


Figura 44: Micrografias do filme MWCNT/C30-3 após contato com *E.coli* 10^6 UFC/mL durante 24 h, com diferente magnificação. 1.300x (A), 20.000x (B).

As micrografias de MEV (Figuras 42-45) mostram que a estrutura da *E.coli* foi parcialmente danificada, foi observado também a presença de exopolissacarídeos aderidas em sua superfície, é observado também que enquanto as bactérias se aglomeravam na superfície dos filmes, as partículas de MWCNT/PS/quitosana interagiam e alteravam a permeabilidade da membrana. Segundo Kong et al. (2008) essa interação correlaciona-se com a interação hidrofóbica entre os MWCNT/PS-C/quitosana e os fosfolipídios das membranas citoplasmáticas das bactérias Gram-negativas.

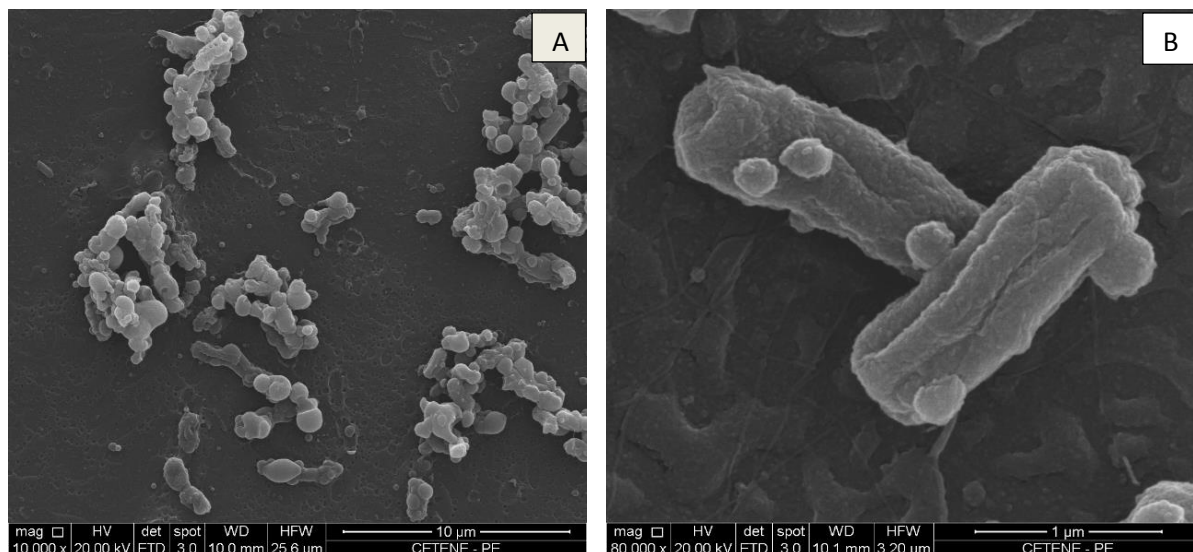


Figura 45: Micrografias do filme MW/C30-10 após contato com *E.coli* 10^6 UFC/mL durante 24 h, com diferente magnificação. 10.000x (A), 80.000x (B).

A carga positiva no C-2 do monômero de glucosamina em pH menor que 6 é responsável pela interação entre moléculas de quitosana carregadas positivamente e membranas de células microbianas carregadas negativamente, podendo levar ao vazamento de constituintes proteínicos e outros constituintes intracelulares (KONG et al. 2008). Com isso a atividade antibacteriana é diretamente proporcional à concentração e à propriedade hidrofóbica das partículas presentes nos filmes de quitosana.

As superfícies dos filmes MWCNT/PS-Cumarina, mostradas através das micrografias de MEV (Figuras 46-49), em contato com a bactéria *Salmonella Typhimurium* 10^6 UFC/mL durante 24 h indicam que as partículas aderiram à superfície bacteriana e que houve crescimento microbiano.

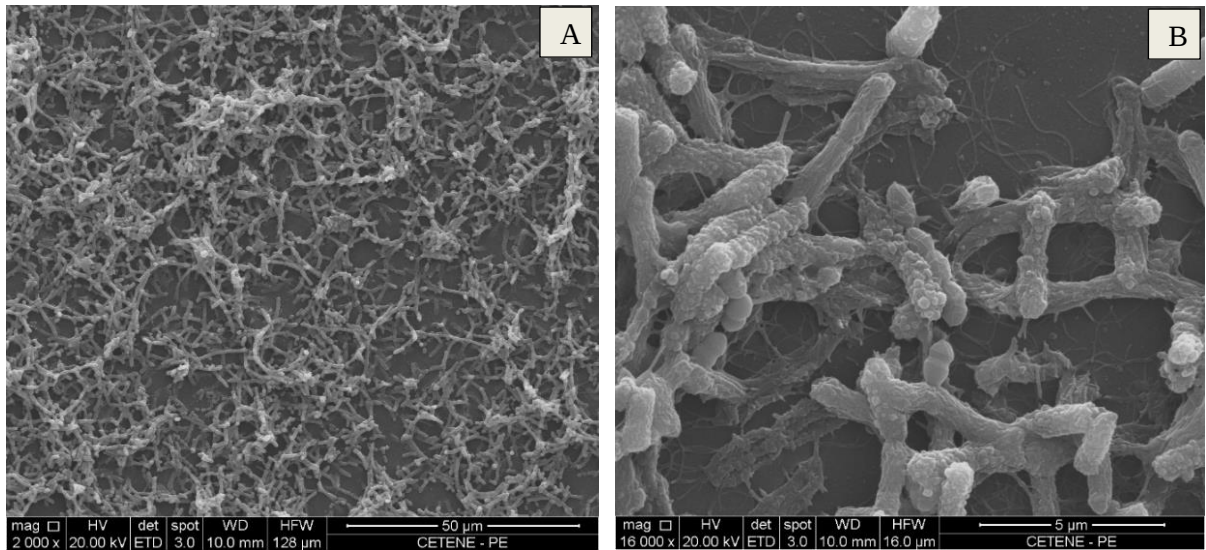


Figura 46: Micrografias do filme MWCNT/C6-3 após contato com *Salmonella typhimurium* 10^6 UFC/mL durante 24 h, com diferente magnificação, 2.000x (A), 16.000x (B).

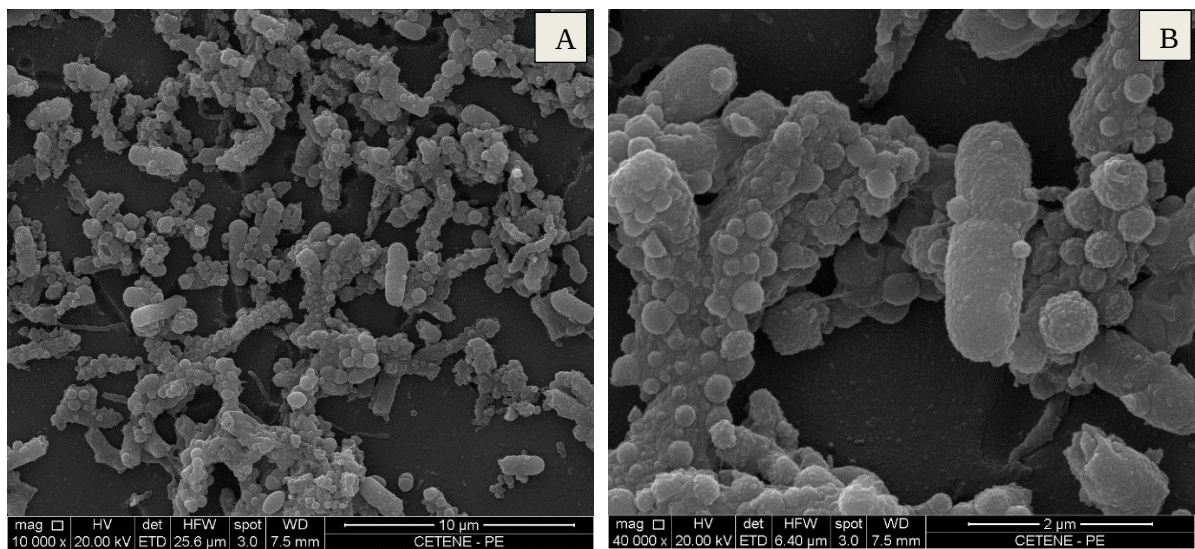


Figura 47: Micrografias do filme MW/C6-10 após contato com *Salmonella Typhimurium* 10^6 UFC/mL durante 24 h, com diferente magnificação. 10.000x (A), 40.000x (B).

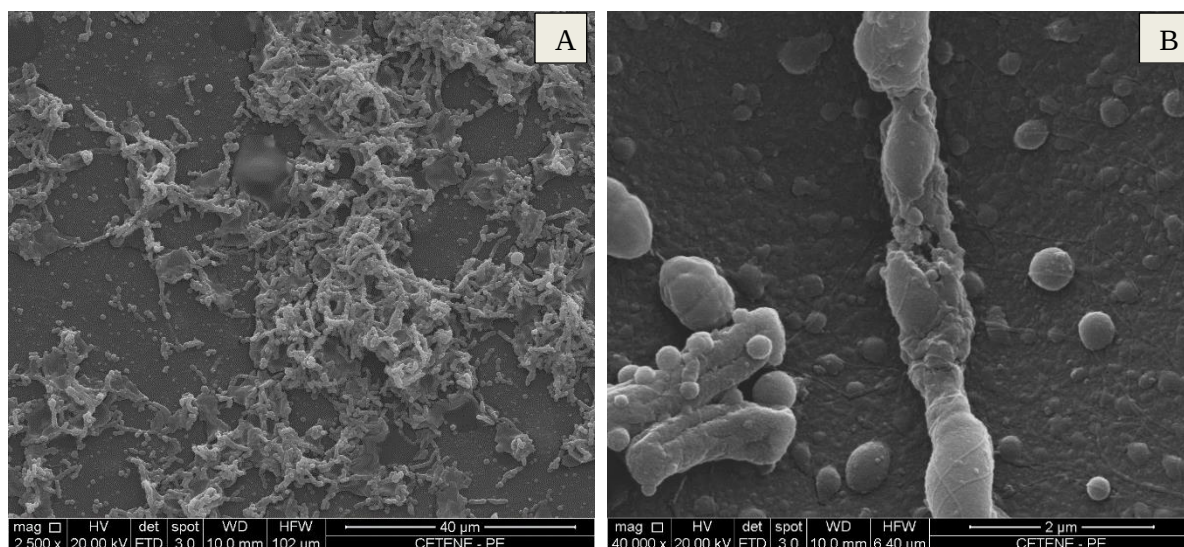


Figura 48: Micrografias do filme MWCNT/C30-3 após contato com *Salmonella Typhimurium* 10^6 UFC/mL durante 24 h, com diferente magnificação. 2.500x (A), 40.000x (B).

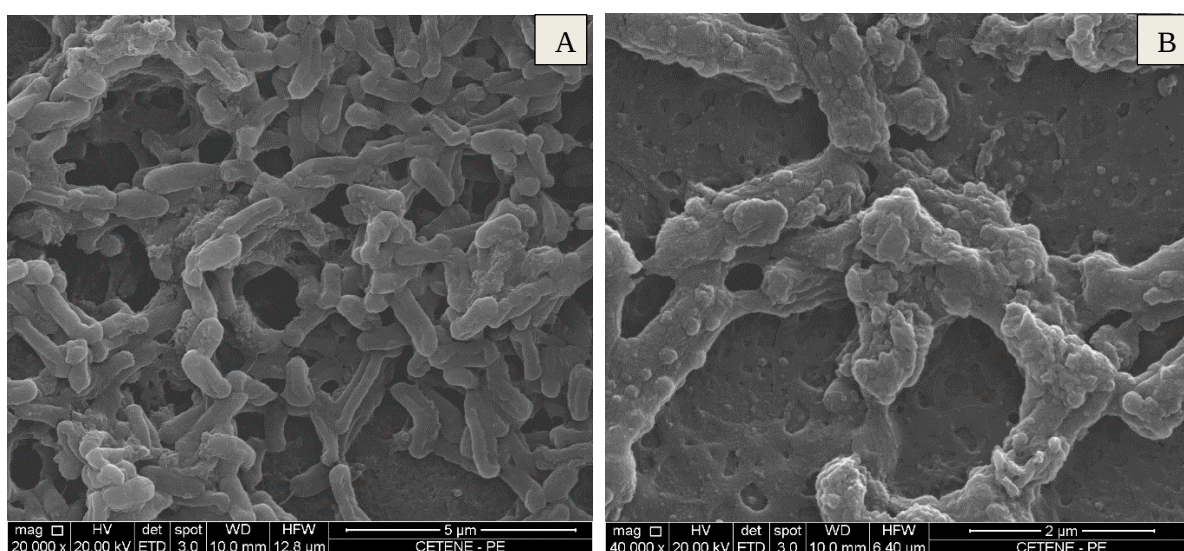


Figura 49: Micrografias do filme MW/C30-10 após contato com *Salmonella Typhimurium* 10^6 UFC/mL durante 24 h, com diferente magnificação. 20.000x (A), 40.000x (B).

A partir das micrografias de MEV (Figuras 46-49) das superfícies dos filmes em contato com a *Salmonella Typhimurium* foi também observado que a estrutura celular foi parcialmente danificada e que também houve adsorção de partículas na superfície da bactéria, no entanto, não foi observada ruptura celular. Estes resultados sugerem que o filme pode apresentar efeito antibacteriano, uma vez que houve interação entre o filme e as bactérias. Estudos semelhantes

sugerem que o efeito antibacteriano é proporcional a adsorção de partículas de quitosana à superfície celular.

O mecanismo de atuação da quitosana ainda está em discussão. Para Arkoun *et al.* (2017) a adsorção é proporcional ao tempo de contato e pode ser devido (1) a liberação de componentes intracelulares que podem se conectar à superfície de bactérias, refletindo a ruptura celular local, ou (2) a pequenas cadeias solúveis de quitosana que envolvem as células bacterianas *via* interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ou (3) ambas as possibilidades.

Arkoun *et al.* (2017) ainda afirma que tanto a quitosana liberada no meio quanto a que resta no material podem contribuir para o efeito antibacteriano, as cadeias de quitosana curtas podem, assim, penetrar na parede celular e perfurar a membrana plasmática, enquanto as cadeias mais longas podem bloquear as bactérias e evitar a troca celular com o meio.

Dessa forma, pode-se sugerir que o mecanismo de ação da quitosana é uma combinação complexa de diferentes efeitos bactericidas que podem ocorrer em diferentes estágios, no qual a adsorção de quitosana à superfície bacteriana é o primeiro passo, seguido de perfuração da membrana, vazamento de componentes intracelulares, tais como proteínas e nucleotídeos e, finalmente, lise celular e desintegração. Considerando também que parte da atividade antibacteriana possa ser devida à dissolução parcial, uma vez que disponibiliza quitosana em solução (ARKOUN *et al.* 2017).

As possíveis mudanças na fluorescência dos filmes, após contato com micro-organismos, foram estudadas através da espectroscopia de fluorescência (Figuras 50-53). Dentre os dois corantes orgânicos utilizados nos filmes, apenas a cumarina 6 apresentou deslocamento e diminuição da intensidade conforme interação com as bactérias. Para cumarina 30 as mudanças nas intensidades de fluorescência foram de forma desordenada. Desta forma, apenas serão mostrados e discutidos os espectros de fluorescência para os filmes MWCNT/C6-3 e MWCNT/C6-10 após as interações com *E.coli* e *Salmonella* na superfície.

Os espectros de fluorescência (Figuras 50-53) mostram que a solução fixadora utilizada, glutaraldeído e cacodilato de sódio, diminui a intensidade da fluorescência, isso pode ser devido a interações entre a cumarina com substituintes da solução fixadora.

De acordo com o espectro de fluorescência para o filme de MWCNT/C6-3 (Figura 50) a intensidade da fluorescência é em torno de $5,5 \times 10^6$ com o máximo de emissão em torno de 480 nm. Quando o filme interage com a solução de *E.coli* durante 1 h a intensidade da fluorescência diminui, principalmente para as maiores concentrações da solução de *E.coli*. Considerando as amostras em contato com a solução durante 24 h, é observado que a

intensidade da fluorescência é um pouco maior que a encontrada em 1 hora de contato. Outro fator interessante é que praticamente a concentração da solução não interferiu nos resultados.

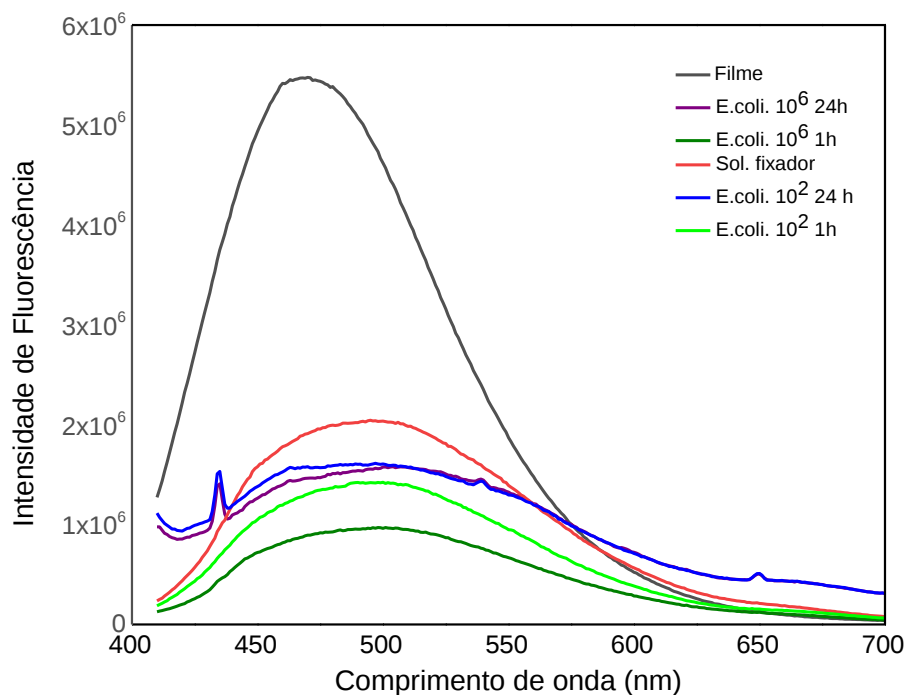


Figura 50: Espectros de fluorescência do filme MW/C6-3 após contato com *E.coli* 10^6 UFC/mL durante 24 h.

O filme MWCNT/C6-10 (Figura 51) apresentou máximo de fluorescência em torno de 470 nm com uma intensidade de $4,0 \times 10^6$, também foram exibidas algumas mudanças nos espectros de fluorescência, que em geral está mais relacionada com o tempo de interação entre as bactérias e o filme.

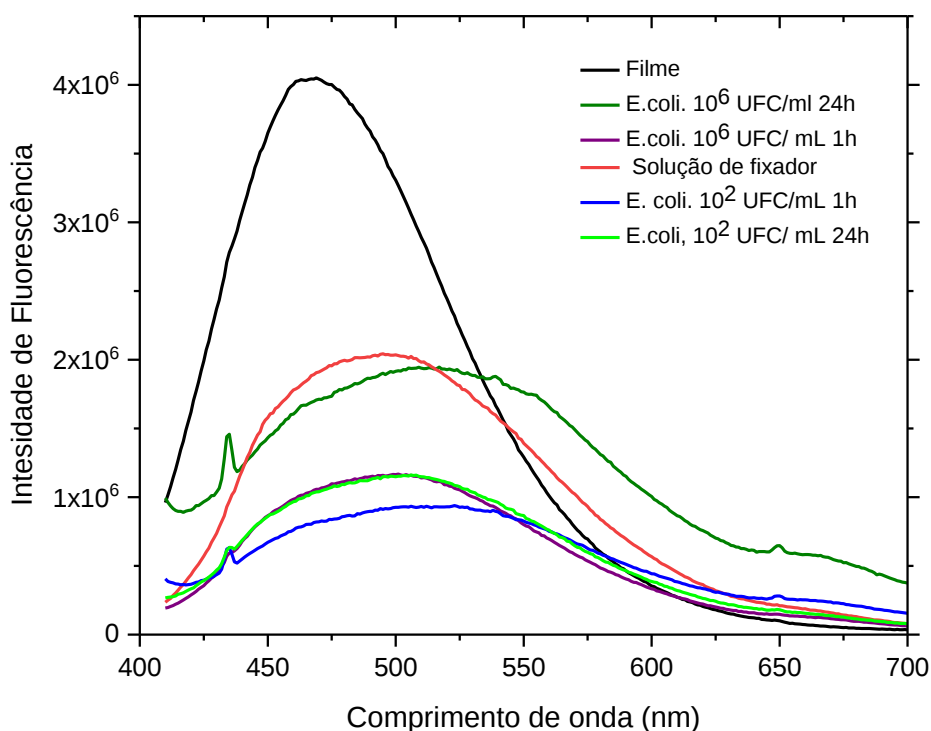


Figura 51: Espectros de fluorescência do filme MWCNT/C6-10 em contato com *E.coli*.

A *Salmonella* em contato com as superfícies dos filmes MWCNT/C6-3 (Figura 52) e MWCNT/C6-10 (Figura 53) também causam mudanças na intensidade de fluorescência. Assim como foi mostrado anteriormente, a solução fixadora também causa diminuição na intensidade da fluorescência. Mas a fluorescência é mais sensível ao crescimento bacteriano na superfície do filme. De forma geral, a solução com maior concentração bacteriana e o menor tempo (10^6 UFC/mL durante 1h) interfere mais ativamente na fluorescência. Na maioria dos filmes, a menor variação da intensidade de fluorescência ocorreu nas soluções com maior concentração e maior tempo (10^6 UFC/mL durante 24h). Essas mudanças na fluorescência podem estar relacionadas com as interações bactérias em crescimento nos filmes, uma vez que no período de 1h os microrganismos estão em crescimento e praticamente não há estruturas da *E.coli* ou *Salmonella* danificadas.

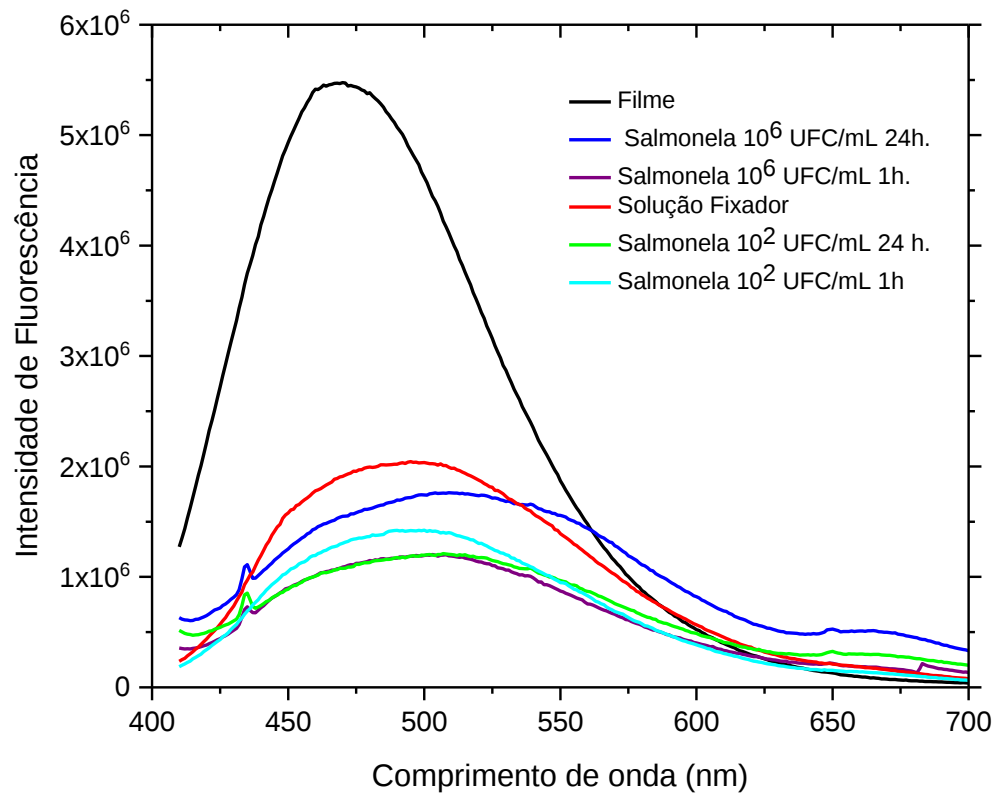


Figura 52: Espectros de fluorescência do MWCNT/C6-3 em contato com a *Salmonella Typhimurium*.

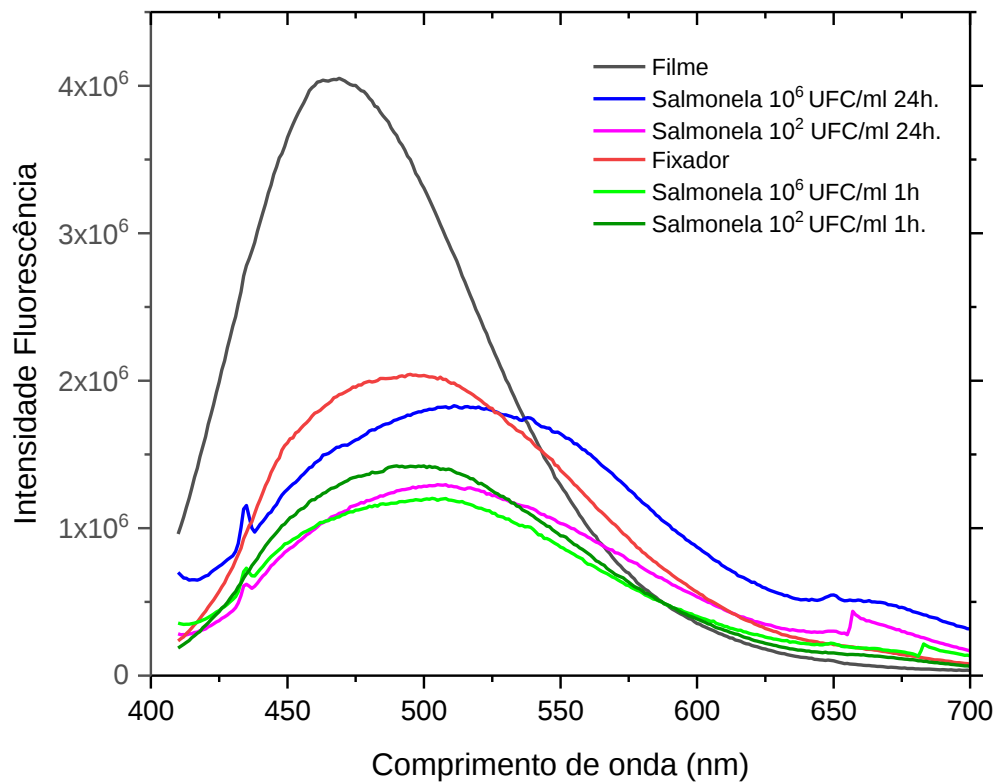


Figura 53: Espectros de fluorescência do MWCNT/C6-10 em contato com a *Salmonella Typhimurium*.

A partir dessa análise foi possível verificar que os nanocompósitos em filmes de quitosana permanecem com alta intensidade de fluorescência e sensibilidade a polaridade e pH do meio, foi visto que a concentração das nanopartículas também não interferem nas mudanças ocorridas com a intensidade de fluorescência. Além disso, os filmes exibiram interessantes interações com os microrganismos.

Nesse contexto, os filmes de MWCNT/PS-Cumarina apresentam propriedades bacterianas interessantes, uma vez que em todos os filmes as superfícies bacterianas sofreram pequenas alterações. Podendo representar, futuramente, biomateriais utilizados como barreiras bactericidas adequadas na prevenção de infecções bacterianas em várias áreas, incluindo embalagens de alimentos e aplicações biomédicas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi apresentada uma rota para a síntese de nanocompósitos de nanotubos de carbono em filme de quitosana. Os tratamentos de purificação e funcionalização se mostraram, respectivamente, muito eficientes na remoção de partículas metálicas, carbono amorfo e na adição de grupos funcionais nas superfícies dos nanotubos, sem interferir nas propriedades. Ao adicionar nanopartículas de PS/cumarina através de interações eletrostáticas são conferidos aos nanotubos de carbonos ótimas propriedades fluorescentes. Este procedimento de decoração foi eficiente, tanto para os MWCNTs quanto para o CNx. Entretanto, devido aos nitrogênios na estrutura, os CNx apresentaram maior número de nanopartículas na superfície.

A formação de filmes de quitosana com CNT/PS-Cumarina, através da mistura das dispersões, permitiu verificar que os MWCNT/PS-Cumarina são melhores dispersos na matriz de quitosana, devido a facilidade de dispersão em solução de ácido acético. Em geral, os filmes possuem alta fluorescência na região de 480 nm, com poucas variações na intensidade ou comprimento de onda, devido a cumarina utilizada ou formação de nanopartículas aglomeradas. Em termos macroscópicos e microscópicos, os filmes formados são bem maleáveis, homogêneos, apresentam também alta rugosidade, boa dispersão das nanopartículas e forte interação entre os materiais, essas interessantes características estão relacionadas com as ligações de hidrogênio formada entre a quitosana e MWCNT/PS-cumarina.

As medidas de impedância eletroquímica mostraram que em maiores concentrações de nanotubos de carbono (0,1 m/m) há melhor condução de elétrons na superfície do eletrodo. Maiores concentrações de nanotubos também interferem na absorção de água, através das medidas do grau de intumescimento paulatino foi mostrado que os filmes com 0,1 m/m de MWCNT/PS-cumarina absorvem uma menor quantidade de água, exibindo um percentual de hidrofobicidade, que também pode ser modificado pela adição de substituintes hidrofílico ou hidrofóbico. Além disso, a sedimentação dos nanotubos favorece pequenas mudanças nas hidrofobicidade das superfícies, o que promove a aplicação em materiais que necessitem de superfícies diferentes.

Ao investigar a atividade antimicrobiana foi observado que os filmes a base de quitosana não apresentaram halo de inibição em meio sólido, tanto para *Escherichia coli* quanto para a *Staphylococcus aureus*. Esta ausência de inibição pode ser justificada pela limitação da difusão

de quitosana em meio sólido, e também as concentrações utilizadas (10^7 UFC/mL) pode ter excedido a capacidade inibitória da quitosana e das nanopartículas de poliestireno no filme.

Os filmes MWCNT/PS-Cumarina em contato com solução bacteriana causaram pequenas alterações na estrutura da *E. coli* e *Salmonella*. Estes resultados mostram que os filmes podem danificar a estrutura das bactérias através de um efeito inibidor de contato interfacial na superfície dos filmes. Além disso, a intensidade da fluorescência também foi alterada conforme a concentração bacteriana e tempo de contato com as bactérias, indicando também que o nanocompósito pode ser aperfeiçoado para a utilização no sensoriamento de bactérias.

Estes resultados mostram que os nanocompósitos formados possuem diversas funções interessantes, que podem ser aplicados em embalagens de alimentos, materiais de proteção, sensoriamento de microambientes, identificação e controle de alguns patógenos. Entretanto, é importante ressaltar que os filmes produzidos neste trabalho possuem propriedades básicas adequadas para a utilização nestes campos, mas que serão necessários testes mais específicos e detalhados para uma efetiva utilização nestas áreas de aplicação.

7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Realizar ensaios mecânicos;
- Investigar a origem da banda de fluorescência em 440 nm para as nanopartículas PS/C6 e PS/C30;
- Realizar medidas de ângulo de contato para verificar o grau de hidrofobicidade dos filmes;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da quitosana para *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*,
- Investigar os fatores responsáveis pelas mudanças na intensidade e comprimento de onda dos filmes após interações com bactérias;
- Investigar a citotoxicidade dos filmes.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Rasha A.; FEKRY, Amany M.; FARGHALI, R. A. A study of calcium carbonate/multiwalled-carbon nanotubes/chitosan composite coatings on Ti–6Al–4V alloy for orthopedic implants. **Applied Surface Science**, v. 285, p. 309-316, 2013.
- AKRAM, Zikra; KAUSAR, Ayesha; SIDDIQ, Muhammad. Scrutinization of Polystyrene Microsphere-grafted Multiwalled Carbon Nanotube and Silver Nanoparticle-based Hybrids: Morphology, Thermal Properties, and Antibacterial Activity. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 56, n. 2, p. 202-215, 2017.
- ARKOUN, Mounia et al. Antibacterial electrospun chitosan-based nanofibers: A bacterial membrane perforator. **Food Science & Nutrition**, 2017.
- ARNAUD, Thatiana. Preparação, caracterização e aplicação de nanocompósitos de quitosana/quantum dots fluorescentes. 2012
- ARYAEI, Ashkan, AHALAPITIYA H. Jayatissa, and Ambalangodage C. Jayasuriya. “Mechanical and Biological Properties of Chitosan/carbon Nanotube Nanocomposite Films.” **Journal of Biomedical Materials Research - Part A** 102 (8): 2704–12, 2014.
- AYALA, P. et al. The doping of carbon nanotubes with nitrogen and their potential applications. **Carbon**, v. 48, n. 3, p. 575-586, 2010.
- BADAIRE, Stéphane et al. Liquid crystals of DNA-stabilized carbon nanotubes. **Advanced Materials**, v. 17, n. 13, p. 1673-1676, 2005.
- BOKOBZA, Liliane; Kolodziej, Mélanie. On the use of carbon nanotubes as reinforcing fillers for elastomeric materials. **Polymer International**, 55, p. 1090–1098. 2006.
- BOTELLO-MÉNDEZ, A., Campos-Delgado, J., Morelos-Gómez, A., et al., Controlling the dimensions, reactivity and crystallinity of multiwalled carbon nanotubes using low ethanol concentrations. **Chemical physics letters**; 453(1–3), p. 55-61. 2008
- BRASIL. 2017. “Ministério Da Saúde Surtos de Doenças Transmitidas Por Alimentos No Brasil. Acessado em ”<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/>
- CAETANO, Guilherme Ferreira et al. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 103, n. 5, p. 1013-1022, 2015
- CALLISTER JÚNIOR, William D. Ciência e engenharia de materiais. **Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora SA**, 2002.
- CHATTERJEE, S. et al. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 395-400, 2005.
- CHERN, C. S. Emulsion polymerization mechanisms and kinetics. **Program Polymer Science**, v. 31 p. 443–486, 2006.

CHIANG, I. W. et al. Purification and characterization of single-wall carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 6, p. 1157-1161, 2001.

CHIPARA, Dorina M. et al. Raman spectroscopy of polystyrene nanofibers—Multiwalled carbon nanotubes composites. **Applied Surface Science**, v. 275, p. 23-27, 2013.

COMA, Véronique. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, n.78, p. 90–103. 2008

DALLAN, Paula Rulf Marreco et al. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. 2005.

DATSYUK, V. et al. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, n. 6, p. 833-840, 2008.

DE MIRANDA, Jacques Antonio. **Caracterização fotofísica de derivados de cumarinas**. 2001. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia.

DE PAULA, Rodrigo. **Aplicação de uma cumarina como sonda fluorescente e caracterização fotofísica e espectroscópica de três análogos de psoraleno em meios homogêneo e microheterogêneo**. 2012. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Uberlândia. Instituto de Química, 2003. Disponível em:< http://www.laftc.iqufu.ufu.br/textos/Dissertacao_Rodrigo.pdf>. Acesso em: 22 mar.

DE SOUZA FILHO, Antônio Gomes; FAGAN, Solange Binotto. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química nova**, v. 30, n. 7, p. 1695, 2007.

DIAS, Marali Vilela. Filmes a base de quitosana incorporados com α -tocoferol e montmorilonita para aplicação em embalagens funcional e antioxidante. 2013.

DOWNING, Bryan D. et al. Seeing the light: The effects of particles, dissolved materials, and temperature on in situ measurements of DOM fluorescence in rivers and streams. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 10, n. 10, p. 767-775, 2012.

EBBESEN, T. W., Lezec, H. J., Hiura, H., Bennett, J. W., Ghaemi, H. F., Thio, T., Electrical conductivity of individual carbon nanotubes. **Nature**, v. 382, p.54-56, 1996

ELIAS, A.L., Botello-Mendez, A.R., Meneses-Rodriguez, D., et al., Longitudinal cutting of pure and doped carbon nanotubes to form graphitic nanoribbons using metal clusters as nanoscalpels. **Nano Lett**, 10(2) p.366-72. 2010.

EL-KEMARY, Maged; RETTIG, Wolfgang. Multiple emission in coumarins with heterocyclic substituents. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 5, n. 23, p. 5221-5228, 2003.

FAI, a. E. C.; Stamford, Thaiza. C.M.; Stamford, Tânia. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435–451. 2008

GEIM, Andre K.; NOVOSELOV, Konstantin S. The rise of graphene. **Nature materials**, v. 6, n. 3, p. 183-191, 2007.

GEORGAKILAS, Vasilios; Perman, Jason A.; Tucek, Jiri; Zboril, Radek. Broad Family of Carbon Nanoallotropes: Classification , Chemistry , and Applications of Fullerenes , Carbon Dots , Nanotubes , Graphene , Nanodiamonds , and Combined Superstructures. **Chemical Reviews**, v. 115, n.11, p. 4744–4822. 2015

GÜNER, Ahmet et al. An electrochemical immunosensor for sensitive detection of Escherichia coli O157: H7 by using chitosan, MWCNT, polypyrrole with gold nanoparticles hybrid sensing platform. **Food Chemistry**, v. 229, p. 358-365, 2017.

HERBST, Marcelo Hawrylak; Fernandes Macêdo, Maria Iaponeide; Rocco, Ana Maria. Tecnologia dos nanotubos de carbono: Tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992. 2004

HONG, Guosong et al. Carbon nanomaterials for biological imaging and nanomedicinal therapy. **Chemical reviews**, v. 115, n. 19, p. 10816-10906, 2015.

HU, Huating et al. Facile and green method for polystyrene grafted multi-walled carbon nanotubes and their electroresponse. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 396, p. 177-181, 2012.

HU, Kun et al. A carbon nanotubes based fluorescent aptasensor for highly sensitive detection of adenosine deaminase activity and inhibitor screening in natural extracts. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 95, p. 164-168, 2014.

IVANCIC, Tina; JAMNIK, Polona; STOPAR, David. Cold shock CspA and CspB protein production during periodic temperature cycling in Escherichia coli. **BMC research notes**, v. 6, n. 1, p. 248, 2013.

JUNRONG, Yu; Kangbo, Lu; Erwan, Sourty; Nadia, Grossiord; Cor, Koning; Joachim, Loos. Characterization of conductive multiwall carbon nanotube/polystyrene composites prepared by latex technology. **Carbon**, v. 45, n. 15, p. 2897–2903. 2007.

KADHEMY, Mahasin F. Hadi, Zahraa S. Rasheed, and Sanaa R. Salim. 2016. “Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Irradiation Coumarin Doped Polystyrene Polymer Films by Alpha Ray.” **Journal of Radiation Research and Applied Sciences** 9 (3). Elsevier Ltd: 321–31. doi:10.1016/j.jrras.2016.02.004.

KAHRU, Anne; Ivask, Angela. Mapping the dawn of nanoecotoxicological research. **Accounts of chemical research**. 2013.

KAMALAKARAN, R., Terrones, M., Seeger, T., et al., Synthesis of thick and crystalline nanotube arrays by spray pyrolysis. **Applied Physics Letters**, 77(21), p. 3385-3387. 2000.

KAROUSIS, Nikolaos; TAGMATARCHIS, Nikos; TISIS, Dimitrios. Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 9, p. 5366-5397, 2010.

KHOR, Eugene; Lim, Lee Yong. Implantable applications of chitin and chitosan Eugene. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339–2349. 2003

KONG, Ming et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, n. 2, p. 197-202, 2008.

KONG, Ming et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KOZÁK, Ondřej et al. Photoluminescent carbon nanostructures. **Chemistry of Materials**, v. 28, n. 12, p. 4085-4128, 2016.

KRUEGER, Anke. **Carbon materials and nanotechnology**. John Wiley & Sons, 2010.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed.; Springer Science+Business Media, LLC: New York, 2006.

LECETA, I. et al. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food engineering**, v. 116, n. 4, p. 889-899, 2013.

LEE, Jung-Hyun, et al. "Dye-labeled polystyrene latex microspheres prepared via a combined swelling-diffusion technique." *Journal of colloid and interface science* 363.1 (2011): 137-144.

LI, Botian et al. Synthesis and characterization of covalently colored polymer latex based on new polymerizable anthraquinone dyes. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 18, p. 1893-1900, 2012.

LI, Yinyong; Guo, Xiaolei; Lin, Pengfei; Fan, Congcheng; Song, Yihu. Preparation and functional properties of blend films of gliadins and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, n. 81 p. 484–490. 2010.

LIAO, Xiaoxia; ZHANG, Xuewu. Preparation, characterization and cytotoxicity of carbon nanotube–chitosan–phycocyanin complex. **Nanotechnology**, v. 23, n. 3, p. 035101, 2011.

LIU, Y; Li, W; Lao F, Liu Y; Wang, L; Bai, R; Zhao, Y; Chen, C. Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and and chromosomes. **Biomaterials**, v. 32 p. 8291–8303. 2011.

LUNOV, Oleg; Syrovets, Tatiana; Loos, Cornelia; Beil, Johanna; Delacher, Michael; Tron, Kyrlyo; Nienhaus, G. Ulrich; Musyanovych, Anna; Mailänder, Volker; Landfester, Katharina and Simmet, Thomas. Differential Uptake of Functionalized Polystyrene Nanoparticles by Human Macrophages and a Monocytic Cell Line. **ACS nano**, vol. 5, n. 3, p. 1657–1669. 2011.

MA, Zhenxiong; Liu, Junliang; Chen, Ye; Zhang, Qitao; Zhang, Ming; and Ohno, Teruhisa. Facile preparation and characterization of luminescent polystyrene composite microspheres. **New J. Chem.**, 37, p. 2133—2138. 2013.

MAJOWICZ, Shannon E. ; Musto, Jennie; Scallan, Elaine; J. Angulo, Frederick; Kirk, Martyn; O'Brien, Sarah J. ; Jones, Timothy F.; Fazil, Aamir; Hoekstra, Robert M. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. **Food Safety**, n. 50, p. 882-889. 2010.

MAKWANA, Pinakin K; Jethva, Prashant N; Roy, Ipsita. Coumarin 6 and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) as fluorescent probes to monitor protein aggregation. **The Analyst**. V. 136, n. 10, p. 2161-2167. 2011

MALAFAYA, Patricia B.; Silva, Gabriela A.; Reis, Rui L. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4-5, p.207–233. 2007

MALLAKPOUR, Shadpour; Madani, Maryam. Valine amino acid-functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan green nanocomposite membranes: Synthesis and characterization. **High Performance Polymers**, v. 27, n.7, p. 793-801. 2015

MINA, M. V.; Puzyk, I. P.; Puzyk, M. V. The Effect of Acids on Fluorescence of Coumarin-6 in Organic Solvents. **Optics and Spectroscopy**, v. 114, n. 2, p. 244–246. 2013.

NAVARRO, Hugo; Vidal, Miguel A.; Terrones, Humberto; Terrones, Mauricio. Controlling the dimensions, reactivity and crystallinity of multiwalled carbon nanotubes using low ethanol concentrations. **Chemical Physics Letters**, V. 453, p. 55-61. 2008.

NEDUMPARA, Ritty J.; Thomas K. J.; Jayasree V. K.; C. P. Girijavallabhan; V. P. N. Nampoori; and P. Radhakrishnan. Study of solvent effect in laser emission from Coumarin 540 dye solution. **Applied optics**. V. 46, n. 21, p. 4786-4792, 2007.

NIVETHAA, E. A. K. et al. Fabrication of chitosan/MWCNT nanocomposite as a carrier for 5-fluorouracil and a study of the cytotoxicity of 5-fluorouracil encapsulated nanocomposite towards MCF-7. **Polymer Bulletin**, v. 73, n. 11, p. 3221-3236, 2016.

NOMURA, Toshiyuki; Fujisawa, Eri; Itoh, Shikibu; Konishi, Yasuhiro. Comparison of the cytotoxic effect of polystyrene latex nanoparticles on planktonic cells and bacterial biofilm. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 6, p. 1-9. 2016.

O'CONNELL, M. J., Carbon nanotubes: properties and applications., **CRC Press.**, 2006.

OH, Minju; Sun, Fangfang; Jieun, Hee-ryung Cha; Junggoo, Park; Kim, Moojin Soo; Kyoung-bo Kim; Kim, Hyung; Lee, Jaebeom; Lee, Dongyun. Vertically aligned multi-layered structures to enhance mechanical properties of chitosan – carbon nanotube films. **Journal of Materials Science**, v. 50, n.6, p. 2587-2593. 2015.

PEREDA, Mariana; AMICA, Guillermina; MARCOVICH, Norma E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1318-1325, 2012.

PONCE, Alejandra G. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo studies. **Postharvest biology and Technology**, v. 49, n. 2, p. 294-300, 2008.

QIAN, Zhaosheng et al. The visible photoluminescence mechanism of oxidized multi-walled carbon nanotubes: an experimental and theoretical investigation. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 2, p. 307-314, 2013.

RABEA, Entsar I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

RAIKAR, U. S. et al. Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of coumarins 6 and 7 molecules: determination of ground and excited state dipole moment. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 65, n. 3, p. 673-677, 2006.

REGIEL, Anna et al. Preparation and characterization of chitosan–silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. **Nanotechnology**, v. 24, n. 1, p. 015101, 2012.

REGIEL, Anna; Irusta, Silvia; Kyzioł, Agnieszka; Arruebo, Manuel; Santamaria, Jesus. Preparation and characterization of chitosan-silver nanocomposite films and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. **Nanotechnology**, v. 24, n. 1, p. 015101, 2013

RIBEIRO, Juliana. Fotofísica e determinação de parâmetros fotodinâmicos da ftalocianina de zinco em meios homogêneo e microheterogêneo. **Instituto de Química-Programa de Pós-Graduação em Química**, 2003.

RIPPEL, Márcia M. et al. Skim and cream natural rubber particles: colloidal properties, coalescence and film formation. **Journal of colloid and interface science**, v. 268, n. 2, p. 330-340, 2003.

S. CORRENT, P. Hahn, G. Pohlers, T. J. Connolly, J. C. Scaiano, V. Fornes and H. Garcia, **J. Phys. Chem.** v. 102, p. 5852–5858. 1998.

SADAT EBRAHIMI, Mir-Morteza; VOSS, Yvonne; SCHÖNHERR, Holger. Rapid detection of *Escherichia coli* via enzymatically triggered reactions in self-reporting chitosan hydrogels. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 36, p. 20190-20199, 2015.

SAKELLARIOU, Georgios; PRIFTIS, Dimitrios; BASKARAN, Durairaj. Surface-initiated polymerization from carbon nanotubes: strategies and perspectives. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 2, p. 677-704, 2013.

SAKUMA, Shinji et al. Toxicity studies of coumarin 6-encapsulated polystyrene nanospheres conjugated with peanut agglutinin and poly (N-vinylacetamide) as a colonoscopic imaging agent in rats. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1227-1236, 2015.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, Laura et al. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate polymers**, v. 82, n. 2, p. 277-283, 2010.

SATPATI, Ashis Kumar et al. Photophysical investigations of the solvent polarity effect on the properties of coumarin-6 dye. **Chemical physics letters**, v. 407, n. 1, p. 114-118, 2005.

SATYANARAYANA, M.; REDDY, K. Koteswara; GOBI, K. Vengatajalabathy. Multiwall carbon nanotube ensembled biopolymer electrode for selective determination of isoniazid in vitro. **Analytical Methods**, v. 6, n. 11, p. 3772-3778, 2014.

SENTHILKUMAR, Sadasivam; NATH, Sukhendu; PAL, Haridas. Photophysical Properties of Coumarin-30 Dye in Aprotic and Protic Solvents of Varying Polarities. **Photochemistry and photobiology**, v. 80, n. 1, p. 104-111, 2004.

SOUZA, Geovany Albino de et al. Caracterização fotofísica e morfológica de estruturas peptídicas contendo composto fluorescente para aplicação ambiental. 2014.

SPERLING. Leslie Howard. Introduction to Physical Polymer Science, 4th Edition Wiley, 2006

SPINKS, Geoffrey M. et al. Mechanical properties of chitosan/CNT microfibers obtained with improved dispersion. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 115, n. 2, p. 678-684, 2006.

SPITALSKY, Zdenko et al. Carbon nanotube–polymer composites: chemistry, processing, mechanical and electrical properties. **Progress in polymer science**, v. 35, n. 3, p. 357-401, 2010.

STAMFORD Arnaud, Thatiana Montenegro. **Preparação, caracterização e aplicação de nanocompósitos de quitosana/quantum dots fluorescentes**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Programa de pós-graduação em ciências dos materiais.

SURYANTO, Bryan HR et al. Hydrothermally Driven Transformation of Oxygen Functional Groups at Multiwall Carbon Nanotubes for Improved Electrocatalytic Applications. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 51, p. 35513-35522, 2016.

TERRONES, Mauricio. Science and technology of the twenty-first century: synthesis, properties, and applications of carbon nanotubes. **Annual review of materials research**, v. 33, n. 1, p. 419-501, 2003
 UDDIN, A.; LEE, C. B.; ANDERSSON, T. G. Initial rise of transient electroluminescence in doped Alq3 films. **physica status solidi (a)**, v. 207, n. 10, p. 2334-2338, 2010.

VÉRONIQUE, C. O. M. A. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat science**, v. 78, n. 1, p. 90-103, 2008.

VIJILA, C. et al. Role of dipole moment of solvents in formation and stabilization of the TICT states in Coumarin 445 under nitrogen laser excitation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 57, n. 3, p. 491-497, 2001.

WANG, Shao-Feng et al. Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3067-3072, 2005.

WANG, Yuhuang et al. A highly selective, one-pot purification method for single-walled carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 6, p. 1249-1252, 2007.

WENZEL, Robert N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 988-994, 1936.

WU, Tzong-Ming; CHEN, Erh-Chiang. Preparation and characterization of conductive carbon nanotube–polystyrene nanocomposites using latex technology. **Composites Science and Technology**, v. 68, n. 10, p. 2254-2259, 2008.

XIE, Yili et al. Carbon nanotube based polymer nanocomposites: biomimic preparation and organic dye adsorption applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 100, p. 82503-82512, 2015.

YANG, Jin et al. Reversible superhydrophobicity to superhydrophilicity switching of a carbon nanotube film via alternation of UV irradiation and dark storage. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 10198-10202, 2010.

YU, Hou-Yong et al. Reinforcement of transparent poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by incorporation of functionalized carbon nanotubes as a novel bionanocomposite for food packaging. **Composites Science and Technology**, v. 94, p. 96-104, 2014.

ZANNOTTI, Marco, Rita Giovannetti, Chiara Anna D’Amato, and Elena Rommozzi. “Spectroscopic Studies of Porphyrin Functionalized Multiwalled Carbon nanotubes and their interaction with TiO₂

nanoparticles surface.” **Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** **153**. Elsevier, p. 22-29, 2016.

ZHONG, Yu; SONG, Xiaoyong; LI, Yunfei. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 335-342, 2011.