



Raquel dos Santos Martins

Impregnação do Bambu, *Dendrocalamus giganteus*, com diferentes nanopartículas de prata para prevenir ataques de fungos.

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Omar Pandoli

Rio de Janeiro
Julho de 2016



Raquel dos Santos Martins

Impregnação do Bambu, *Dendrocalamus giganteus*, com diferentes nanopartículas de prata para prevenir ataques de fungos.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Omar Pandoli

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Khosrow Ghavami

Departamento de Engenharia Civil - PUC-Rio

Profa. Fatima Ventura Pereira Meirelles

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Sidnei Paciornik

Departamento de Engenharia de Materiais - PUC-Rio

Profa. Karen Lúcia De Toni

Instituto de Pesquisa Jardim Botânico

Prof. José Roberto Moraes D'Almeida

Departamento de Engenharia de Materiais - PUC-Rio

Prof. Márcio da Silveira Carvalho

Coordenador Setorial do Centro

Técnico-Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 11 de julho de 2016

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Raquel dos Santos Martins

Graduou-se em Licenciatura Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) em 2013. Possui experiência como docente e em pesquisa e desenvolvimento de colorações capilares.

Ficha Catalográfica

Martins, Raquel dos Santos

Impregnação do Bambu, *Dendrocalamus giganteus*, com diferentes nanopartículas de prata para prevenir ataques de fungos./ Raquel dos Santos Martins; orientador: Omar Pandoli. – 2016.

145 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2016.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Bambu. 3. Nanopartículas de prata. 4. Impregnação. I. Pandoli, Omar. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

*Dedico este trabalho ao meu Deus e
à toda minha família.*

Agradecimentos

Ao meu Deus, por ter me conduzido e me abençoado em todo trabalho realizado.

Aos meus pais, Rosivane e José Ailton, por toda paciência, cuidado e estrutura que me serviu como base até aqui.

Ao meu irmão, Ailton Rafael, à minha cunhada e sobrinha, Débora e Rafaella, por todo o carinho e apoio.

Ao meu orientador, Omar, pela oportunidade e conhecimento fornecido;

Aos meus amigos queridos Druval, Joseany, Leonardo e Silvânia pelo companheirismo, cumplicidade e conhecimento fornecido.

Ao Eric Cardona, pela predisposição em nos ajudar nas análises de microscopia eletrônica.

Ao Professor Sidnei e sua equipe, Haimon e Marcos pela disponibilidade em nos ajudar com as análises no microtomógrafo.

À Professora Karen e sua equipe, Bruna e Marília, por nos ajudar com as análises de microscopia confocal e pelo conhecimento disponibilizado.

Ao Hirschel, por nos ajudar com as análises das imagens tomográficas.

Ao Professor Khosrow Ghavami, pela oportunidade e bolsa de estudos.

Ao Eric Luz e Bernardo, pelo conhecimento disponibilizado.

Ao Henrique e Yuri, por disponibilizar a máquina de corte preciso.

À Fátima, secretária da Pós-graduação do Departamento de Química da PUC-Rio e a toda equipe.

Ao CNPq pela bolsa de estudo fornecida.

Resumo

Martins, Raquel dos Santos; Pandoli, Omar. **Impregnação do Bambu, *Dendrocalamus giganteus*, com diferentes nanopartículas de prata para prevenir ataques de fungos**. Rio de Janeiro, 2016. 145p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O uso do bambu como reforço em matrizes poliméricas é uma ideia consolidada. No entanto, o bambu é suscetível a ataques microbianos, onde consiste uma das principais limitações para seu uso. Este trabalho teve como principal objetivo a impregnação interna do bambu *Dendrocalamus giganteus* Wallex Munro com nanopartículas de prata (NPs-Ag), com potencial antifúngico, sintetizadas com dois estabilizantes diferentes (citrato trissódico e quitosana). As seções impregnadas foram analisadas verificando-se que os agregados de NPs-Ag-citrato se concentraram no parênquima, preferencialmente na parte externa do bambu, ocupando 0,26% do volume total da amostra, com um volume médio de $9,19 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. Enquanto que os agregados de NPs-Ag-quitosana se concentraram tanto parênquima quanto nos vasos do metaxilema, apresentando maior homogeneidade de distribuição na parte interna do bambu, ocupando 1,18% do volume total da amostra e volume médio de $1,71 \times 10^3 \mu\text{m}^3$.

Palavras-chave

Bambu; nanopartículas de prata; impregnação

Abstract

Martins, Raquel dos Santos; Pandoli, Omar (advisor). **Impregnation of Bamboo, *Dendrocalamus giganteus*, with different silver nanoparticles to prevent fungal attacks**. Rio de Janeiro, 2016. 145p. MSc. Dissertation - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The use of bamboo as reinforcement in polymer matrices is an established idea. However, bamboo is susceptible to microbial spoilage, which is a major limitation for their use. This work had as main objective the internal impregnation of bamboo *Dendrocalamus giganteus* Munro Wallex with silver nanoparticles (NPs-Ag) with antifungal potential, synthesized with two different stabilizers (trisodium citrate and chitosan). The impregnated sections were analyzed verifying that Ag NPs citrate aggregates concentrated in the parenchyma, preferably on the outside of the bamboo, occupying 0.26% of the total sample volume with an average volume of $9.19 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. While NPs-Ag-chitosan aggregates focused both parenchymal and in metaxylem vessels, with more homogeneous distribution inside the bamboo, occupying 1.18% of the total sample volume and average volume of $1.71 \times 10^3 \mu\text{m}^3$.

Keywords

Bamboo; Silver nanoparticles; impregnation

Sumário

1	Introdução	21
2	Objetivos	24
2.1.	Objetivo geral	24
2.2.	Objetivos específicos	24
3	Fundamentação teórica	25
3.1.	Química Verde	25
3.2.	Potencial Econômico	26
3.3.	Materiais compósitos, biocompósitos e materiais híbridos orgânicos e inorgânicos	28
3.4.	O Bambu <i>Dendrocalamus giganteus</i>	31
3.4.1.	Ocorrência	31
3.4.2.	Morfologia externa	32
3.4.3.	Morfologia interna	34
3.4.4.	Constituição Química	38
3.5.	Nanotecnologia	41
3.5.1.	Síntese de nanopartículas metálicas (NPs)	43
3.5.1.1.	Síntese de nanopartículas de prata com citrato trissódico (NPs-Ag-citrato)	44
3.5.1.2.	Síntese de nanopartículas de prata com quitosana (NPs-Ag-quitosana)	45
3.5.1.3.	Síntese em Fluxo	47
3.5.1.4.	Propriedades antimicrobiano das NPs-Ag	50
3.6.	Técnicas analíticas	52
3.6.1.	Microtomografia computadorizada	53
3.6.2.	Microscopia Confocal de Varredura a Laser	56
4	Insumos, reagentes, instrumentação e metodologia	59
4.1.	Insumos	59
4.2.	Reagentes	60

4.3. Amostras	61
4.4. Instrumentação	61
4.5. Metodologia	62
4.5.1. Preparo de soluções	63
4.5.2. Preparo da amostra e Estudo do Bambu	63
4.5.2.1. Microtomografia computadorizada do bambu	63
4.5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura do bambu	64
4.5.2.3. Microscopia confocal de varredura a laser do bambu	64
4.5.3. Síntese e caracterização de NPs-Ag	65
4.5.3.1. Montagem do sistema microfluídico	65
4.5.3.2. Síntese de NPs-Ag com ligante citrato trissódico	66
4.5.3.3. Síntese de NPs-Ag com ligante quitosana	67
4.5.3.4. Espectrofotometria no UV/Visível das NPs-Ag sintetizadas	69
4.5.3.5. Potencial zeta (ζ) das NPs-Ag sintetizadas	69
4.5.3.6. Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICPOES - <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)	70
4.5.3.7. Microscopia eletrônica de varredura por transmissão das NPs-Ag sintetizadas	70
4.5.3.8. Espectroscopia no Infravermelho das NPs-Ag sintetizadas	71
4.5.4. Preparo da amostra, impregnação e caracterização do bambu com NPs-Ag	71
4.5.4.1. Impregnação do bambu com NPs-Ag	71
4.5.4.2. Microtomografia computadorizada do bambu impregnado	73
4.5.4.3. Difração de raio-X do bambu impregnado	77
4.5.5. Teste antifúngico qualitativo do bambu impregnado	78
5. Resultados e Discussões	79

5.1. Estudo do Bambu <i>Dendrocalamus giganteus</i>	79
5.1.1. Microtomografia Computadorizada	79
5.1.2. Microscopia eletrônica de varredura - MEV	81
5.1.3. Microscopia Confocal de Varredura a Laser do Bambu	82
5.2. Caracterização das NPs-Ag	89
5.2.1. Espectroscopia no UV-Visível, potencial zeta e concentração das nanopartículas de prata (NPs-Ag)	89
5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura por transmissão (MEVT) das Nanopartículas de Prata	93
5.2.3. Espectroscopia no Infravermelho (IV) das Nanopartículas de Prata	95
5.3. Caracterização do bambu <i>Dendrocalamus giganteus</i> impregnado com NPs-Ag	102
5.3.1. Microtomografia computadorizada 3D do bambu impregnado com NPs-Ag	102
5.3.2. Difração de raios-x do Bambu Impregnado com Nanopartículas de Prata	121
5.4. Teste de potencial antifúngico das NPs-Ag sintetizadas	122
6 Conclusões	124
7 Trabalhos futuros	125
8 Referências bibliográficas	126
9 Apêndice	136
Espectroscopia no Infravermelho (IV) das Nanopartículas de Prata	136
Preparo da solução de quitosana – 10 g/L	137
Artigo publicado	139

Lista de Figuras

Figura 1. Representação gráfica do desenvolvimento da exportação do bambu direcionado aos principais seguimentos tecnológicos.	28
Figura 2. Estrutura de um Bambu entouceirante.	33
Figura 3. Esquema de divisão transversal do bambu. Imagem: Raquel Martins.	34
Figura 4. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da seção longitudinal do bambu, observando-se as células do parênquima contendo grânulos de amido. Imagem: Eric Cardona.	35
Figura 5. Esquema da morfologia interna do bambu. Imagem: Silvania Lima.	36
Figura 6. Imagem de microscopia confocal de varredura a laser do tubo crivado do floema. A) Seção transversal do floema, ressaltando a placa crivada. B) Seção transversal da placa crivada ampliada. C) Seção longitudinal do tubo crivado.	37
Figura 7. Estrutura química do polímero de celulose.	39
Figura 8. Estrutura da fibra. A ilustração mostra a estrutura de uma microfibrila de celulose contendo regiões cristalinas e amorfas.	39
Figura 9. A) Estrutura química da hemicelulose. B) localização da hemicelulose na parede celular.	40
Figura 10. Estrutura das moléculas precursoras de lignina. A) p-hidroxifenil, B) guaiacila e C) siringila.	41
Figura 11. NPs com a superfície funcionalizada com ligante orgânico covalentemente ligado à superfície	43
Figura 12. Estrutura molecular do citrato trissódico.	44
Figura 13. Mecanismo de síntese de NPs-Ag com auxílio de um agente redutor forte (NaBH_4).	45
Figura 14. Estrutura química do polímero de quitosana.	46

Figura 15. Mecanismo de formação de nanopartículas de prata com o ligante quitosana.	46
Figura 16. Estrutura de complexação do cobre pela quitosana.	47
Figura 17. Microrreatores: Uma alternativa na busca da Química Ambientalmente Sustentável.	47
Figura 18. Tipos de reatores de acordo com seus volumes internos.	48
Figura 19. Esquema de um microrreator com duas entradas, uma zona de mistura e uma saída dos produtos logo depois da zona de residência.	49
Figura 20. Esquematização de sistemas microfluídicos integrados a análise espectroscópica. A) microrreator acoplado ao UV-Vis. B) Microrreator acoplado à análise RAMAN.	50
Figura 21. Esquema de funcionamento do microtomógrafo (μ CT). Imagem: Raquel Martins.	54
Figura 22. Funcionamento de um microscópio confocal.	57
Figura 23. Estrutura química do fluorocromo calcoflúor White com afinidade para celulose.	58
Figura 24. Estrutura química do fluorocromo, auramina O com afinidade química pela lignina.	58
Figura 25. Fluxograma de análises realizadas em cada etapa do trabalho.	63
Figura 26. Sistema de síntese de NPs-Ag com citrato trissódico em fluxo contínuo. Imagem: Raquel Martins.	67
Figura 27. Sistema de síntese de NPs-Ag com quitosana em fluxo contínuo com controle de temperatura. Imagem: Raquel Martins.	68
Figura 28. Esquema de corte para a preparação das amostras de Bambu.	72
Figura 29. Esquema de impregnação do Bambu: imersão, impregnação e secagem.	73

Figura 30. Esquema de análise da μ CT com objetiva de 4x do bambu impregnado com as NPs-Ag-citrato.	75
Figura 31. Volume da seção utilizada ($46,9 \mu\text{m}^3$ - amarelo) para o cálculo de volume de agregados no interior da seção impregnada com NPs-Ag-citrato analisada com a objetiva de 4x	75
Figura 32. Volume da seção utilizada ($51,67 \mu\text{m}^3$ - amarelo) para o cálculo de volume de agregados no interior da seção impregnada com NPs-Ag-quitosana analisada com uma objetiva de 4x.	76
Figura 33. Volume da seção utilizada ($568 \mu\text{m}^3$ - amarelo) para o cálculo de volume de agregados no interior da seção impregnada com NPs-Ag-quitosana analisada com a objetiva de 0.4x.	77
Figura 34. Esquema do corte do bambu impregnado com as NPs-Ag e analisado no DRX.	78
Figura 35. Imagem de μ CT-3D do bambu sem tratamento, seção 5x5x5 mm, ilustrando: A) Protoxilema; B) Metaxilema; C) Floema; D) Fibras; E) Parênquima.	80
Figura 36. A) Imagem microtomográfica do bambu no plano xy B) Imagem microtomográfica do bambu no plano xy indicando concentração dos constituintes diferenciada em células do parênquima.	81
Figura 37. Imagem MEV do elemento de vaso do metaxilema na seção longitudinal. À direita são ilustradas as imagens expandidas das paredes terminais das células no interior do vaso do metaxilema.	82
Figura 38. Imagem obtida por CLSM da seção transversal do bambu identificando a celulose (ciano) e lignina (amarelo). A) Feixe vascular; B) Imagem expandida do parênquima; C) Imagem expandida do feixe de fibras.	83
Figura 39. Imagem obtida por CLSM da seção transversal do bambu ilustrando o parênquima e fibras do esclerênquima. A) Identificação da celulose (ciano) e lignina (amarelo/verde); B) Identificação da celulose; C) Identificação da lignina.	85

- Figura 40. Imagem obtida por CLSM da seção longitudinal do bambu com identificação somente da celulose (ciano), ilustrando as pontoações e diâmetros. A) Células do parênquima; B) Célula do parênquima ampliada. 86
- Figura 41. Imagem obtida por CLSM da seção longitudinal do bambu com identificação somente da celulose (ciano), ilustrando as pontoações e diâmetros das fibras. A) Fibras; B) Fibra ampliada; C) lúmen. 87
- Figura 42. Imagem obtida por CLSM da seção longitudinal do bambu ilustrando o elemento de vaso do metaxilema revestido com uma parede celular secundária lignificada. A) Identificação da celulose (ciano) e lignina (amarelo) B) Identificação da celulose C) Identificação da lignina. 88
- Figura 43. Imagem ilustrativa do fenômeno LSPR (Localized surface plasmon resonance). 89
- Figura 44. Espectro de extinção na região UV-Visível das NPs-Ag-citrato, NPs-Ag-quitosana e NPs-Ag comercial revestida com citrato trissódico. 90
- Figura 45. Representação gráfica dos valores de potencial zeta para as NPs-Ag-citrato (-75,0 mV), NPs-Ag-comercial (-70,6 mV) e NPs-Ag-quitosana (+65,3 mV). 92
- Figura 46. A) Imagem MEVT das NPs-Ag-citrato; B) Histograma de distribuição do diâmetro das NPs-Ag-citrato. 94
- Figura 47. A-B) Imagem MEVT das NPs-Ag-quitosana dispersas e aglomerada; C) Histograma de distribuição de diâmetro das NPs-Ag-quitosana obtido pelo processamento da imagem 47A. 94
- Figura 48. Espectros FT-IR do citrato trissódico (preto), complexo-Ag⁺-citrato (vermelho) e NPs-Ag-citrato (azul) ilustrando as bandas vibracionais que apresentaram um deslocamento significativo pela caracterização da formação do complexo de coordenação. 95

- Figura 49. Espectro FTIR expandido do citrato trissódico, Complexo-Ag-citrato e NPs-Ag-citrato ilustrando as bandas que apresentaram deslocamento e caracterizam a formação do complexo de coordenação. 97
- Figura 50. Ilustração da estrutura de coordenação do íon Ag^+ com íon citrato. 98
- Figura 51. Espectro FTIR da quitosana (preto), Complexo-Ag-quitosana (vermelho) e NPs-Ag-quitosana (azul) ilustrando as bandas que apresentaram deslocamento e caracterizam a formação do complexo de coordenação. 98
- Figura 52. Espectro FTIR da quitosana (preto), Complexo-Ag-quitosana (vermelho) e NPs-Ag-quitosana (azul) ilustrando as bandas que apresentaram deslocamento e caracterizam a formação do complexo de coordenação. 100
- Figura 53. Ilustração de coordenação da quitosana à prata iônica. 101
- Figura 54. Imagem tomográfica da amostra do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato analisado com uma objetiva de 4x, com exclusão da matriz vegetal na fase de processamento digital. A seta indica a distribuição anisotrópica das fibras ao longo da direção radial, aumentando da parte interna para a parte externa do colmo. A) Seção central da amostra em exame com a exclusão da matriz vegetal. B) Seção central da amostra em exame em cores de acordo com o volume dos agregados no intervalo de $61,63 - 4,16 \times 10^5 \mu\text{m}^3$. 103
- Figura 55. Área total ocupada por aglomerados de NPs-Ag-citrato na seção longitudinal em função da distância no eixo transversal aos vasos, na direção radial do colmo, no sentido da parte externa para a parte interna. Seção de $2765 \times 7544,5 \times 2765 \mu\text{m}$ analisada com a objetiva de 4x. 104
- Figura 56. Imagem em 2D obtida pela μCT da seção do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato. Os retângulos vermelhos ressaltam os aglomerados metálicos em geometrias quadradas e

retangulares. A) Seção transversal plano xy. B) Seção longitudinal plano xz. C) Seção longitudinal plano yz. 106

Figura 57. Distribuição de volume dos aglomerados metálicos no interior da amostra central do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato analisado com uma objetiva de 4x. 107

Figura 58. Imagem tomográfica da amostra do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana analisado com a objetiva de 4x, com exclusão da matriz vegetal na fase de processamento digital. A seta indica a distribuição anisotrópica das fibras ao longo da direção radial, aumentando da parte interna para a parte externa do colmo. A) seção central da amostra em exame. B) seção central da amostra em exame em cores de acordo com o volume dos agregados no intervalo de $71,47 - 2,18 \times 10^7 \mu\text{m}^3$. 108

Figura 59. Área total ocupada por aglomerados de NPs-Ag-quitosana na seção longitudinal em função da distância no eixo transversal aos vasos, na direção radial do colmo, no sentido da parte externa para a parte interna. Seção de $2855 \times 8200 \times 2515 \mu\text{m}$ analisada com a objetiva de 4x. 109

Figura 60. Imagem em 2D obtida pela μCT da seção do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana sem (A e C) e com (B e D) processamento. Os objetos vermelhos ressaltam os aglomerados metálicos aderidos nas paredes internas dos vasos e células do parênquima. A-B) Seção transversal plano xy sem e com processamento. C-D) Seção longitudinal plano xz sem e com processamento. 110

Figura 61. Distribuição de volume dos aglomerados metálicos no interior da amostra central do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana, analisado com objetiva de 4x. 111

Figura 62. Imagem tomográfica da amostra do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana analisado com a objetiva de 0.4x com exclusão da matriz vegetal na fase de processamento digital. A) Seção do bambu examinado mostrando os anéis de aglomerados no interior dos vasos. B) Seção do bambu examinado mostrando

alguns vasos revestidos e preenchidos e a seta indica a distribuição anisotrópica das fibras ao longo da direção radial, aumentando da parte interna para a parte externa do colmo. C) Seção do bambu examinado mostrando a distribuição de aglomerados metálicos de acordo com seus volumes em um intervalo de $6,59 \times 10^3 - 1,04 \times 10^8 \mu\text{m}^3$.	114
Figura 65. Distribuição de volume dos aglomerados metálicos no interior da amostra central do bambu impregnado com NPs-Ag- quitosana.	117
Figura 66. Difractogramas do bambu impregnado com NPs-Ag- quitosana e NPs-Ag-citrato. A) Camada externa (superficial) do bambu impregnado; B) Camada interna do bambu impregnado.	122
Figura 67. Seções de bambu sem e com tratamento, após exposição contínua ao ambiente natural por 210 dias à temperatura média de 33°C e umidade relativa de 80%.	123

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros utilizados na análise do bambu sem tratamento.	64
Tabela 2. Parâmetros utilizados na análise das seções de bambu sem e com tratamento.	74
Tabela 3- Valores da concentração de NPs-Ag nas dispersões sintetizadas e comercial obtidos por ICPOES.	93
Tabela 4. Bandas vibracionais relativas as principais ligações presente no citrato trissódico e seus deslocamentos do complexo- Ag^+ -citrato e NPs-Ag-citrato (PAVIA et al., 2010).	96
Tabela 5. Bandas vibracionais relativas às principais ligações presente na quitosana e seus deslocamentos do complexo- Ag^+ -quitosana e NPs-Ag-quitosana.	99
Tabela 6.Estatística de volume (μm^3) da população de aglomerados de NPs-Ag-citrato no interior do bambu (volume analisado de 46,9 mm^3).	107
Tabela 7.Estatística de volume (μm^3) da população de aglomerados de NPs-Ag-quitosana, analisado com objetiva de 4x no interior do bambu (volume analisado de 51,67 mm^3).	112
Tabela 8.Estatística de volume (μm^3) da população de aglomerados de NPs-Ag-quitosana no interior do bambu (volume analisado de 29,8 mm^3) analisado com objetiva de 4x.	112
Tabela 9. Estatística de volume (μm^3) da população de aglomerados de NPs-Ag-quitosana no interior do bambu (volume analisado de 568 mm^3).	118
Tabela 10. Resumo das Estatísticas de volume) das populações de aglomerados de NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana no interior do bambu, analisadas com as objetivas de 4x e 0.4x.	120

Lista de Abreviaturas

Nps	Nanopartículas
Nps-Ag	Nanopartículas de prata
UV	Ultravioleta
MEVT	Microscopia eletrônica de varredura por transmissão
ICPOES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> - Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
ζ	Potencial zeta
FT-IR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i> – Microscopia confocal de varredura a laser
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
μct	Microtomografia computadorizada
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
CCD	<i>Charge coupled device</i> – Dispositivo de carga acoplada
AgNO₃	Nitrato de prata
C₆H₅Na₃O₇	Citrato trissódico
NaBH₄	Borohidreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
CH₃COOH	Ácido acético
PEEK	Polieteretercetona
ETFE	Etileno tetrafluoretileno
LSPR	<i>Localized surface plasmon resonance</i> - Ressonância de plasma de superfície localizada
λ	Comprimento de onda
ñ	Número de onda

K	Constante de força da ligação
C	Velocidade da luz
NC	Número de coordenação
μ	Coeficiente de atenuação
μ^*	Massa reduzida
U	Modo vibracional de estiramento
δ	Modo vibracional de deformação angular

1

Introdução

Ao longo do tempo observou-se um desenvolvimento exponencial em praticamente todos os setores científico-tecnológicos, sem a devida atenção dos impactos das novas tecnologias no meio ambiente e na sociedade. Consequentemente, isto acarretou uma série de alterações e desequilíbrios na flora e fauna terrestre, refletindo diretamente na qualidade de vida geral da própria população (CASTANEDA-MENDOZA et al., 2005).

Dessa forma, a pesquisa acadêmica vem propiciando a busca por materiais sustentáveis, aptos a substituir as matérias-primas usuais em compósitos naturais ou sintéticos, e ao mesmo tempo procura o desenvolvimento de processos tecnológicos cada vez mais limpos e menos nocivos, que atendam aos princípios da química sustentável (GHAVAMI, 2005).

O surgimento dos biocompósitos vem ganhando espaço, sendo preferíveis aos compósitos convencionais, destacando-se por suas características peculiares e propriedades mecânicas (SITI et al., 2013). Nesta perspectiva, o bambu se sobressai pelo seu alto potencial tecnológico, sendo alvo de muitas pesquisas nos últimos anos, devido às suas propriedades mecânicas únicas como resistência, flexibilidade e dureza. Além de possuírem um crescimento acelerado e a capacidade de produzir novos brotos sem a necessidade de replantio, podendo ser cortado até cem vezes a cada dois anos, de acordo com a espécie (PANDA, 2011).

O bambu é uma monocotiledônea pertencente à família das *Poaceae* e subfamília *Bambusoideae*, possuindo cerca de 116 gêneros e mais de 1.439 espécies no mundo. São espécies de origem tropical, nativas em sua maioria do continente asiático (GROUP, 2012). Trata-se de um biocompósito natural, cuja matriz vegetal é formada pelos tecidos

parênquima, fibras e feixes vasculares, constituídos principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e pectina (LIESE, 1998).

As peculiares características mecânicas do bambu são decorrentes da distribuição anisotrópica dos seus tecidos e constituintes na estrutura. Isto viabiliza seu emprego como reforço em diversos compósitos como o cimento, e compósitos à base de epóxi, polipropileno e poliestireno, até mesmo substituindo as fibras de algodão na indústria têxtil (SABNANI; LATKAR; SHARMA, 2013; SHEN et al., 2004; ZAKIKHANI et al., 2014).

Todavia, por se tratar de uma matriz biológica e rica em polissacarídeos, principalmente amido, o bambu é facilmente suscetível a ataques microbianos, tendo sua durabilidade comprometida e variável em diferentes condições ambientais. Isto é um fator que tem limitado seu uso e difusão, mesmo diante dos estudos relatando suas ampla aplicação (AZZINI, 1984; AZZINI; BERALDO, 2000). Por isso, o tratamento do bambu com agentes antimicrobianos é uma etapa necessária e já parcialmente desenvolvida. Atualmente, é comum realizar o tratamento dos colmos de bambu com uma mistura de sulfato de cobre, dicromato de sódio e ácido bórico para protegê-los contra os ataques microbianos. Contudo, este tratamento gera resíduos tóxicos e difíceis de serem tratados, além de ser um processo agressivo a longo prazo para os manipuladores (PEREIRA; BERALDO, 2007)

O uso de nanopartículas de prata (NPs-Ag) é uma alternativa na substituição dos tratamentos convencionais devido ao seu poder antimicrobiano já conhecido. A impregnação do bambu com as NPs-Ag pode ser realizada por métodos simples, tais como a imersão, realizando o contato direto com a nanomaterial ou com o auxílio de vácuo, aplicando-se uma pressão negativa para promover a difusão do material nanométrico no interior micrométrico do bambu de forma rápida e eficiente (TIBURTINO et al., 2015a). Dentre outros fatores, a eficiência da impregnação do bambu está diretamente ligada com a compatibilidade entre a natureza da matriz vegetal e as NPs. Características como afinidade química e morfologia são cruciais para obter a introdução e fixação das nanoestruturas no bambu, sendo por isso necessário o perfeito conhecimento das propriedades de ambas (YU et al., 2012).

Neste trabalho foi realizada o estudo anatômico e morfológico do bambu *Dendrocalamus giganteus* Wall.ex Munro, a síntese e caracterização de NPs-Ag com dois agentes estabilizantes diferentes, a impregnação de amostras de bambu com ambas as NPs-Ag sintetizadas e a caracterização das mesmas no interior da matriz vegetal.

O estudo morfológico do bambu foi realizado através da microtomografia computadorizada (μ CT), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM - *confocal laser scanning microscopy*).

As NPs-Ag foram sintetizadas em sistema de fluxo semi-contínuo, pelo método de redução química, como agente redutor, citrato trissódico e quitosana de baixo peso molecular como agentes estabilizantes das dispersões coloidais. As sínteses foram caracterizadas pela espectrofotometria no UV-Visível, potencial zeta (ζ), Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICPOES - *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*), microscopia eletrônica de varredura por transmissão (MEVT) e espectroscopia no infravermelho (FT-IR). Para a caracterização de ambas as dispersões de NPs-Ag no interior das amostras de bambu impregnadas, foram empregadas novamente a μ CT e a difração de raios-X, tendo as imagens tomográficas obtidas processadas, quantificando-se os agregados metálicos presente no interior da matriz vegetal.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o grau de impregnação no interior do bambu após o tratamento com diferentes NPs-Ag. De forma clara e inesperada foram evidenciadas deposições metálicas em distintos tecidos da matriz vegetal em função da natureza química das dispersões coloidais de prata. O estudo não é conclusivo, mas é promissor para aprofundar os complexos mecanismos biológicos que regulam os processos de bio-absorção e escoamento de fluidos na matriz biológica do bambu.

2 Objetivos

2.1. Objetivo geral

Impregnar o bambu *Dendrocalamus giganteus* Wall.ex Munro com NPs-Ag sintetizadas com diferentes agentes estabilizantes com objetivo de preencher os elementos de vasos, por serem vazios, e permitirem o contato maior da matriz vegetal com o meio externo, promovendo a proteção do bambu contra os ataques dos fungos.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a anatomia da matriz biológica do bambu *Dendrocalamus giganteus* Wall.ex Munro;
- ✓ Identificar os principais componentes químicos (celulose, hemicelulose e lignina) no bambu *Dendrocalamus giganteus* Wall.ex Munro pela CLSM;
- ✓ Sintetizar NPs-Ag com dois agentes estabilizantes orgânicos que possuem carga e estrutura molecular diferentes;
- ✓ Caracterizar a natureza físico-química das NPs-Ag sintetizadas, determinando a morfologia, distribuição estatística do tamanho e suas respectivas cargas superficiais;
- ✓ Impregnar seções do colmo de bambu *Dendrocalamus giganteus* Wall.ex Munro com NPs-Ag de diferentes cargas e agentes estabilizantes;
- ✓ Avaliar a distribuição e o teor de preenchimento das NPs-Ag nos tecidos da matriz vegetal do bambu pela μ CT;
- ✓ Avaliar qualitativamente a preservação do bambu *Dendrocalamus giganteus* Wall.ex Munro com e sem impregnação de NPs-Ag.

3

Fundamentação teórica

Nesta seção, serão apresentados os fundamentos e as aplicações do bambu no atual cenário global, sua relação com os materiais nanoestruturados, ressaltando-se as NPs-Ag e suas propriedades antimicrobianas, os quais motivaram a realização desta pesquisa.

3.1.

Química Verde

A química verde é um movimento que visa a conscientização ambiental da sociedade científica quanto as inovações tecnológicas (PRADO, 2003). O movimento sustentável vem com a ideia de reaproveitamento de materiais e substituição de matérias-primas não renováveis ou com altos impactos ambientais por materiais renováveis, de fácil manuseio e menos nocivos ao meio ambiente. Considerando-se também os fatores econômicos, o conceito da química limpa influencia de forma positiva, pois a aplicação de processos sustentáveis tendem a diminuir os custos com o tratamento de resíduos e matérias-primas (GARCÍA-SERNA; PÉREZ-BARRIGÓN; COCERO, 2007). No entanto, o desenvolvimento de processos com menor gasto de energia, reagentes e produção de resíduos, e ainda mantendo a qualidade do produto tem sido um grande desafio para os pesquisadores.

Para nortear as empresas e estabelecer uma norma técnica a ser seguida e reconhecida como integrante da química verde, foram estabelecidos doze princípios que dirigem esta “bandeira”. Estes são: prevenção, economia atômica, síntese de compostos menos tóxicos, síntese de compostos seguros ambientalmente, redução dos solventes, eficiência energética, uso de substâncias recicláveis, redução de

derivativos, catálise, síntese de substâncias que auxiliam a degradação de compostos nocivos ao meio ambiente, análise das reações em tempo real, química segura e sem risco de acidentes (GARCÍA-SERNA; PÉREZ-BARRIGÓN; COCERO, 2007).

Materiais naturais têm auxiliado na fabricação de produtos verdes (*eco-friendly*). Principalmente o bambu, devido ao seu crescimento acelerado e às suas múltiplas utilidades, as quais possibilitam o desuso de diversos materiais nocivos ao meio ambiente, cuja base é o petróleo e demais recursos não renováveis (ABDUL KHALIL et al., 2012).

Com base nos doze princípios, considera-se que o uso do bambu é um forte aliado no desenvolvimento sustentável, já que suas fibras podem ser substituídas por fibras sintéticas, ou ainda reforçá-las, formando um eco-compósito (ABDUL KHALIL et al., 2012; YASIN; LIU; YAO, 2013). Além disso, o bambu também possui a capacidade de incorporar gás carbônico em sua matriz durante o processo de fotossíntese, pois é classificada como planta com alta absorção de carbono, podendo estocar entre 31.860 e 77.039 kg/ha de CO₂ por ano, dependendo da espécie e das condições climáticas (NETO; GIANNETTI, 2009). Por isso, o vegetal é considerado como uma planta sequestradora de carbono, contribuindo com a redução de gás carbônico na atmosfera, e consequentemente reduzindo o efeito estufa (ROCKWELL et al., 2014).

Pensando nisto, foi estabelecida a lei 12.484, criada em 2011, com o objetivo de incentivar o cultivo do bambu e o conceito *GreenHarvest*, que defende o uso de fibras de plantas, que não sejam árvores, nas indústrias (SANTI, 2015).

3.2.

Potencial Econômico

Desde a antiguidade até os dias de hoje, o bambu possui ampla aplicabilidade na alimentação, nos segmentos de decoração, utilidades

domésticas e construção civil, sendo a principal fonte de renda de muitas famílias e empresas (ABDUL KHALIL et al., 2012).

A necessidade de matérias-primas renováveis e a falta de madeira proveniente de árvores, tem propiciado a expansão econômica do bambu, tanto em volume, quanto em novos setores tecnológicos. O bambu vem sendo utilizado na Ásia e na América do Sul há muito tempo, sendo uma matéria-prima acessível ecologicamente, pois atinge a maturidade com 3 anos de idade, diferente das árvores, que levam em torno de 20 anos para estarem totalmente desenvolvidas (ABDUL KHALIL et al., 2012).

Atualmente existem cerca de 22 milhões de hectares cultivados com o bambu no mundo, e cerca de 4,5 milhões de hectares estão retidos no Estado do Acre (Brasil), correspondendo a aproximadamente 20% da área mundial dominada pelo vegetal (CARDOSO, 2016). No entanto, diante das pesquisas já existentes, a área destinada ao cultivo de bambu ainda é pouco difundida e não supre a necessidade industrial.

O bambu, como cerne do desenvolvimento sustentável, possui eixos com pesquisas já finalizadas e comprovadas. Seu potencial tecnológico possui ampla abrangência, iniciando na restauração de solos devastados que possibilita o plantio de diversas culturas e protege o mesmo contra a erosão (NETO; GIANNETTI, 2009); passando pela indústria de celulose diminuindo o uso da madeira, seguindo na indústria civil e de polímeros substituindo materiais e sendo empregado como reforço em compósitos diversos. Pesquisas com as fibras de bambu têm sido realizadas na indústria automobilística, na permuta de polímeros usuais com maior gasto no processo de manipulação (SITI et al., 2013); e até na indústria têxtil, na fabricação de tecidos combinando as fibras de algodão com as de bambu, ou simplesmente só com o bambu (SHEN et al., 2004). Recentemente, a empresa Kimberly-Clark passou a comercializar produtos *GreenHarvest* com até 20% de fibras de bambu (KIMBERLY-CLARK, 2013).

Estima-se que no Brasil são produzidos cerca de 150 mil toneladas de celulose de bambu anualmente, sendo a maior parte cultivada pela empresa CEPASE, que fornece sacos para o armazenamento de cimentos (SANTI, 2015). Algumas empresas iniciaram o cultivo com o

mesmo propósito, no entanto a produção de biomassa a partir do bambu se tornou mais rentável(SANTI, 2015).

De acordo com os dados divulgados, a China está na primeira posição desde 2007 como a maior produtora e exportadora de bambu do mundo, retendo 65% da exportação mundial e movimentando cerca de US \$ 1.207 milhões no país. Apesar disso, nos últimos anos, os segmentos movimentados pelo uso do bambu não avançaram significativamente como pode ser verificado na Figura 1. Isto possivelmente é a consequência da crise econômica sofrida por vários países nos últimos anos (UN COMTRADE DATABASE, 2014).

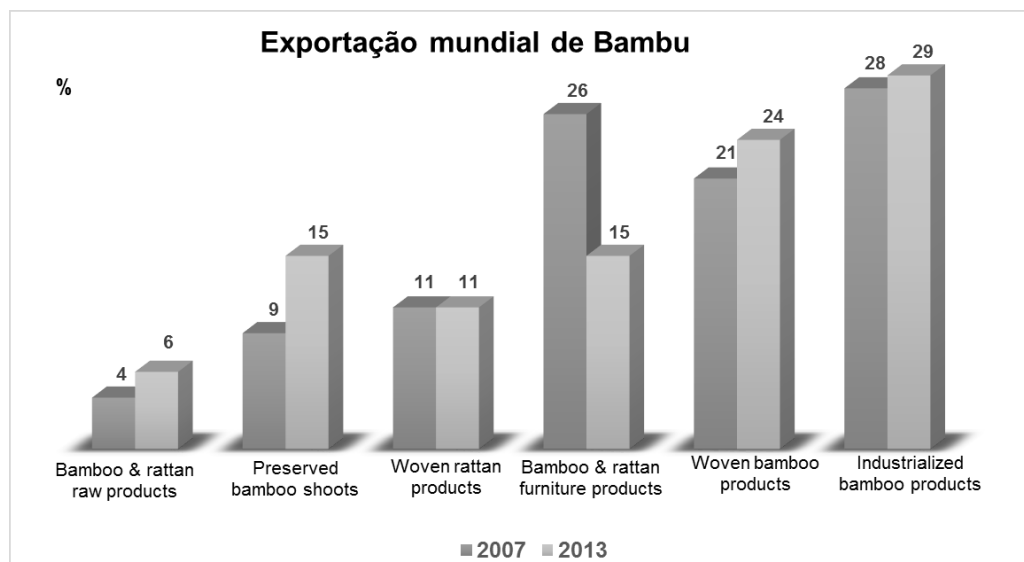


Figura 1. Representação gráfica do desenvolvimento da exportação do bambu direcionado aos principais seguimentos tecnológicos. Adaptado de UN COMTRADE DATABASE, (2014).

3.3.

Materiais compósitos, biocompósitos e materiais híbridos orgânicos e inorgânicos

Os compósitos têm apresentado eficiência em muitas áreas, sendo aplicados comumente em setores aeroespaciais, automobilísticos, construção civil, indústria de polímeros, utensílios domésticos, etc., devido a sua composição heterogênea e propriedades atraentes para o mercado como leveza e resistência. Todavia, sua produção demanda cuidados

específicos, pois algumas matérias-primas são difíceis de manusear, ou dispendem maior gasto de energia para serem processadas, além de serem custosas, limitando seu uso (HEBEL et al., 2014).

Neste contexto, a produção de biocompósitos, que são compósitos sintéticos reforçados com fibras naturais vem sendo estudada a fim diminuir os custos de processos e viabilizando estes materiais. Além de possibilitar o aproveitamento das propriedades que mais se destacam em cada material, produzindo uma matriz com o mesmo desempenho ou mais eficiente que a matriz convencional, e ainda de forma econômica e segura (SITI et al., 2013).

A síntese de biocompósitos apesar de ser vantajosa, deve ser desenvolvida de forma segura e criteriosa, avaliando-se as características físicas e químicas da fibra natural e do compósito, pois estas podem comprometer as propriedades do produto final. Quando não há compatibilidade das características das fibras naturais com a matriz, o tratamento químico prévio tem sido uma solução viável, pois este altera as propriedades como aderência e hidrofobicidade, sem comprometer a estrutura vegetal (ZAKIKHANI et al., 2014)

O bambu é considerado um biocompósito natural com resistência à tração comparável ao aço. Algumas pesquisas já foram realizadas usando as fibras de bambu como reforço para compósitos, como polímeros biodegradáveis, poliéster, epóxi para a fabricação de tapetes, reforço em compósitos de polipropileno e até em reforços de fibras de vidro em compósitos híbridos (ABDUL KHALIL et al., 2012).

Os biocompósitos, como a matriz de poliéster reforçada com fibras de bambu, tem sido estudada, avaliando-se suas propriedades mecânicas, e apresentando moderada força e rigidez, além de alterar positivamente as propriedades do compósito, pois a interação entre as fibras e a matriz polimérica permite a maior distribuição das forças submetidas, devido ao grau de adesão entre os componentes (FUENTES et al., 2013).

A indústria de compósitos de bambu tem ganhado espaço e força, não só pelo desenvolvimento de materiais mais direcionados, mas por contribuir na economia energética e diminuição da poluição (GHAVAMI;

RODRIGUES; PACIORNIK, 2003). Produtos em diversas áreas tem sido produzido através do bambu, como pranchas de surf manipuladas com placas de laminados de bambu em uma base de epóxi e camadas de vidro, sendo superiores pela leveza e durabilidade. No Japão, a empresa Mitsubishi empregou compósitos de bambu com poliuretano na fabricação de protótipos automobilísticos afim de reduzir os gastos com outros compósitos, além de reduzir também a poluição pela emissão de gás carbônico nos processos usuais (ABDUL KHALIL et al., 2012). As da polpa de bambu no reforço do cimento Portland em substituição ao amianto também é uma tendência conveniente, sendo obtidas através do processo *organosolv*, o qual oferece economia sem a necessidade de recuperação dos reagentes (CORREIA et al., 2014).

Além dos tipos de compósitos já apresentados, existem também materiais conhecidos como biocompósitos híbridos, que são matrizes reforçadas com mais de um tipo de fibra. Nesta variação, fibras com características diferentes são incorporadas em uma mesma matriz polimérica, gerando um híbrido, com propriedades físicas e mecânicas superiores (SABA; TAHIR; JAWAID, 2014).

Em seguimento, os nanocompósitos também têm se destacado mostrado em diversas aplicações e são caracterizados pela presença de pelo menos uma substância nanométrica em sua matriz. De acordo com o tipo de nanoestrutura empregada, os nanocompósitos podem adquirir propriedades diferenciadas, como aumento das propriedades mecânicas, elétricas, térmicas e até a redução da inflamabilidade da matriz polimérica.

Em sequência, foi desenvolvido os bionanocompósitos, que são os biocompósitos funcionalizados com nanoestruturas, tendo suas propriedades físicas e mecânicas modificadas (SABA; TAHIR; JAWAID, 2014). Eles podem ser desenvolvidos a partir de NPs de substâncias naturais e polímeros derivados do petróleo, biopolímeros, *nanofilers* sintéticos ou inorgânicos como nanotubos de carbono, nanopartículas metálica e nanoargilas (PRIMO et al., 2013; ZHANG et al., 2009; ZHU et al., 2010).

Jin e colaboradores (2015a), realizaram a funcionalização do bambu com NPs-Ag, resultando na formação de uma superfície externa impermeável e superhidrofóbica, possuindo a capacidade de conduzir eletricidade. Resultados promissores também foram obtidos na funcionalização da superfície externa do bambu com NPs de Fe_2O_3 com propriedades magnéticas resultando na presença de magnetismo na amostra (JIN et al., 2015b; LI et al., 2015). Madeiras de bambu também foram tratadas com NPs de ZnO com propriedades antifúngicas, obtendo a proteção da matriz contra *Aspergillus niger* v. tiegh e *Penicillium citrinum thom* (LI et al., 2016).

Esses dados nos levam a crer que a difusão destas pesquisas, propiciará a substituição no futuro próximo de muitos sistemas tradicionais por compósitos naturais funcionalizados, podendo ter suas aplicações estendidas a áreas cada vez mais abrangentes.

3.4.

O Bambu *Dendrocalamus giganteus*

3.4.1.

Ocorrência

O bambu *Dendrocalamus giganteus* é uma *graminea* gigante típica de regiões tropicais e subtropicais, crescendo e se proliferando rapidamente na Tailândia, Burma, Índia, Ceilão, China e Brasil (NASCIMENTO; LÚCIA, 1995). Possui colmos esverdeados e crescimento acelerado, com uma taxa média de 22 cm/dia, podendo chegar à sua altura máxima em apenas 180 dias. Por se tratar de uma espécie entouceirante, pode haver vários colmos em uma mesma touceira em desenvolvimentos heterogêneos, com alturas e diâmetros diferenciados, podendo chegar até 40 m de altura, 20 cm de diâmetro e 3 cm de espessura da parede (PEREIRA; BERALDO, 2007).

Esta espécie possui grande potencial na indústria de laminados, porém a expansão do seu uso está ligado ao maior conhecimento de sua estrutura e propriedades mecânicas (MARINHO et al., 2012).

3.4.2.

Morfologia externa

O bambu *Dendrocalamus giganteus* faz parte das 650.000 espécies pertencentes ao grupo das angiospermas, da classe das monocotiledôneas, possuindo um sistema integrado e complexo (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

Com um crescimento apical em sua maioria, o vegetal é subdividido em uma parte aérea que após a maturidade é formada pelo colmo, ramos, folhas e flores, e uma parte subterrânea, formada pelos rizomas e raízes. Por ser uma espécie entouceirante, constantemente nasce um novo rizoma oriundo das gemas presentes no rizoma inicial, o qual gera o crescimento de um novo colmo, podendo ter entre 5 a 10 colmos em uma mesma touceira (PEREIRA; BERALDO, 2007).

Os colmos possuem geometria em cone com centros vazios, diminuindo de diâmetro da base para o topo, subdivididos longitudinalmente em entrenós (internós) e nós. Os entrenós podem ter até 65 cm de comprimento e estão dispostos de forma longitudinal, separados por um diafragma posicionado entre eles transversalmente, os nós (NASCIMENTO; LÚCIA, 1995). Os nós são responsáveis pelo crescimento de cada entrenó, pois neles estão localizados as células meristemáticas, responsáveis pela formação dos tecidos (LIESE, 1998). A Figura 2 apresenta uma imagem detalhada da estrutura do bambu.

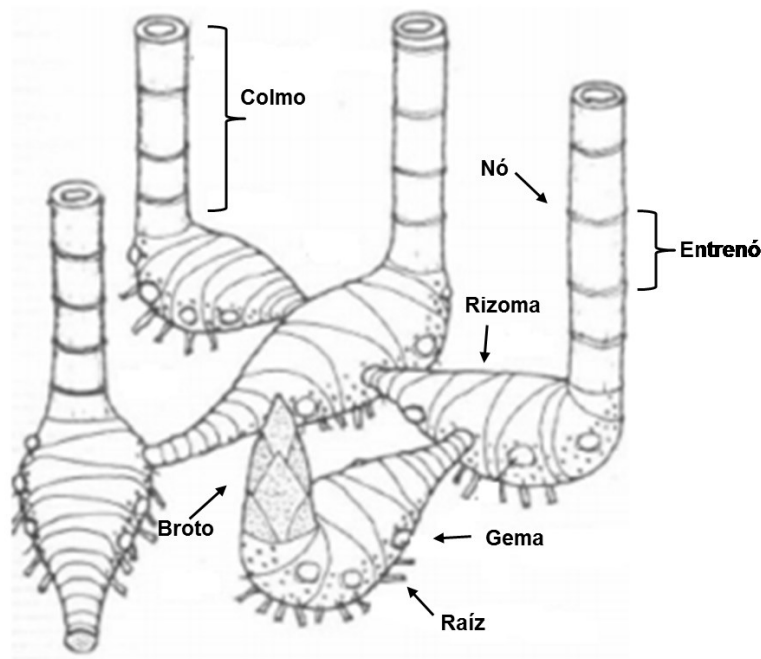


Figura 2. Estrutura de um Bambu entouceirante. Adaptado de LÓPEZ (2003).

A parede do colmo do bambu é composta pelo córtex, cerca de 50% parênquima, 40% de fibras e 10% de feixes vasculares, para o *Dendrocalamus giganteus*, podendo haver variação destes percentuais em outras espécies (LIESE, 1998; MARIA et al., 2015). Transversalmente, a parede do colmo é subdividida em três partes: o córtex ou bambu verde, referente à parte externa, mais rígida pela maior densidade de fibras; madeira ou medula do bambu, onde os feixes vasculares são visíveis e bem concentrados e bambu amarelo, parte interna com maior concentração de tecido parenquimático e sem feixes vasculares (LIESE, 1998). Na Figura 3, esta subdivisão é representada de forma detalhada.

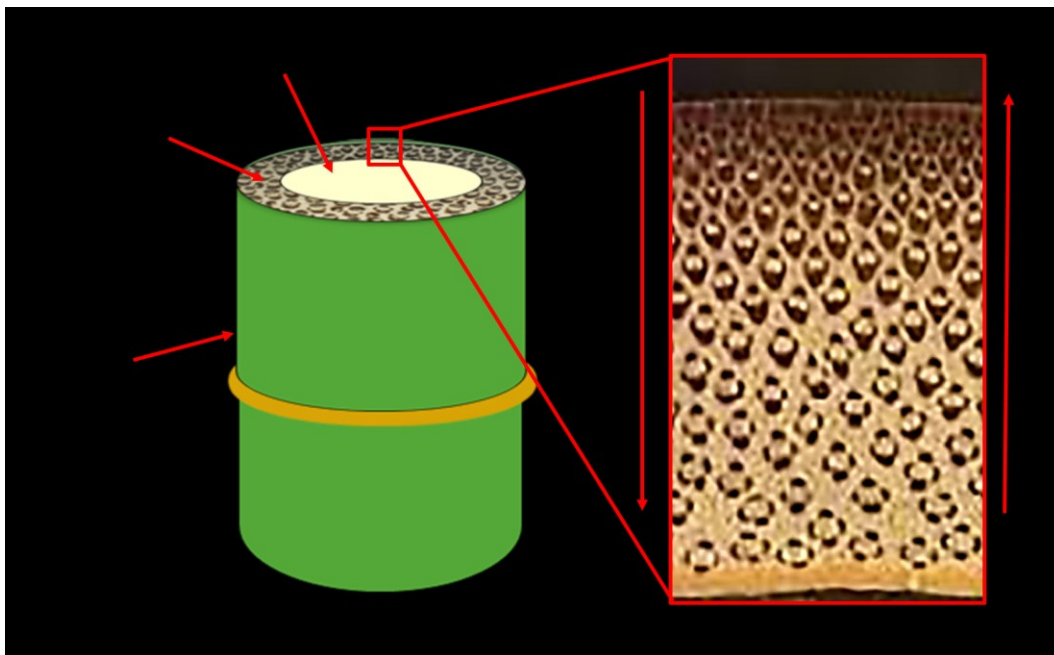


Figura 3. Esquema de divisão transversal do bambu. Imagem: Raquel Martins.

3.3.3.

Morfologia interna

O córtex, que é a parte externa do bambu, possui a função de proteger a estrutura vegetal, sendo formado pela epiderme, hipoderme, feixes vasculares, fibras e parênquima cortical. O parênquima está presente em toda a estrutura, tendo o aumento de sua ocorrência, do topo para a base no sentido longitudinal, e no sentido transversal, da extremidade para o centro. Em uma observação tridimensional, suas células são isodiamétricas, dispostas paralelamente e enfileiradas (LIESE, 1985; PRATES, 2013). É um tecido formado por células com paredes celulares (primária e secundária) delgadas lignificadas com pontuações, que permitem a troca de materiais entre as células e toda a estrutura vegetal. Dentre as funções do parênquima, ressalta-se o armazenamento de grânulos de amido (Figura 4), os quais oferecem energia necessária para o desenvolvimento dos colmos. A quantidade e diâmetro dos grânulos de amido apresentam valor médio de $27,14 \text{ g kg}^{-1}$ e $7,30 \text{ }\mu\text{m}$, respectivamente para o *Dendrocalamus giganteus*, podendo variar de acordo com a localização no colmo (AZZINI; BERALDO, 2000).

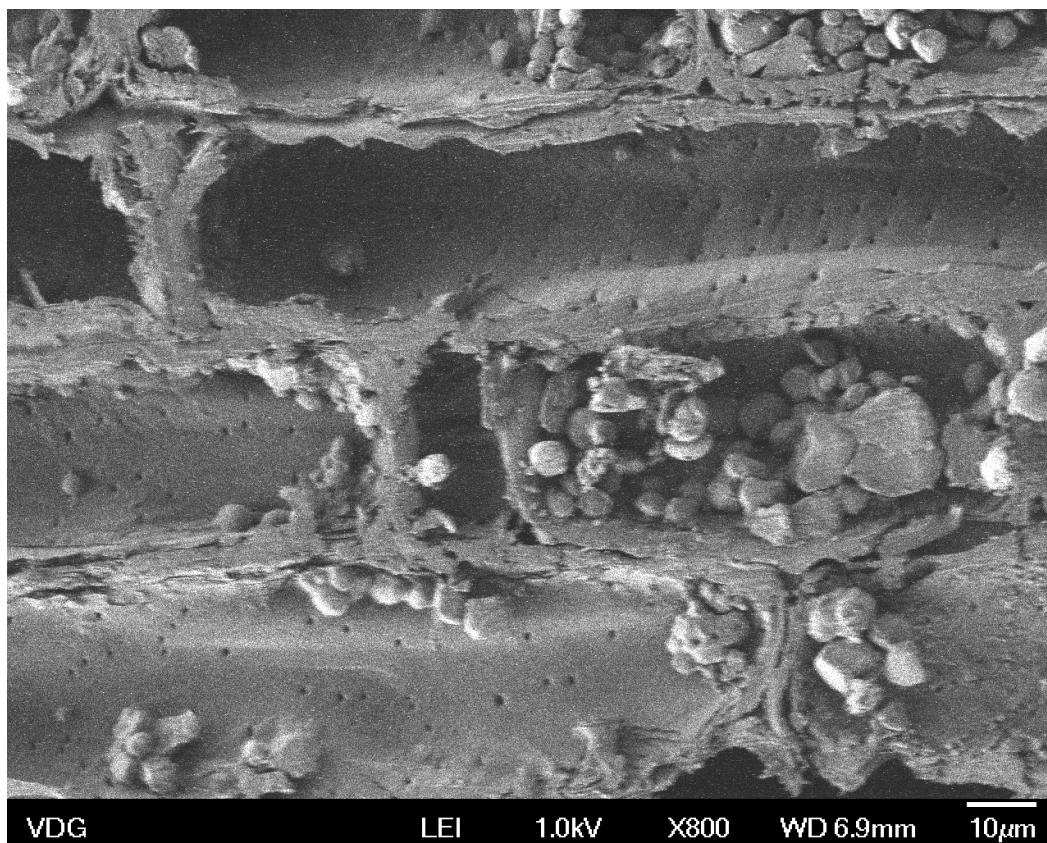


Figura 4. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da seção longitudinal do bambu, observando-se as células do parênquima contendo grânulos de amido. Imagem: Eric Cardona.

As fibras são células alongadas e rígidas com camadas concêntricas de paredes celulares altamente lignificadas e impermeáveis, assumindo uma geometria cilíndrica com lúmen reduzido. São as principais responsáveis pelas propriedades mecânicas do bambu, localizando-se nos feixes vasculares, ao redor dos elementos de vaso do xilema e floema. Ocorrem no sentido transversal, de forma crescente da parte interna para a parte externa, e no sentido longitudinal, da base para o topo. (LIESE, 1998; PEREIRA; BERALDO, 2007). O comprimento das fibras varia de acordo com a espécie, idade e localização no colmo. Para o *Dendrocalamus giganteus* de quatro anos, foram encontradas fibras com 3,43 mm de comprimento, localizado em um entrenó posicionado na base do colmo. Quanto ao diâmetro das fibras, o mesmo está diretamente relacionado com seu comprimento e espessura de sua parede celular (AZZINI; BERALDO, 2000; MARINHO; NISGOSKI; DE MUÑOZ, 2014).

Os feixes vasculares são responsáveis pela circulação de nutrientes e água na matriz vegetal e estão dispostos de forma difusa e anisotrópica. No sentido transversal, eles aumentam em número e diminuem seu tamanho da parte interna para a parte externa. Enquanto no sentido longitudinal, ocorre a sua diminuição em número da base para o topo (LIESE, 1998; TOMAZELLO FILHO; AZZINI, 1987). São formados pelos tecidos condutores, xilema e floema, feixe de fibras, rodeados pelo parênquima (PRATES, 2013), conforme ilustrado na Figura 5.

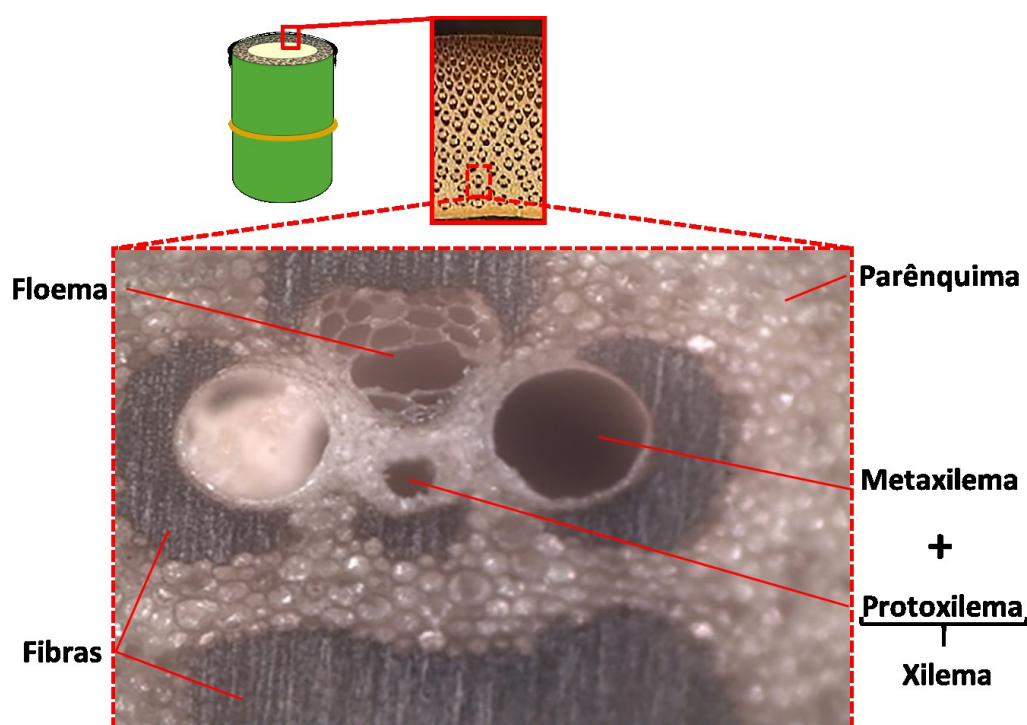


Figura 5. Esquema da morfologia interna do bambu. Imagem: Silvania Lima.

O xilema é composto pelo protoxilema e metaxilema, e é responsável pela condução de água e solutos para a planta. O protoxilema é a forma imatura do xilema, apresentando um elemento traqueal posicionado entre os vasos do metaxilema. O metaxilema é formado por dois grandes vasos separados por células do parênquima lignificadas, menores que as demais presentes no colmo. Os vasos do metaxilema possuem comprimento entre 200 μm a 600 μm , sendo ligados uns aos outros verticalmente, separados por uma placa de perfuração

perpendicular ao vaso ou ligeiramente inclinada. A parede interna dos vasos é formada por camadas de parede celular secundária em espessuras diferentes, apresentando também pontoações em geometrias areoladas (LIESE, 1998).

O floema é um sistema condutor de materiais orgânicos e inorgânicos (carboidratos, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos, etc.), sendo mais especializado e complexo. É formado por feixe de fibras, elementos de tubos crivados e células companheiras que auxiliam na função de condução (LIESE, 1998). Neste sistema, os tubos são formados por células especializadas com paredes laterais e terminais crivadas, conectadas longitudinalmente, formando placas crivadas perpendiculares ao tubo, conforme visualizado na Figura 6, promovendo assim a comunicação integrada com as demais células em ambos os sentidos.

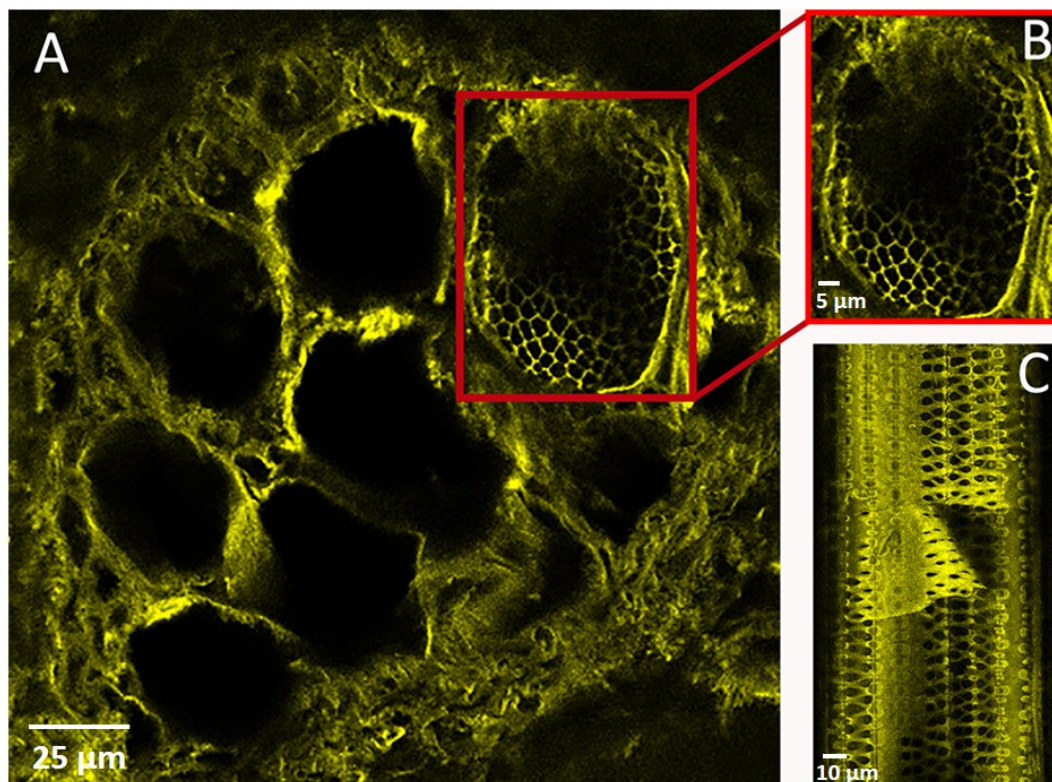


Figura 6. Imagem de microscopia confocal de varredura a laser do tubo crivado do floema. A) Seção transversal do floema, ressaltando a placa crivada. B) Seção transversal da placa crivada ampliada. C) Seção longitudinal do tubo crivado. Imagem: Karen Lúcia De Toni.

3.4.4. Constituição Química

A matriz vegetal do bambu é constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo também constituída por substâncias minoritárias como proteínas, pectina, cinzas, ácidos fenólicos, lipídios e pigmentos (ABDUL KHALIL et al., 2012). Estes constituintes majoritários estão presentes em todas as células da matriz vegetal, localizados na parede celular. A célula vegetal é revestida por uma parede celular primária, e ao longo do tempo, é desenvolvida uma parede secundária que confere maior resistência a célula. Ambas são externas à membrana plasmática.

A parede celular primária é constituída por água, hemicelulose, pectina e celulose, a qual é o componente majoritário. Em espécies como *Gossypium hirsutum* (algodão) e bambu *Dendrocamus asper*, a estrutura da parede primária é composta por duas camadas de deposição, que ocorrem em estágios diferentes nas fibras e em células parenquimáticas. A parede celular secundária é formada por celulose e lignina, sendo mais rígida e possuindo baixo teor de água. Sua deposição ocorre em camadas múltiplas, concêntricas e espessadas nas fibras, estando internamente à parede primária (GRITSCH; MURPHY, 2005).

A celulose, que constitui cerca de 55% da matriz vegetal (PEREIRA; BERALDO, 2007), é um polímero formado por monômeros de β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosose dispostos em uma conformação linear, conforme ilustrado na Figura 7.

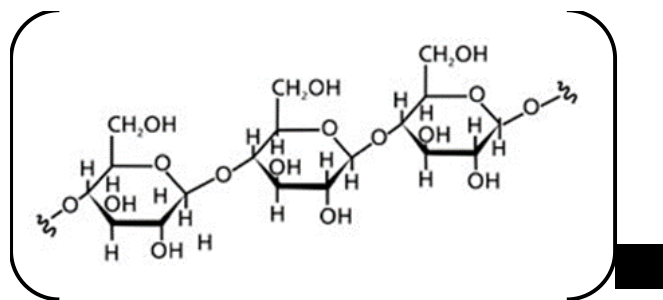


Figura 7. Estrutura química do polímero de celulose. Adaptado de UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA, (2014).

As cadeias de celulose são atraídas por forças intermoleculares, formando as microfibrilas, que compõe as fibras. As microfibrilas podem assumir uma estrutura cristalina, quando as hidroxilas das cadeias estão realizando as ligações de hidrogênio umas com as outras de forma ordenada (Figura 8). A estrutura amorfa também pode ocorrer quando estas hidroxilas não estão alinhadas. Logo a orientação dos grupos hidroxilas nas microfibrilas irá determinar a potencial resistência mecânica da estrutura (YOUSSEFIAN; RAHBAR, 2015).

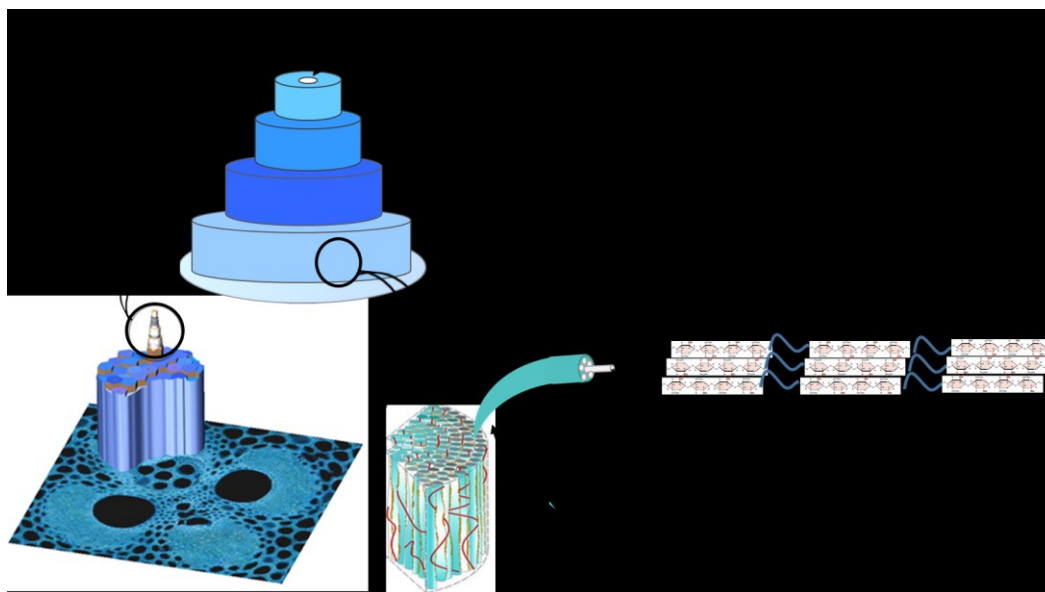


Figura 8. Estrutura da fibra. A ilustração mostra a estrutura de uma microfibrila de celulose contendo regiões cristalinas e amorfas. Adaptado de FUENTES et al. (2011).

As microfibrilas de celulose presentes nas paredes celulares (primárias e secundárias) são as mesmas, diferindo em seu grau de cristalinidade. Na parede celular secundária, ocorre o predomínio da

celulose com alto grau de cristalinidade e polimerização, que aliadas à lignina, possuem maior dureza.

A hemicelulose é um polímero formado por unidades de monossacarídeos contendo de 5 a 6 carbonos. Os principais açúcares que a compõem são a glicose, xilose, arabinose, galactose e manose. Sua estrutura possui uma cadeia ramificada e ausente de cristalinidade, sendo encontrada principalmente na parede celular primária, interligando-se nas microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio e unindo umas às outras (Jl et al., 2013) (Figura 9).

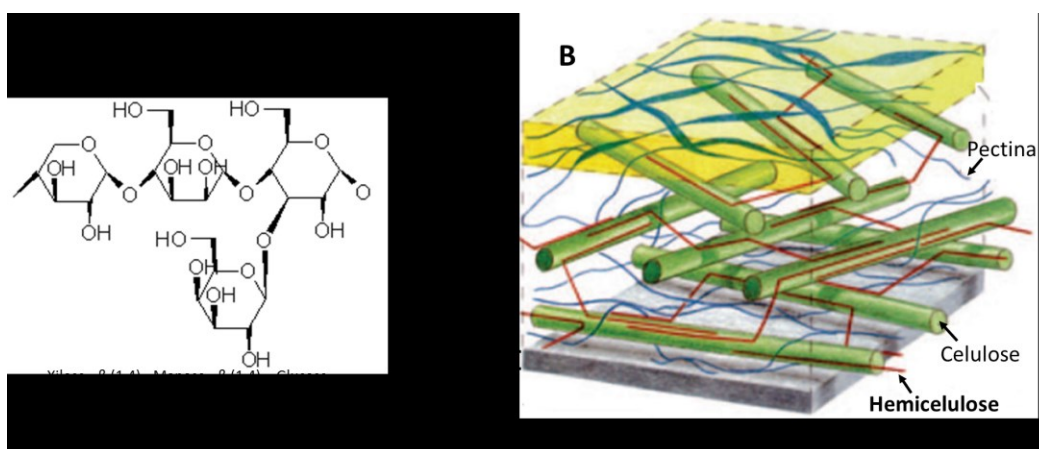


Figura 9. A) Estrutura química da hemicelulose. B) localização da hemicelulose na parede celular. Adaptado de SCHELLER; ULVSKOV (2010).

A lignina constitui cerca de 25% da matriz vegetal, contribuindo também em conjunto com a celulose, para a resistência e alta dureza do bambu, tendo sua concentração variando de acordo com os tipos e funções das células (MARINHO, 2012; PEREIRA; BERALDO, 2007). É um polímero fenólico heterogêneo derivado da polimerização oxidativa de unidades de p-hidroxifenil, guaiacila, siringila (Figura 10), as quais, dependendo da forma como estão dispostas, podem gerar três tipos de lignina com estruturas diferentes, sendo todas elas amorfas e hidrofóbicas, mas com variação em suas propriedades físicas (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; PENG et al., 2012).

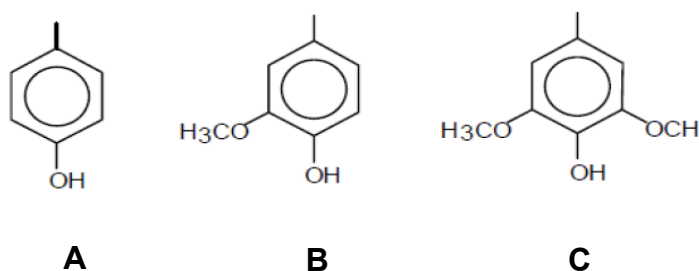


Figura 10. Estrutura das moléculas precursoras de lignina. A) p-hidroxifenil, B) guaiacila e C) siringila. Adaptado de RAZERA (2006).

A lignina é um componente da parede secundária das células e confere uma barreira impermeável à planta, protegendo contra microrganismos patógenos. Sua produção e concentração é diferenciada ao longo do desenvolvimento da planta. Nos entrenós, o processo de lignificação ocorre, no sentido longitudinal, do topo para a base, e no sentido transversal, do centro para a extremidade (PEREIRA; BERALDO, 2007). Ao longo da maturação, o teor de lignina tende a aumentar, mas se estabiliza após o primeiro ano, mantendo uma média de 23% (MARINHO et al., 2012).

3.5. Nanotecnologia

A aplicação de materiais nanoestruturados tem possibilitado o avanço tecnológico em diversas áreas da ciência. Na medicina tem possibilitado o rastreio, diagnóstico e tratamento de doenças, com o uso de dispositivos em nanoescala, medicamentos nanoestruturados e até mesmo técnicas e equipamentos nanoestruturados (*nanorobots*), empregando procedimentos menos invasivos e com menor risco de infecções. Materiais nanoestruturados também apresentaram bons resultados no setor odontológico na fabricação de resinas para próteses dentárias (ANTUNES et al., 2012)

A nanociência não está direcionada a um único setor, e estuda as propriedades da matéria em nanoescala nos mais variados ramos

tecnológicos, contribuindo fortemente em setores alimentícios, agrícolas, indústrias civis, têxtil e demais segmentos industriais(DUNCAN, 2016).

No entanto, este avanço na produção e aplicação de nano materiais apesar de aumentar a eficiência dos produtos, devido às suas características específicas, pode trazer riscos à saúde humana e altos impactos ambientais. Frente a esse desafio é necessário um conjunto de normas regulamentadoras que virão garantir a segurança dos processos de produção e utilização de nanomateriais. Atualmente a legislação em vigor na União Europeia enquadra normas regulamentadoras que garantem a fabricação e aplicação segura de materiais nanoestruturados nos segmentos onde são empregados. Outras foram sugeridas há pouco tempo e ainda estão sob revisão, para garantir a segurança dos novos nanomateriais desenvolvidos ou com novas aplicações (AMENTA et al., 2015).

A eficiência de nanoestruturas pode ser potencializada de acordo com seu tamanho, proporcionando o aumento da biodisponibilidade ou também através de técnicas de encapsulamento que permite a liberação gradativa dos ativos. Segundo a definição de nanomateriais da Comissão Europeia, para que uma dispersão receba esta nomenclatura, 50% das partículas devem ter dimensões entre 1-100 nm, independente se as mesmas estão aglomeradas ou desacopladas (AMENTA et al., 2015).

As pesquisas dentro desta área tem como principal objetivo obter estruturas cada vez menores e estudar suas propriedades físicas, considerando sua relação com a química verde, o que não é difícil, pois os processos de fabricação de nanoestruturas possibilita a aplicação dos doze princípios da química verde (DAHL; MADDUX; HUTCHISON, 2007). Neste âmbito, as nanopartículas metálicas (NPs) tem sido alvo de muitas pesquisas devido às suas propriedades físico-químicas e propriedades plasmônicas de superfície. Estão sendo empregadas no ramo de optoeletrônica, biosensores, catálise e produtos antimicrobianos (DONG et al., 2009).

3.5.1.

Síntese de nanopartículas metálicas (NPs)

Nos últimos anos, foram desenvolvidos métodos físicos e químicos de obtenção de NPs metálicas que permitem o pleno controle do tamanho, distribuição e morfologia, entre os quais, a ablação a laser, métodos de redução química, eletroquímica, irradiação com micro-ondas, redução térmica, etc. (DAHL; MADDUX; HUTCHISON, 2007). Outras medidas como a funcionalização da superfície nanoparticulada, permite sua maior estabilidade em meio hidrofílicos e hidrofóbicos. (LI, 2015).

A produção de NPs metálicas por redução química, é realizada na presença de ligantes, em sua maioria orgânicos, que podem adsorver-se à superfície da nanopartícula, aumentando a carga eletrostática entre elas e impedindo-as de agregarem, de acordo com a Figura 11 (DAHL; MADDUX; HUTCHISON, 2007).

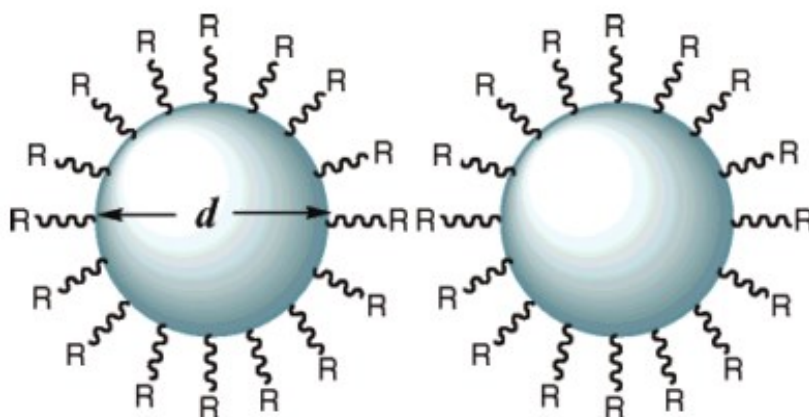


Figura 11. NPs com a superfície funcionalizada com ligante orgânico covalentemente ligado à superfície. Adaptado de DAHL; MADDUX; HUTCHISON, (2007).

Os ligantes orgânicos são unidades moleculares ou polímeros, neutros ou carregados, que atuam diminuindo a interação entre as nanopartículas, conferindo mais estabilidade à dispersão coloidal. Desta forma, pode-se obter NPs carregadas positivamente, negativamente, e neutras (ANTUNES et al., 2013). Além disso, os ligantes podem agir como “modeladores” da morfologia do material nanoestruturado, induzindo a forma geométrica desejada às NPs (LI, 2015).

3.5.1.1.

Síntese de nanopartículas de prata com citrato trissódico (NPs-Ag-citrato)

A síntese de NPs metálicas empregando o citrato trissódico foi a mais usada durante anos, fornecendo estruturas estáveis, monodispersas e relativamente inofensivas ao meio ambiente.

Nesta metodologia o íon citrato desempenha a dupla função de promover a redução metálica e simultaneamente estabilizar a estrutura, fornecendo uma geometria esférica e conferindo carga global negativa à superfície impedindo a formação de aglomerados (ANTUNES et al., 2013).

Na Figura 12 é possível visualizar a estrutura plana do citrato trissódico, onde observa-se a presença de três cargas negativas, que são conferidas às NPs, após a síntese na presença de íons citrato. No revestimento das NPs, o metal está ligado ao ligante por coordenação, respeitando-se o número de coordenação (NC) do átomo /íon metálico. A prata, possui NC=2, podendo ser o ligante coordenado a ela por dois átomos (SHRIVER; ATKINS, 2008).

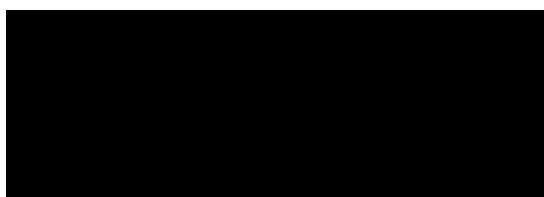


Figura 12. Estrutura molecular do citrato trissódico. Adaptado de SIGMA ALDRICH, (2016).

No entanto, apesar de viabilizar um processo mais limpo, a síntese de NPs metálica usando o citrato trissódico, um agente redutor fraco, fornece estruturas maiores, pois a taxa de redução é baixa e a polidispersividade é muito alta (JIN et al., 2015a). Neste caso, estudos

empregando o borohidreto de sódio, um agente redutor forte, mostraram que ele promove a nucleação rápida, e fornece partículas com diâmetros menores, controlados e monodispersas estabilizadas pelos ligantes (Figura 13) (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014; DAHL; MADDUX; HUTCHISON, 2007; DESAI et al., 2012).

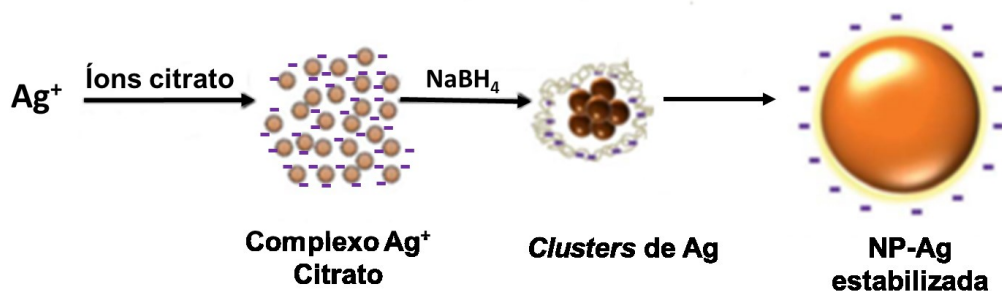


Figura 13. Mecanismo de síntese de NPs-Ag com auxílio de um agente redutor forte ($NaBH_4$). Adaptado de AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, (2014).

3.5.1.2.

Síntese de nanopartículas de prata com quitosana (NPs-Ag-quitosana)

A Quitosana é um copolímero biocompatível natural, derivado da quitina, com conformação linear, formado por unidades de 2 – amino – 2 – desoxi – *D* – glicopirranose e 2 – acetamido – 2 – desoxi – *D* – glicopirranose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. É classificada como biopolímero e é empregada largamente na biomedicina, indústria alimentícia e odontologia, devido a sua biodegradabilidade.

Pode ser encontrada com vários graus de desacetilação (GD), ou seja, o número de unidades glucosaminas em relação ao número de unidades N-acetil-D-glucosamina no polímero varia e é facilmente solúvel em soluções ácidas, onde ocorre a protonação do grupo amina, conferindo uma carga positiva ao polímero (Figura 14).

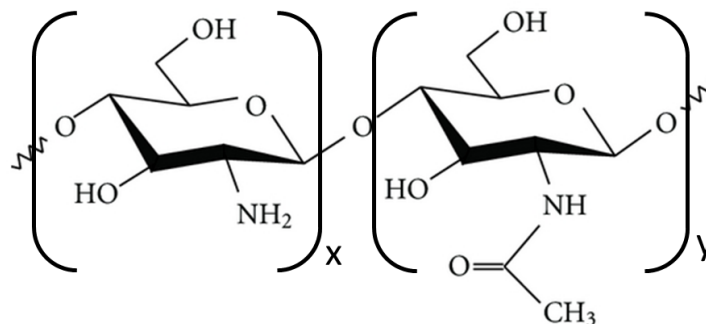


Figura 14. Estrutura química do polímero de quitosana. Adaptado de RAPOSO, (2013).

A quitosana tem sido estudada na fabricação de nanomateriais, atuando como estabilizante de pontos quânticos, oferecendo reprodutibilidade dos processos e controle do tamanho das partículas (DÍAZ et al., 2011).

Em cada monômero de sua estrutura há três sítios ativos (Figura 14): o grupo amino e duas hidroxilas, que podem facilmente se coordenar ao metal e estabilizar as NPs (KIM et al., 2008). Por ser uma cadeia polimérica geralmente longa, em solução aquosa tende a assumir uma conformação globular, podendo manter diversas NPs em um mesmo agregado polimérico (Figura 15)(KIM et al., 1999).

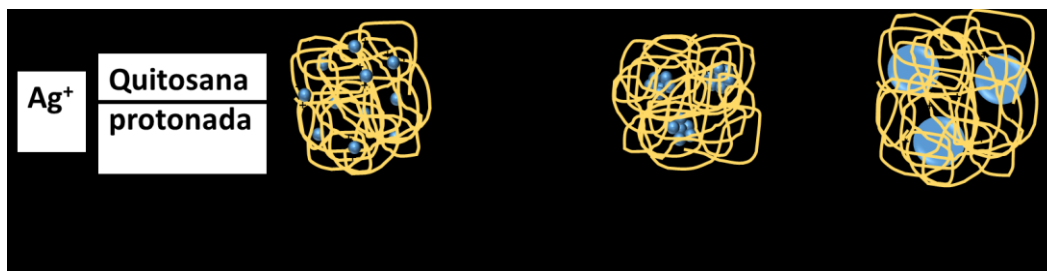


Figura 15. Mecanismo de formação de nanopartículas de prata com o ligante quitosana. Imagem: Raquel Martins.

Estudos relacionados a capacidade de quelação de íons metálicos pela quitosana e derivados, propuseram uma estrutura de complexação razoável para a captura de íons Cu^{2+} , chamado *Pendant Model*, que sugere o cobre coordenado à quitosana pelos grupos amino e hidroxila (Figura 16) (OGAWA; OKA; YUI, 1993).

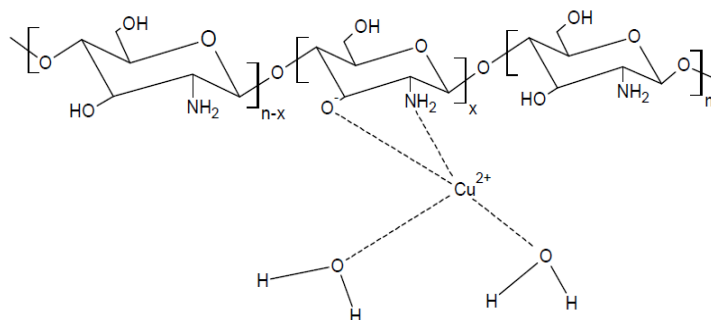


Figura 16. Estrutura de complexação do cobre pela quitosana. Adaptado de OGAWA; OKA; YUI (1993).

3.5.1.3. Síntese em Fluxo

As reações em sistema microfluídico tem contribuído significativamente para a obtenção de processos sustentáveis. Isto porque tem propiciado o alcance de todos os princípios que regem o conceito de química verde (Figura 17).

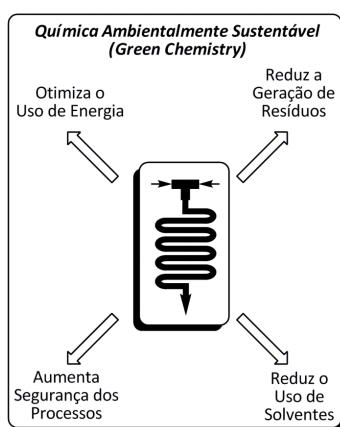


Figura 17. Microrreatores: Uma alternativa na busca da Química Ambientalmente Sustentável. Adaptado de MACHADO et al. (2014).

Muitas reações químicas processadas em sistemas de fluxo contínuo, têm mostrado ótimo rendimento, redução de tempo e economia de reagentes, além de não formarem subprodutos. O sistema microfluídico permite o pleno controle: das concentrações e da razão molar entre os reagentes empregados, impedindo que sejam gastos de forma desnecessária; do tempo de residência no meio reacional de

acordo com o fluxo e do volume interno do microrreator (SOUZA; MIRANDA, 2014).

No geral, as reações em sistema microfluídico permitem que as sínteses sejam realizadas em fluxo contínuo, ou seja, reagentes e produtos entram e saem simultaneamente dos reatores, que possuem uma geometria tubular, tendo seu volume interno variando de 1L a 15 nL. De acordo com a capacidade de volume interno do reator, o mesmo pode receber diferentes classificações como indicado na Figura 18. (MACHADO et al., 2014).

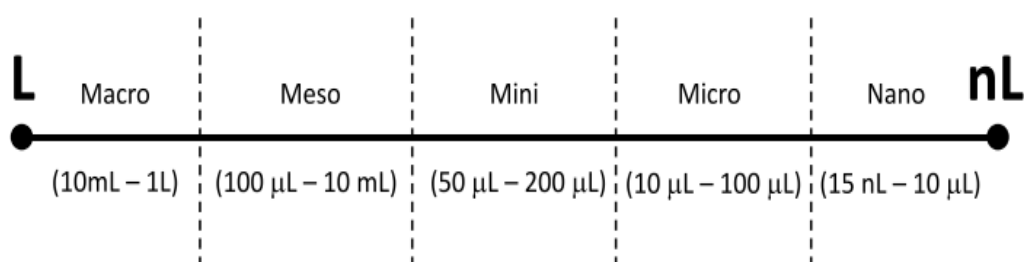


Figura 18. Tipos de reatores de acordo com seus volumes internos. Fonte: (MACHADO et al., 2014).

A geometria tubular destes reatores atrelada ao diâmetro reduzido e longo comprimento, constituem o principal diferencial deste sistema em relação aos reatores tradicionais, pois permite o maior contato das paredes com o meio reacional, permitindo o aumento da eficiência de transferência de energia e massa para o sistema reacional. Além disso, os microrreatores estão dispostos em forma de *zig-zag* (Figura 19), podendo gerar um grande volume interno dos microcanais sem ocupar grandes espaços, o que auxilia a possibilidade de trabalhar na escala de laboratório. Podem ser acoplados em paralelo para um escalonamento do sistema reacional (*numbering-up*), diferentemente dos reatores tradicionais, cujo escalonamento de volume comporta um custo elevado para otimização do processo em volumes maiores.



Figura 19. Esquema de um microrreator com duas entradas, uma zona de mistura e uma saída dos produtos logo depois da zona de residência. Adaptado de FUTURE CHEMISTRY (2010).

Outra vantagem da síntese em fluxo contínuo é a possibilidade de acoplar dispositivos de monitoramento *on-line* de pH, temperatura, UV-visível, índice de refração em pontos diferentes do microrreator, permitindo verificar o andamento das reações em tempo real (MACHADO et al., 2014) (Figura 20).

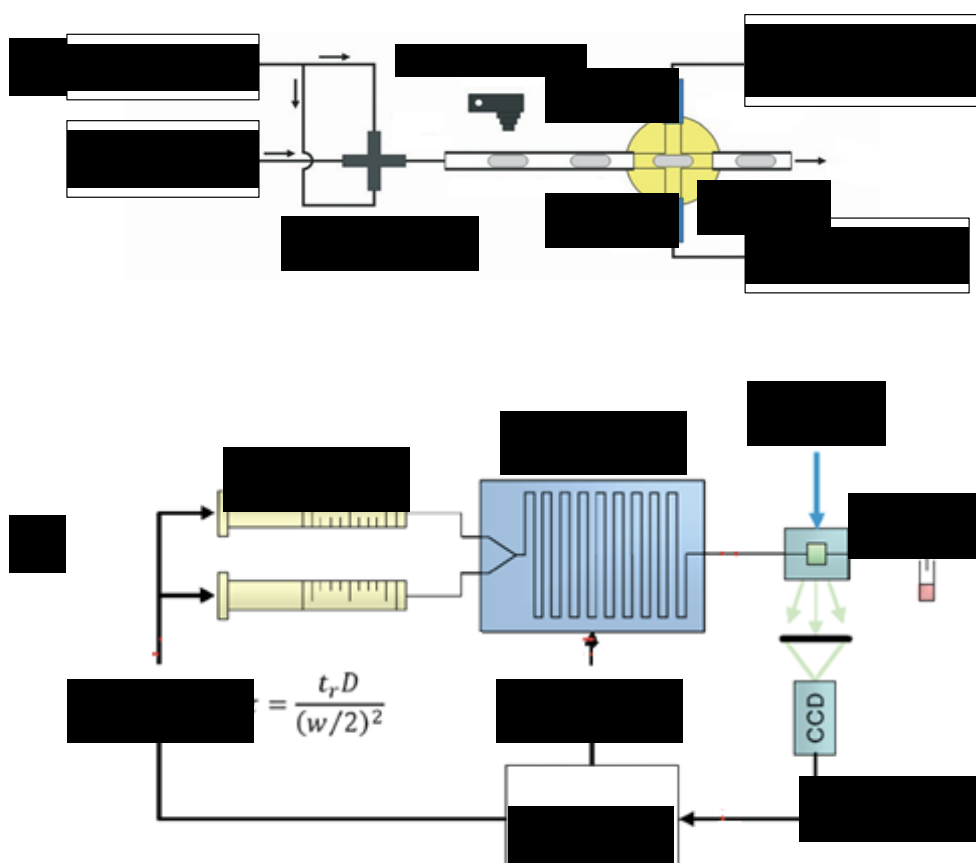


Figura 20. Esquematização de sistemas microfluídicos integrados a análise espectroscópica. A) microrreator acoplado ao UV-Vis. Adaptado de YUE et al. (2013). B) Microrreator acoplado à análise RAMAN. Adaptado de ASHOK et al. (2011).

3.5.1.4.

Propriedades antimicrobiano das NPs-Ag

Os revestimentos antimicrobianos têm tido um crescimento exponencial, devido aos ótimos resultados obtidos em muitas áreas, dentre elas na medicina, contra as infecções hospitalares. Acredita-se que a formação de camadas de substâncias antimicrobianas pode impedir a proliferação dos micro-organismos. Essa camada pode funcionar por mecanismos diferentes, dentre eles, com a liberação gradativa do agente antimicrobiano, agindo contra os micro-organismos em contato direto ou de forma indireta (PADOVANI et al., 2015). Diversas substâncias estão sendo testadas, dentre elas, as NPs-Ag. O potencial antimicrobiano das NPs-Ag é amplamente conhecido em diversos setores tecnológicos. Desde a indústria alimentícia até a indústria de materiais odontológicos, a prata nanoparticulada possui efeito inibidor de mais de 650 espécies de micro-organismos, sendo eles bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e até vírus (ANTUNES et al., 2013; PETICA et al., 2008).

De acordo com a literatura, a atividade antimicrobiana das NPs-Ag está intimamente ligada com a sua geometria, tamanho e concentração, apresentando maior eficiência em estruturas esféricas, com diâmetros menores e mais concentradas (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014; PULIT et al., 2013).

Nas bactérias, as NPs podem agir no meio extracelular e intracelular. Quando fora da célula, as nanopartículas interagem com os componentes da membrana celular e a destroem. No interior da célula, as NPs podem ser oxidadas gradativamente, aumentando as espécies reativas de oxigênio (ROS- *Reactive oxygen species*), ou podendo se ligar a grupos sulfírilas durante a síntese de proteínas e interferir na replicação do DNA (BEER et al., 2012; PADOVANI et al., 2015).

O mecanismo de atuação da prata contra os fungos, ainda não é claro, mas acredita-se que as NPs-Ag possam atuar acelerando a degradação oxidativa da membrana celular e interferindo no processo de divisão celular, apresentando também grande afinidade pelo fósforo e enxofre presentes no meio intracelular, podendo interferir em outros processos bioquímicos dos fungos (KIM et al., 2012). Além disso, KASPROWICZ; KOZIOŁ; GORCZYCA, (2010) contatou em seus estudos com o fungo *Fusarium culmorum*, que a presença da prata nanoparticulada provoca a diminuição da formação e germinação dos esporos, reduzindo o crescimento do micélio.

Apesar destes mecanismos não serem bem definidos, estudos mostram resultados bastante satisfatórios sobre o efeito antifúngico das NPs-Ag (PINTO et al., 2013). Pesquisas realizadas na Coreia revelaram seu potencial inibidor contra o fungo *Raffaelea sp.*, principal responsável pelas doenças ocorridas nos carvalhos, sendo cogitado o tratamento desses vegetais com as dispersões de NPs-Ag, objetivando inibir ou até mesmo reverter as doenças fúngicas. Além disso, o mesmo grupo avaliou o desempenho das NPs contra fungos atacantes de frutas e legumes, obtendo excelentes resultados neste trabalho também (KIM et al., 2009, 2012).

Uma questão importante a ser observada no emprego das NPs contra micro-organismos em geral é a presença de agentes estabilizantes na dispersão e qual sua natureza química, pois estes podem ser carregados ou não, e podem auxiliar na cinética da liberação do agente antimicrobiano e ainda potencializar seu efeito (CLOUTIER; MANTOVANI; ROSEI, 2015).

Neste sentido a quitosana tem se destacado por suas propriedades peculiares e seu efeito antimicrobiano, participando das inovações odontológicas, biomédicas e em demais áreas. Seu efeito contra as bactérias está baseado na interação dos grupos amino presentes em sua estrutura, que quando protonados, se ligam à membrana celular. Essa ligação causa a permeabilidade da membrana celular, podendo até causar sua ruptura e promovendo o descontrole na saída de nutrientes.

Além disso, os grupos aminos protonados podem se ligar ao DNA, inibindo a síntese de proteínas (FRIEDMAN et al., 2013).

O bambu, por ser um material vegetal, é vulnerável aos ataques microbianos e a insetos em geral, principalmente pelo alto teor de amido (AZZINI, 1984; AZZINI; BERALDO, 2000). De acordo com MOHANAN, (1997), foram registrados cerca de 440 fungos que podem atacar o bambu, causando danos desde os rizomas até as sementes. Dentre eles podemos citar alguns gêneros e espécies de fungos que causam doenças especificamente ao bambu *Dendrocalamus giganteus*: *Acremonium-like*, *Arthrinium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Uredo ignava*, *Fomes lignosus*, *F. lignosus* (BERALDO; SETTE, 2008; MOHANAN, 1997).

Alguns destes fungos causam apenas doenças superficiais. Outros fungos possuem a capacidade de degradar materiais lignocelulósicos como o bambu, podendo penetrar na estrutura do colmo e comprometer suas propriedades mecânicas de forma irreversível, sendo necessários cuidados específicos desde o corte até a aplicação (BERALDO; SETTE, 2008; TIBURTINO et al., 2015b). Tratamento com substâncias antimicrobianas é uma alternativa eficiente neste quesito, podendo ser determinante na durabilidade do material e consequentemente no sucesso de sua aplicação (CLOUTIER; MANTOVANI; ROSEI, 2015; GHAVAMI, 2005). A pesquisa realizada por TIBURTINO et al., (2015a) mostrou que o tratamento do bambu *Dendrocalamus giganteus* com soluções preservativas comerciais proporcionou maior resistência ao fungo *Polyporus fumosus*, conhecido por consumir a hemicelulose e lignina em madeiras, causando a perda de massa e diminuição de suas propriedades mecânicas. Nesse sentido, acredita-se que as NPs-Ag, da mesma forma, possam proteger o bambu contra as doenças fúngicas.

3.6.

Técnicas analíticas

Nesta seção não serão apresentados os conceitos básicos de todas as técnicas utilizadas devido à grande quantidade de informações que há sobre a maioria delas no meio científico. Todavia, focaremos na

importância científica das técnicas analíticas microtomografia computadorizada e microscopia confocal de varredura a laser pela inovação em suas aplicações na análise do bambu.

3.6.1.

Microtomografia computadorizada

A μ CT permite o estudo de estruturas em três dimensões, possibilitando seu conhecimento, modificações e comportamento diante de ações externas. Ela fornece resultado em microescala, o qual permite a caracterização do material considerando o seu volume e a distribuição dos seus constituintes (SILVA, 2014).

A μ CT é uma técnica não destrutiva, baseada na interação de raios-X com materiais de diferentes densidades, reconstruindo a estrutura tridimensional da amostra, que é girada ao longo da análise, e revelar a estrutura da amostra em qualquer ângulo desejado, sendo por isso uma técnica de grande interesse na análise de compósitos em geral (NETO et al., 2011).

Na μ CT, quando os raios-X incidem sobre uma amostra, cada substância presente no material analisado interage de maneira diferente com essa onda eletromagnética, seja absorvendo ou espalhando parte da radiação incidida. O microtomógrafo detecta a atenuação da intensidade da radiação incidente, gerando várias projeções da amostra analisada. As projeções são tratadas por um algoritmo de reconstrução, criando imagens bidimensionais, que são processadas e geram o modelo tridimensional da amostra, conforme ilustrado na Figura 21 (FERNANDES; APPOLONI; FERNANDES, 2009).

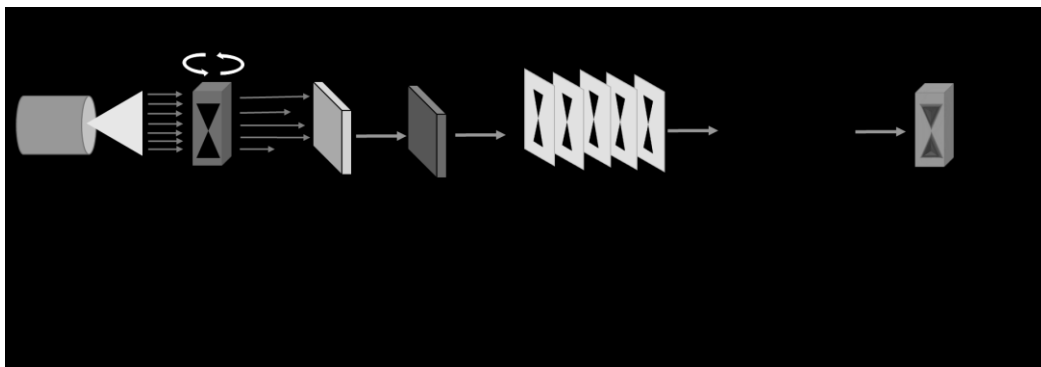


Figura 21. Esquema de funcionamento do microtomógrafo (μ CT). Imagem: Raquel Martins.

A interação da radiação depende da densidade dos materiais. Substâncias com maior densidade tendem a absorver/espalhar mais radiação, causando maior atenuação. Assim, quando os raios-x interagem com a amostra, ocorre a atenuação desta radiação, caracterizando a presença de substâncias com densidades diferentes. A variação da radiação incidente em cada parte da amostra gera um coeficiente de atenuação (μ) relacionado a esta variação, obtido pela equação 1 abaixo:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad 1$$

onde: I_0 e I são as intensidades dos raios incidente e transmitido, respectivamente; μ é o coeficiente de atenuação linear; e x é a espessura da amostra analisada. De acordo com a equação 2, podemos entender que quanto maior for a atenuação da radiação, maior será o coeficiente de atenuação linear, pois:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\mu x} \rightarrow \ln \frac{I}{I_0} = -\mu x \rightarrow \ln(I_0 - I) = \mu x \quad 2$$

E quanto maior for a atenuação da radiação, maior será a densidade do material atenuador, pois significa que este interagiu mais com a radiação incidida. Nas imagens obtidas através da μ CT, esta variação de densidade e coeficiente de atenuação é traduzida em uma escala de tons de cinza. Quanto mais densa for a região, mais clara ela aparecerá, pois menos radiação é detectada. Quanto menos denso for o material, mais radiação é transmitida, e mais escura é a região relacionada (KETCHAM; CARLSON, 2001).

O funcionamento da técnica é universal, mas o modo de operação dependerá do modelo do equipamento utilizado. A maioria dos equipamentos são constituídos por uma fonte de raios-x, um sistema rotacional, que comporta a amostra; e um sistema de detecção. O sistema de detecção é formado por um cintilador e uma câmera CCD (Charge Coupled Device). O cintilador é o dispositivo responsável por converter a radiação atenuada em luz, que é detectada pela CCD e convertida em projeções 2D com diferentes tons de cinza (ALVES et al., 2014; ALVES, 2015; KETCHAM; CARLSON, 2001).

A técnica tem sido empregada em vários ramos como metalurgia, compósitos de todos os tipos e até mesmo na botânica, pois possibilita uma caracterização com resoluções até em nanoescala dependendo do sistema de detecção adotado (ALVES, 2015).

Trabalhos realizados por FERNANDES; APPOLONI; FERNANDES (2009) e LIMA et al. (2007) relacionados ao estudo de medicamentos e materiais cerâmicos respectivamente, mostraram a eficiência da μ CT na avaliação da estrutura, porosidade, forma e geometria. Pesquisas relacionadas a porosidade de rochas minerais e materiais odontológicos revelaram o mesmo desempenho da técnica, possibilitando a detecção e quantificação de minerais nas rochas e detritos no dentes (DE-DEUS et al., 2014a, 2014b; LONG et al., 2009).

A aplicação da μ CT no estudo de estruturas vegetais também tem sido bem-sucedida, apesar de ainda ser uma aplicação pouco difundida. Em alguns trabalhos, foi possível a caracterização de embolia xilemática causada pela entrada de ar após o corte do vegetal (COCHARD; DELZON; BADEL, 2015). Além disso, as tomografias geradas podem

passar por um processamento específico e fornecer a quantificação dos materiais presentes na amostra.

3.6.2.

Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Ao longo dos anos, a evolução da microscopia óptica promoveu o maior conhecimento das estruturas em escalas cada vez menores. Isto propiciou novas descobertas e o avanço de pesquisas em várias áreas.

Neste âmbito, a tecnologia da microscopia confocal sobressaiu à microscopia óptica e apresentou significativa contribuição. Um dos diferenciais de um sistema confocal é o pinhole, que consiste em uma fenda que converge a radiação transmitida pela amostra para o sistema de detecção, promovendo sinais mais nítidos e contribuindo para a obtenção de imagens bi- e tridimensionais (2D e 3D) com maior resolução. Além disso a técnica o estudo da imagem tridimensional em alta definição e contraste.

Atualmente existem três tipos de microscopia confocal, dentre elas, destaca-se a microscopia confocal de varredura a laser (CLSM – *Confocal laser scanning microscopy*) pela qualidade e resolução superiores das imagens de cortes ópticos.

O funcionamento da técnica está baseado na incidência de um feixe de luz monocromático sobre a amostra, promovendo a excitação dos elétrons que estão nos estados fundamentais a níveis eletrônicos mais energéticos (WILHELM et al., 2000). Quando os mesmos retornam ao seu estado de origem, a radiação absorvida é liberada em frequências e comprimentos de onda específicos, dentro da região do visível, chamada fluorescência. Esta, é detectada e convertida em corrente elétrica gerando

a imagem pelo computador. A Figura 22 representa o funcionamento de um microscópio confocal geral.

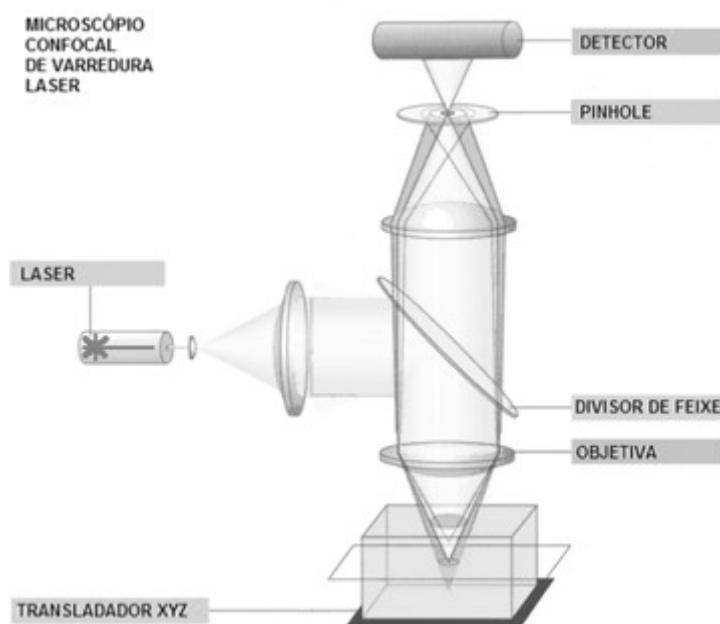


Figura 22. Funcionamento de um microscópio confocal. Adaptado de OLIVEIRA, (2012).

Obviamente, nem todas as estruturas químicas emitem fluorescência, mas isto não impossibilita a identificação destas pela CLSM. A detecção desta, pode ser realizada através da marcação de uma segunda molécula que emite fluorescência e possua afinidade específica com a substância de interesse. Estas moléculas são chamadas fluorocromos. Os fluorocromos em sua maioria, são específicos não para uma molécula, mas sim para grupos funcionais particulares. Neste caso podemos citar o calcoflúor White, um fluorocromo normalmente empregado na identificação da parede celular de fungos e células vegetais. Sua faixa de emissão de fluorescência está compreendida entre 375nm e 425 nm quando irradiada por uma fonte de excitação de 350 nm, possuindo afinidade com polissacarídeos $\beta(1-3)$ e $\beta(1-4)$, geralmente encontrados em polímeros de celulose e quitina (HARRINGTON; HAGEAGE; ABMM, 2003). Esta afinidade está diretamente ligada aos grupos sulfônicos carregados negativamente, observados na Figura 23, e por isso deve ser utilizado em pH acima de 5,5 (RAM; KLIS, 2006).

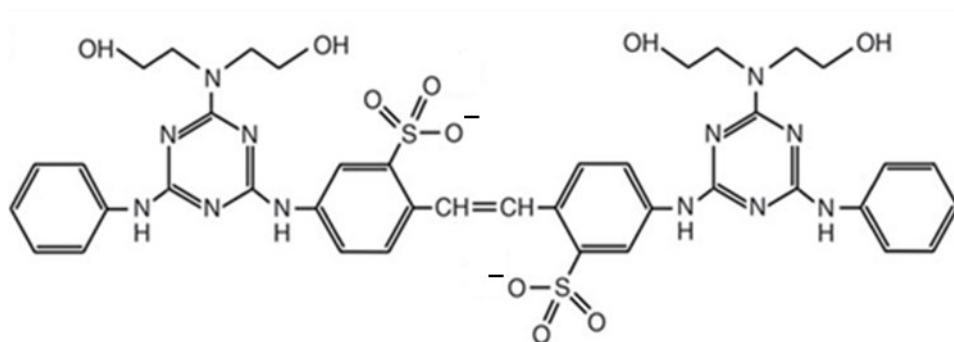


Figura 23. Estrutura química do fluorocromo calcoflúor White com afinidade para celulose. Adaptado de RAM; KLIS (2006).

O fluorocromo auramina O, cuja estrutura é apresentada na Figura 24, também é empregado comumente em análises de matrizes biológicas, sendo específica para compostos fenólicos.

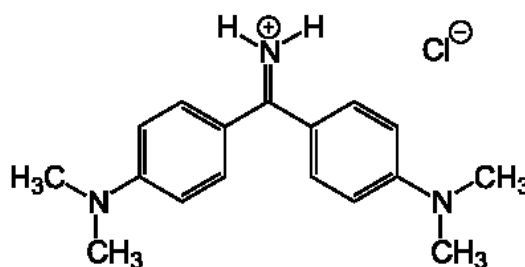


Figura 24. Estrutura química do fluorocromo, auramina O com afinidade química pela lignina. Adaptado de MALL; SRIVASTAVA; AGARWAL (2007).

A CLSM é amplamente aplicada no estudo dos organismos, possibilitando o conhecimento e desenvolvimento de suas estruturas. Uma pesquisa relacionada com reprodução da planta *Pitcairnia encholirioides* foram desenvolvidos a partir dos resultados obtidos com a técnica, utilizando-se fluorocromos específicos para detecção de calose, compostos lipídicos e celulose na matriz vegetal e permitindo o entendimento do processo de reprodução realizado pela planta (MENDES et al., 2016).

O estudo de *Pinus yunnanensis*, foi realizado identificando a distribuição de lignina nas células vegetais da madeira, sendo possível detectar as camadas das paredes celulares secundárias. Neste trabalho, os resultados obtidos na CLSM foram necessários para identificar as porções de lignina e celulose nos diferentes tecidos da matriz vegetal.

4

Insumos, reagentes, instrumentação e metodologia

Neste capítulo será apresentada a metodologia detalhada de todas as sínteses e análises realizadas nesta pesquisa, bem como os equipamentos empregados, além dos reagentes e materiais necessários para sua realização.

4.1.

Insumos

Para a síntese de nanopartículas de prata (NPs-Ag), em fluxo contínuo, empregou-se: um microrreator de borosilicato com 500 μm de diâmetro interno, volume interno de 100 μL e dimensões 45.3 x 15.3 x 2.2 mm, suportando temperaturas de 0°C a 90°C, modelo B-111, *Future Chemistry* (Holanda); um microrreator de borosilicato com 0,15 mm de diâmetro interno, volume interno de 6 μL e dimensões 45 x 15 x 1.8 mm, suportando temperaturas de 0°C a 90°C, modelo W.Buesink R150.332.2, *Micronit* (Holanda); suporte de microrreator de aço inoxidável e polietereetercetona (PEEK), modelo B-246, *Future Chemistry* (Alemanha); suporte de microrreator, modelo 4515, *Micronit* (Holanda); conectores macho de PEEK, rosca de 10-32, adaptáveis a tubos de 1,57 mm de diâmetro externo, suportando pressões até 345 bar, modelo F120, *Micronit* (Holanda); adaptadores de PEEK, adaptáveis a conectores macho com rosca de 10-32, modelo P658, *Micronit* (Holanda); porca de PEEK, compatíveis com tubos de 1,57 mm de diâmetro externo, rosca 6-32, suportando pressões de até 259 bar, modelo M-660, *Micronit* (Holanda); porca de PEEK compatíveis com tubos de 1,57 mm de diâmetro externo, rosca 6-40, suportando pressões de até 259 bar modelo M-644-03, *Future Chemistry* (Alemanha); anéis de aço inoxidável e virolas de PEEK, compatíveis com tubos de 1,57 mm de diâmetro externo,

modelo FC_FB_KIT, *Micronit* (Holanda); tubos de etileno tetrafluoretileno (ETFE) com diâmetro interno de 0,50 mm e 0,75 mm, com 1,57 mm de diâmetro externo, suportando pressões de até 276 bar e 80°C, *Micronit* (Holanda), mini guilhotina portátil e seringas de borosilicato Gastight com 10,3 mm de diâmetro, 5 mL de volume, suportando pressões até 7 bar, modelo B-247, Future Chemistry (Alemanha).

Para as análises de caracterização das NPs-Ag, utilizou-se cubeta de quartzo com 10 mm de caminho ótico e 3,5 mL de volume, modelo Q-4, Ion Lab (Brasil); cubetas e células de potencial zeta descartáveis para medições aquosas, Horiba (Japão); micropipetas reguláveis com faixa de volume de 50-200 µL e 200-1000 µL e ponteiros de polipropileno com volumes máximos de 200 µL e 1000 µL, Kasvi (Brasil); grade de transmissão do tipo FORMV/CARB SUBST 200M NI PK/50, Ted Pella Inc. (EUA).

Para as análises com o Bambu, foram necessárias lâminas de aço para corte, do tipo Single Edge, Blue Carbon Steel, PAL[®] Blades, Ted Pella Inc., (EUA); lâminas de vidro nas dimensões 26.0 x 76.0 x 1.0 mm, comum lapidada, modelo Precision Glass Line, CralPlast (Brasil); lamínulas nas dimensões 24 x 40 x 0.13, Global Glass, Global Trade Technology (Brasil); disco de metal com borda de diamante, nas dimensões 76,2 x 0,15 x 12,7 mm, COMMAL (Brasil). Além disso, utilizou-se vidrarias volumétricas, béqueres, espátulas, suportes universais, tubos falco, pipetas pasteur descartáveis e frascos de vidro de 10 mL, 20 mL e 50 mL.

4.2. Reagentes

A síntese de NPs-Ag foi realizada utilizando-se nitrato de prata (> 99,9% m/m), borohidreto de sódio (99% m/m), citrato trissódico (99% m/m), quitosana de baixo peso molecular (grau de desacetilação>75%) e ácido acético (> 99,7% v/v); todos fornecidos pela Sigma Aldrich, Brasil. A caracterização das NPs-Ag foi realizada empregando-se um padrão comercial de NPs-Ag sintetizada com citrato trissódico, com $19,9 \pm 2,9$ nm

de diâmetro metálico e 27,2 nm de diâmetro hidrodinâmico, PELCO Citrate NanoXact™ Silver, Ted Pella Inc. (EUA).

Para o estudo do Bambu, empregou-se etilenodiamina (> 99,5% v/v), os fluorocromos calcoflúor White (> 90% m/m) e auramina O (> 80% m/m) fornecidos pela Sigma Aldrich, Brasil.

4.3.

Amostras

A presente pesquisa foi baseada em testes realizados com cortes do Bambu *Dendrocalamus giganteus*, posicionados na base do colmo, o qual foi cortado na altura de 1,5 m do solo. O bambu possuía quatro anos de idade quando cortado e pertencia à Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, SP.

4.4.

Instrumentação

A síntese de NPs-Ag foi realizada em sistema de fluxo contínuo, com o auxílio de bombas-seringas, nas dimensões 14.6 x 22.9 x 11.43 cm, com alojamento para uma seringa, modelo B-230, Future Chemistry (Holanda); um controlador de temperatura com alta precisão atuando na faixa de 0° C a 90° C, modelo B-223, *Future Chemistry* (Holanda); uma balança com precisão analítica de quatro casas decimais, modelo Mark M214A, Bel (Itália); purificador de água, Milli-Q, Millipore (EUA).

A caracterização das NPs-Ag foi obtida com o auxílio de um espectrômetro com funcionamento na região do UV/Vis/NIR, na faixa de comprimento de onda de 175 nm a 3300 nm, duplo feixe, modelo Lambda 950, Perkin Elmer (EUA), atuando na faixa de controle de temperatura para medição do potencial zeta de 1°C a 70°C, modelo SZ-100 Nanopartical, Horiba (Japão); um liofilizador, modelo freezezone 1, Labconco (EUA); um espectrômetro executado na região do infravermelho, com capacidade de funcionamento na faixa de número de onda de 8300 cm⁻¹ a 350 cm⁻¹, modelo Spectrum Two(FT-IR), Perkin

Elmer (EUA;) e um microscópio eletrônico de varredura FE-SEM, com detectores SEI e LEI, voltagem máxima de 30kV, operado no modo varredura e transmissão em baixa voltagem (MEVT), modelo JSM-6701F, Jeol (EUA).

Para análise morfológica do Bambu e impregnação do mesmo com as NPs-Ag sintetizadas, empregou-se uma máquina de corte preciso, com capacidade de operação na faixa de velocidade de 100 rpm a 420 rpm, comportando discos com diâmetro de 75 a 127 mm e peso máximo sobre a amostra até 350 g, Miniton, Struers (EUA); um micrótomo rotativo, modelo SM 2000R, Leica (Alemanha); um sistema de vácuo, formado por um dessecador e uma bomba de vácuo e compressor, atuando com um deslocamento de ar de 2,09 m³/h, proporcionando o vácuo final de 28,8"/720mmHg, bivolt, modelo 132-tipo 2 VC, Primatec equipamentos (Brasil); um difratômetro de raios-x com detector Lynxeye, operando com tubo de cobre ($\lambda = 1.548\text{\AA}$), modelo D8 discover, Bruker (EUA); um microtomógrafo com resolução espacial de 0,7 μm , constituído por uma fonte de raios-X microfocus, com um detector trabalhando simultaneamente em fase de ampliação geométrica e um cintilador responsável por transformar os raios X em luz visível, modelo X radia 510 Versa, Zeiss (Alemanha); um microscópio confocal de varredura a laser que fornece imagens com alta resolução em 2D e 3D, mesmo com sinais fracos, pois conta com um sistema combinado de um prisma e um detector de tubo fotomultiplicador altamente dinâmico permitindo uma separação espectral superior, além de ser equipado com quatro lasers de excitação 405, 488, 561 e 635 nm com intensidade regulável e sem filtros, e objetivas de 10x, 20x, 40x e 63x, , modelo TCS SPE, Leica (Alemanha);

4.5. Metodologia

A metodologia deste trabalho foi organizada de acordo com o fluxograma ilustrado na figura 25 abaixo:

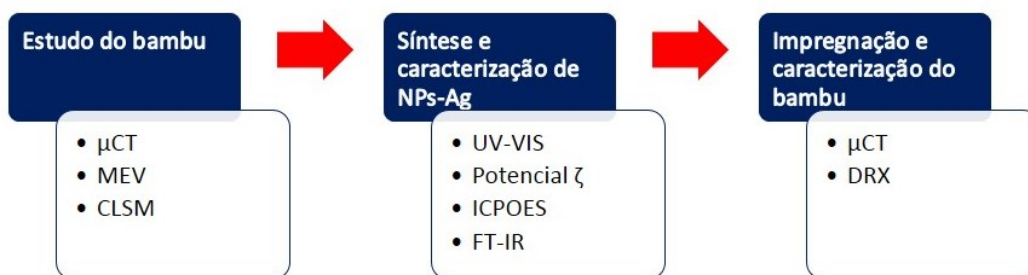


Figura 25. Fluxograma de análises realizadas em cada etapa do trabalho.

4.5.1. Preparo de soluções

Preparou-se soluções de nitrato de prata (AgNO_3), citrato trissódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) e borohidreto de sódio (NaBH_4) na concentração de $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$; solução de hidróxido de sódio (NaOH) a $1,00 \text{ mol L}^{-1}$; solução de ácido acético (CH_3COOH) a 1% (v/v) e soluções de calcoflúor white e auramine O na concentração de 0,1 g L. Todas as soluções citadas foram preparadas seguindo o manual de soluções e reagentes (MORITA; ASSUMPÇÃO, 1972). A solução de quitosana foi preparada de forma específica, conforme o protocolo presente no apêndice.

4.5.2.

Preparo da amostra e Estudo do Bambu

4.5.2.1.

Microtomografia computadorizada do bambu

As amostras de bambu sem tratamento com dimensões $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}$ foram analisadas no microtomógrafo seguindo os parâmetros ilustrados na tabela 1. Em seguida foram obtidas imagens tridimensionais que foram avaliadas, identificando-se os elementos que compõem a morfologia interna e externa do bambu.

Tabela 1. Parâmetros utilizados na análise do bambu sem tratamento.

Parâmetros	
Objetiva	4x
Pixel (μm)	4
Voltagem (kV)	80
Potência (W)	7
Tempo de exposição (s)	0.2
Número de projeções	1600

4.5.2.2.**Microscopia eletrônica de varredura do bambu**

Para esta análise, utilizou-se cortes do bambu sem tratamento com dimensões de 1 cm x 0,5 cm x 0,1 cm (comprimento x espessura x largura), posicionados sobre uma fita de cobre. O microscópio eletrônico foi operado a 1.0 kV, em vácuo com uma distância de trabalho de 14,5 mm, utilizando o detector LEI (*Low electron image*), fornecendo resoluções de 2,2 nm.

4.5.2.3.**Microscopia confocal de varredura a laser do bambu**

Reservou-se duas seções do colmo de bambu nas dimensões 0,5 x 0,5 x 0,5 cm (comprimento x largura x espessura). A primeira seção foi tratada com água por vinte dias e armazenadas em estufa a 60°C e com o auxílio de um micrótomo, realizou-se cortes longitudinais com 120 μm de largura. A segunda seção foi tratada com etilenodiamina a 10% e armazenadas em estufa a 60°C por 30 dias. Em seguida, realizou-se cortes transversais à mão livre. A diferença no procedimento para a obtenção de ambos os cortes foi necessária devido à dificuldade da

realização dos cortes transversais, pois estes foram realizados contra as fibras.

Os cortes foram tratados por 10 minutos, primeiramente, com o fluorocromo específico para identificar a lignina (Auramina O), e, em seguida, com o calcoflúor white, fluorocromo específico para celulose. Alguns cortes foram submetidos ao tratamento com os fluorocromos por tempos maiores (1,2 e 20 horas) porém não apresentaram variação no resultado da análise.

Em seguida, os cortes foram transferidos para uma lâmina de vidro, cobertos por uma lamínula e analisados com um microscópio confocal de varredura a laser. Utilizou-se as objetivas 40x, e os lasers de excitação de 405 nm e 488 nm. As imagens foram obtidas detectando-se os comprimentos de onda de emissão do calcoflúor a 410-415 nm e da Auramina O a 480-510 nm.

4.5.3.

Síntese e caracterização de NPs-Ag

4.5.3.1.

Montagem do sistema microfluídico

Inicialmente, com o auxílio de uma mini guilhotina portátil, cortou-se três tubos de ETFE com 20 cm de comprimento. Em uma das extremidades de cada tubo adicionou-se uma porca de PEEK com rosca de 6-32, em seguida um anel de aço inoxidável, e por último uma virola de PEEK. Pressionou-se a sequência até que o anel encaixasse perfeitamente na virola e reservou-se um dos tubos. Aos dois tubos restantes, conectou-se na extremidade oposta primeiramente um conector macho de PEEK com rosca 10-32, e logo após, um adaptador de PEEK compatível, sendo estes chamados tubos de entrada de reagente, e o tubo anteriormente reservado, tubo de saída de produto.

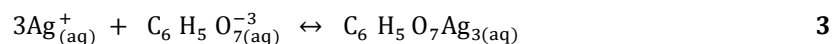
Introduziu-se o microrreator de borosilicato no suporte correspondente, *Micronit* ou *Future Chemistry*. Posicionou-se as porcas

conectadas aos tubos de entrada e saída no suporte de microrreator, em suas devidas posições. Em prosseguimento, conectou-se as seringas na extremidade oposta dos tubos de entrada, e as mesmas foram ajustadas nas bombas-seringa. Com este sistema sintetizou-se as NPs-Ag com citrato trissódico utilizando um microrreator de 0,15 mm de diâmetro interno (Micronit). Para a síntese de NP-Ag com quitosana reproduziu-se a mesma sequência, no entanto, utilizou-se um microrreator 500 µm de diâmetro interno (Future Chemistry).

4.5.3.2.

Síntese de NPs-Ag com ligante citrato trissódico

A presente síntese foi realizada em sistema de fluxo contínuo, em duas etapas. Na primeira etapa, ocorreu a interação entre o íon prata I (Ag^+) e o ligante, formando um complexo de coordenação. Em seguida, o complexo entrou em contato com o agente redutor, o NaBH_4 ; e o íon Ag^+ foi reduzido à prata metálica (Ag^0), originando um agregado metálico nanométrico, coordenado ao ligante (LIMA, 2011). Nesse sentido, o ligante presente ao redor das NPs gera uma superfície eletrostática de acordo com a carga formal do ligante orgânico, criando repulsão entre os *clusters*, impedindo as NPs-Ag de formarem agregados maiores e precipitarem, sendo mantidas em uma dispersão coloidal. As reações podem ser visualizadas nas equações 3 e 4 abaixo:



Inicialmente, introduziu-se em duas seringas de vidro, 4 mL de soluções de AgNO_3 e citrato trissódico, ambas a $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$. As seringas foram posicionadas nas bombas-seringa, e conectadas aos tubos de entrada de reagente. Ao tubo de saída, atrelou-se um frasco contendo 6 mL de solução de NaBH_4 a $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$, em agitação a

1400 rpm e temperatura a 25°C. Ajustou-se as bombas-seringas para fluxar as soluções reagentes a 0,25 mL min⁻¹, e iniciou-se a síntese. O sistema descrito pode ser visualizado na Figura 26. Este procedimento foi realizado mais de 5 vezes, garantindo a reprodutibilidade e confiança da metodologia. Após a síntese, a dispersão coloidal foi estocada em temperatura ambiente (25°C) e baixa luminosidade, sendo posteriormente direcionada para as análises de caracterização.

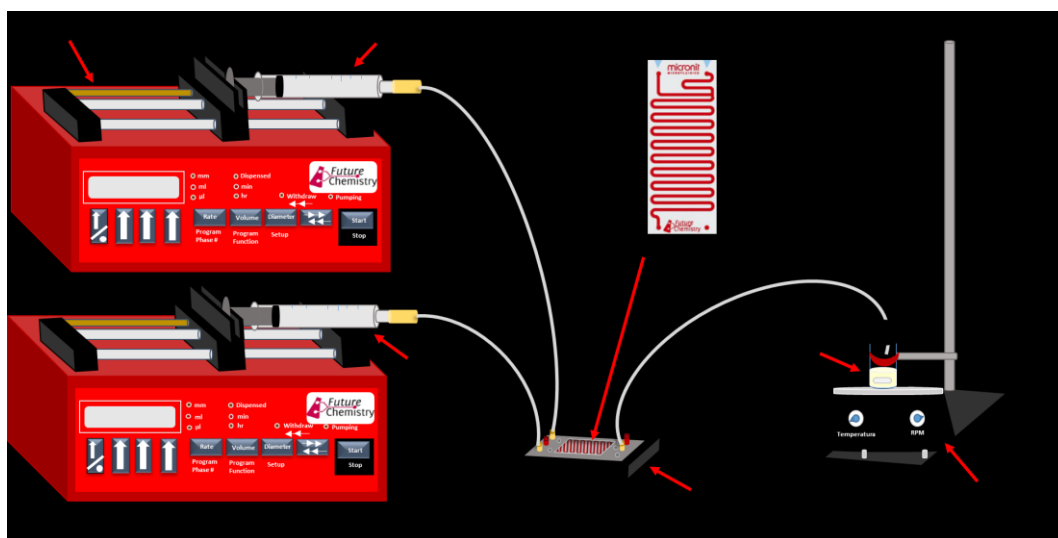


Figura 26. Sistema de síntese de NPs-Ag com citrato trissódico em fluxo contínuo. Imagem: Raquel Martins.

4.5.3.3. Síntese de NPs-Ag com ligante quitosana

O seguinte protocolo refere-se a sínteses de NPs-Ag, aplicando-se o polímero quitosana como ligante. O processo ocorre da mesma forma como relatada no procedimento anterior. No entanto, neste caso há variação de materiais, condições e concentração do ligante.

A princípio, introduziu-se em duas seringas de vidro, 4 mL de soluções de AgNO₃ a 0,01 mol L⁻¹ e quitosana a 10 g L⁻¹, respectivamente. As seringas foram posicionadas nas bombas-seringa, e conectadas aos tubos de entrada. O suporte do microreator utilizado foi o modelo B-246, o qual possui um sistema de aquecimento acoplado, e permite a realização da síntese em temperaturas controladas. Essas

alterações foram necessárias devido à alta viscosidade da solução de quitosana, provocando o aumento da pressão interna, o que comprometeria a eficiência da síntese. Ao tubo de saída, atrelou-se um frasco contendo 6 mL de solução de NaBH_4 a $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$, em agitação a 1400 rpm e temperatura a 25°C . O NaBH_4 é uma substância extremamente sensível à variação de pH, sofrendo decomposição instantânea em sistemas ácidos. Dessa forma, sendo a solução de quitosana preparada em solução de ácido acético e por isso possuindo pH 5, quando entra em contato com a solução de NaBH_4 , propicia a decomposição do mesmo antes do íon Ag^+ ser reduzido, comprometendo toda a síntese. Por isso foi necessário o ajuste de pH da solução de NaBH_4 para pH 9 com solução de NaOH a $1,00 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, ajustou-se as bombas-seringas para fluxar as soluções a $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, a temperatura do suporte do microrreator para 60°C e iniciou-se a síntese. O sistema descrito acima pode ser visualizado na Figura 27. Após a síntese, a dispersão coloidal foi estocada em temperatura ambiente (25°C) e baixa luminosidade, sendo posteriormente direcionada para as análises de caracterização.

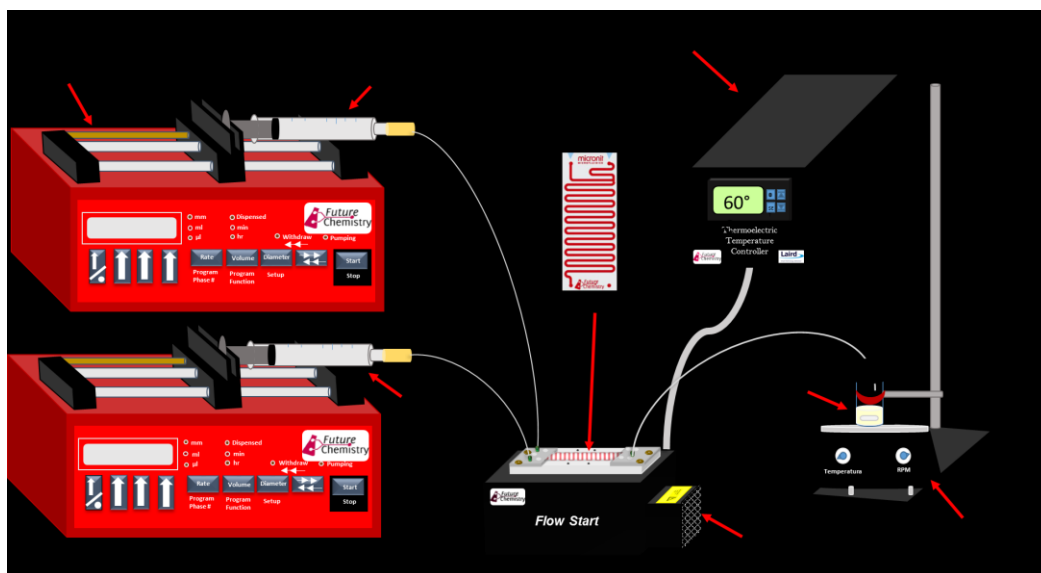


Figura 27. Sistema de síntese de NPs-Ag com quitosana em fluxo contínuo com controle de temperatura. Imagem: Raquel Martins.

4.5.3.4.

Espectrofotometria no UV/Visível das NPs-Ag sintetizadas

Para análise espectrofotométrica, na faixa de varredura de 250 nm a 750 nm, as dispersões coloidais diluídas foram transferidas para cubetas de quartzo. A análise também foi realizada com a NPs-Ag comercial com 20 nm de diâmetro e diluição na proporção de 1:4 (v/v). A formação de NPs promove alterações nos estados eletrônicos dos átomos, alterando assim suas propriedades ópticas. Dessa forma, as NPs-Ag passam a absorver radiação eletromagnética na região do visível, tendo sua presença comprovada pela existência de uma banda de extinção, absorvendo em um comprimento de onda (λ) específico, que representa a banda de ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR – Localized surface plasmon resonance) (HAISS et al., 2007).

Dessa forma, observando-se os $\lambda_{\text{máx}}$ e as bandas de extinção de cada NPs-Ag sintetizada, pôde-se comparar qualitativamente a reprodutibilidade da síntese (FEI et al., 2008).

4.5.3.5.

Potencial zeta (ζ) das NPs-Ag sintetizadas

Esta técnica baseia-se na medição da mobilidade eletroforética de uma determinada dispersão coloidal para determinar a magnitude média da superfície eletrostática das NPs presente em solução. Quanto maior for o seu valor, mais estável será a dispersão, pois significa que as repulsões eletrostáticas entre as NPs estarão fortes. Enquanto, dispersões com valores próximos a zero, tendem a ser instáveis, e ao longo do tempo se desestabilizam com formação de precipitados. Esta propriedade também é empregada para caracterizar a carga e o ponto isoelétrico de diversas moléculas, além de caracterizar grupos funcionais e produtos reacionais (JANG; LEE; HWANG, 2015).

Nesta pesquisa, o valor do potencial zeta nos permitiu ratificar a presença e natureza das cargas das NPs-Ag sintetizadas. As mesmas foram diluídas em proporção de 1:40 (v/v) e transferidas para uma cubeta de potencial zeta e determinar sua mobilidade eletroforética em um

analisador de Potencial zeta. O mesmo foi realizado com a NPs-Ag comercial, porém a diluição foi realizada na proporção 1:4 (v/v).

4.5.3.6.

Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICPOES - *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

Para se obter a concentração de ambas as NPs-Ag sintetizadas e comercial, empregou-se a técnica ICPOES de acordo com o procedimento descrito a seguir. Foram adicionados 0,3 ml de cada uma das dispersões, NPs-Ag-citrato, NPs-Ag-quitosana e NPs-Ag-comercial em tubos falcon de 50 ml. A seguir adicionou-se a cada tubo 0,5 ml de ácido nítrico (HNO_3) ultrapuro e os imergiu em um béquer de 1,0L com água a 100° C. Após 10 min neste sistema de aquecimento, retirou-se os tubos do béquer e os avolumou a 50 ml. Em seguida realizou-se a leitura no equipamento em triplicata. Em paralelo, construiu-se uma curva de calibração com um padrão multielementar contendo a prata. Logo após, aplicou-se os fatores de conversão no equipamento, obtendo-se a concentração de partículas em em ppm (LABORDA et al., 2016; SHANG; GAO, 2014).

4.5.3.7. Microscopia eletrônica de varredura por transmissão das NPs-Ag sintetizadas

Para caracterização morfológica de NPs-Ag, uma gota da solução de cada NPs-Ag sintetizada foi colocada numa grade de transmissão e após a evaporação completa da solução, realizou-se a análise de microscopia eletrônica de varredura por transmissão (MEVT). O microscópio eletrônico foi operado no modo de transmissão a 30 kV com uma distância de trabalho de 6,0 mm. A dispersão coloidal de NPs-Ag com citrato trissódico foi analisada com a mesma concentração obtida na síntese, ou seja, sem a prévia diluição. No entanto, para as NPs-Ag com quitosana devido a interação dos polímeros, foi necessária uma diluição da dispersão coloidal na proporção de 1:40 (v/v). Após a análise, as

imagens MEVT foram avaliadas com o software Image J fornecendo assim a distribuição estatística de tamanhos das NPs-Ag (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014).

4.5.3.8.

Espectroscopia no Infravermelho das NPs-Ag sintetizadas

As dispersões coloidais de NPs-Ag e seus precursores foram liofilizadas. Em seguida, todas as amostras foram analisadas no espectrofotômetro de infravermelho, com varredura de 4000 a 400 cm^{-1} , 16 acumulações e 2 segundos de tempo de exposição. Em sequência, sobrepôs-se os espectros obtidos de cada síntese com seus respectivos precursores, observando-se os possíveis deslocamentos das bandas vibracionais, para então detectar os grupos funcionais envolvidos na formação do complexo Ag^+ -ligante e na interação das NPs-Ag-ligante (KRITHIGA; JAYACHITRA; RAJALAKSHMI, 2013; USMAN et al., 2013).

4.5.4.

Preparo da amostra, impregnação e caracterização do bambu com NPs-Ag

4.5.4.1.

Impregnação do bambu com NPs-Ag

Com o auxílio de uma máquina de corte de preciso, foram obtidas duas amostras de um colmo de bambu nas dimensões, 1,8 x 1,2 x 0,5 cm (comprimento x espessura x largura), conforme a Figura 28.

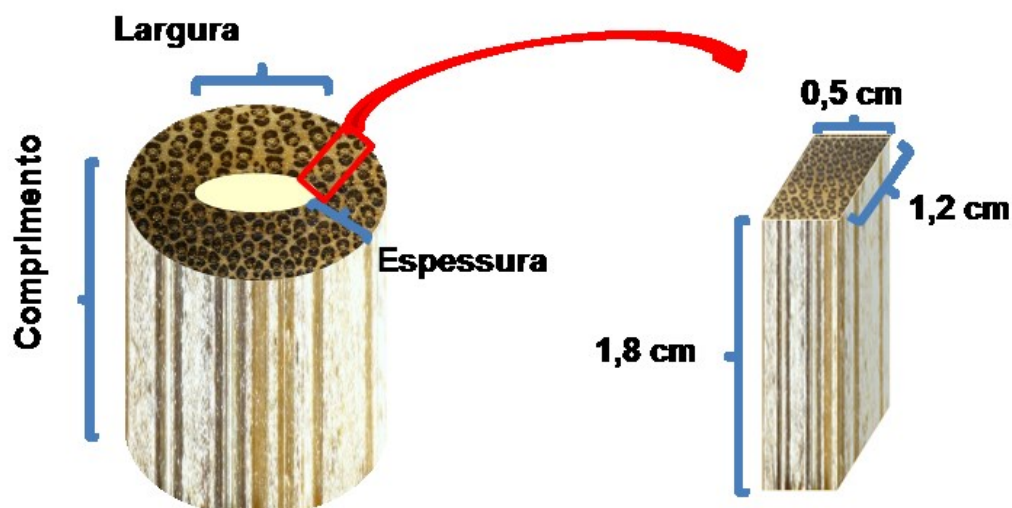


Figura 28. Esquema de corte para a preparação das amostras de Bambu.

Em seguida, cada corte foi colocado em tubos de ensaio contendo as respectivas dispersões coloidais sintetizadas (NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana), de forma que os mesmos permanecessem totalmente imersos. O sistema foi submetido a ciclos de vácuo seguido de estufa a 60°C, utilizando-se em cada ciclo uma nova dispersão coloidal. Este procedimento foi reproduzido por 20 vezes, totalizando 20 ciclos de impregnação, conforme ilustrado na Figura 29 (TIBURTINO et al., 2015b). Após este procedimento foram obtidos dois cortes de bambu impregnados. Em sequência, os mesmos foram analisados por microtomografia computadorizada 3D e por difração de raios-x.

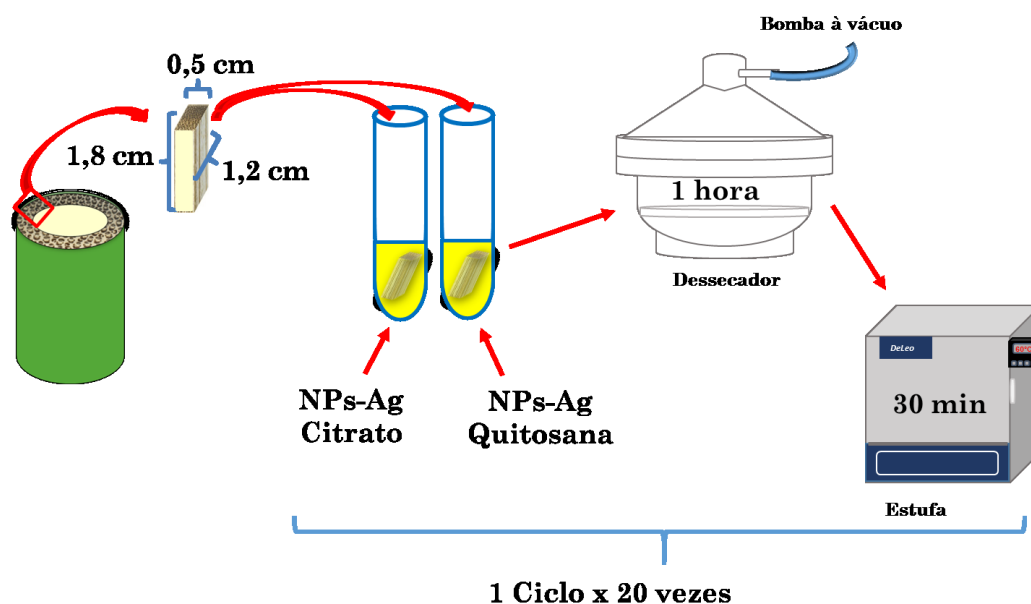


Figura 29. Esquema de impregnação do Bambu: imersão, impregnação e secagem.

4.5.4.2.

Microtomografia computadorizada do bambu impregnado

As amostras de bambu tratadas com NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana foram analisadas no microtomógrafo seguindo os parâmetros ilustrados na tabela 2. A amostra de bambu tratado com a NPs-Ag-quitosana foi analisada no microtomógrafo duas vezes, utilizando-se em cada uma as objetivas 0.4x (NPs-Ag-quitosana-01) e 4x (NPs-Ag-quitosana-02).

Tabela 2. Parâmetros utilizados na análise das seções de bambu sem e com tratamento.

Seção do bambu			
NPs-Ag-citrato		NPs-Ag-quitosana	
		Análise1	Análise 2
Objetiva	4x	4x	0.4x
Pixel (µm)	3,95	4,15	18,75
Voltagem (kV)	80	50	80
Potência (W)	7	4	7
Tempo de exposição (s)	0.2	2	0.2
Número de projeções	1600	1600	1600

Devido a magnificação óptica empregada nas análises das seções do bambu impregnados com NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana (Análise 1) e ao comprimento das mesmas, as análises foram realizadas primeiramente na extremidade do comprimento e em seguida, na parte central, conforme a Figura 30.

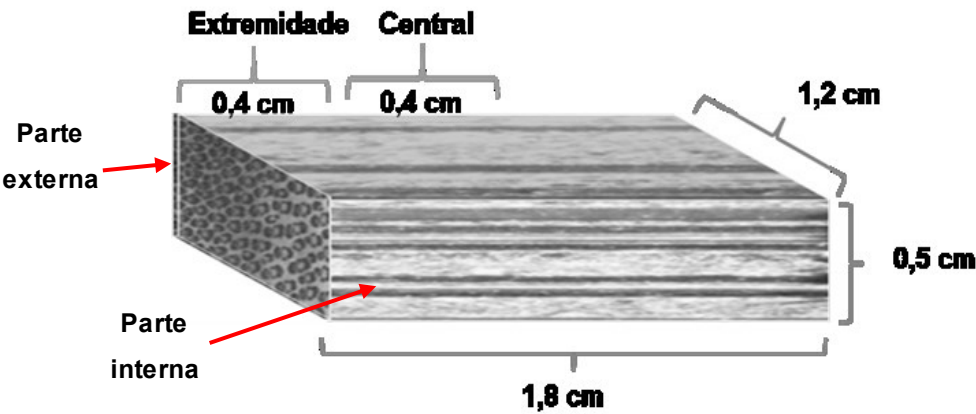


Figura 30. Esquema de análise da μ CT com objetiva de 4x do bambu impregnado com as NPs-Ag-citrato.

As imagens obtidas foram processadas com os softwares Image J e ORS-Visual para obter imagens de alta qualidade e o cálculo do volume de agregados de NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana no interior das amostras impregnadas. Para este cálculo, utilizou-se as imagens tomográficas referente a parte central de ambas as amostras, desconsiderando-se parte do extremo inferior e da borda lateral, conforme ilustrado na Figura 31 (bambu impregnado com NPs-Ag-citrato) e 32 (bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana).

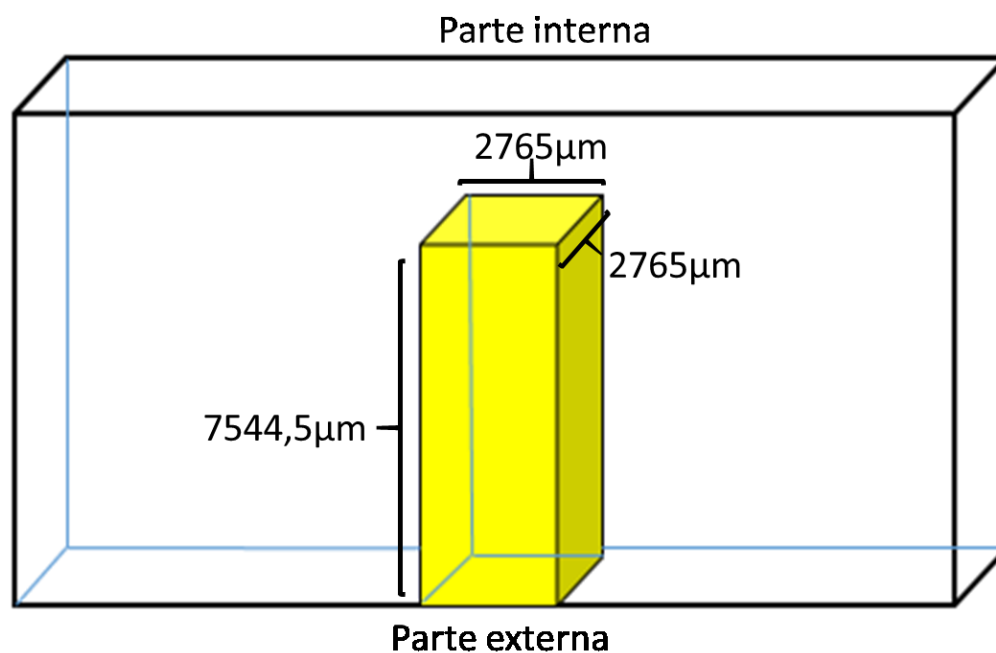


Figura 31. Volume da seção utilizada ($46,9 \mu\text{m}^3$ - amarelo) para o cálculo de volume de agregados no interior da seção impregnada com NPs-Ag-citrato analisada com a objetiva de 4x

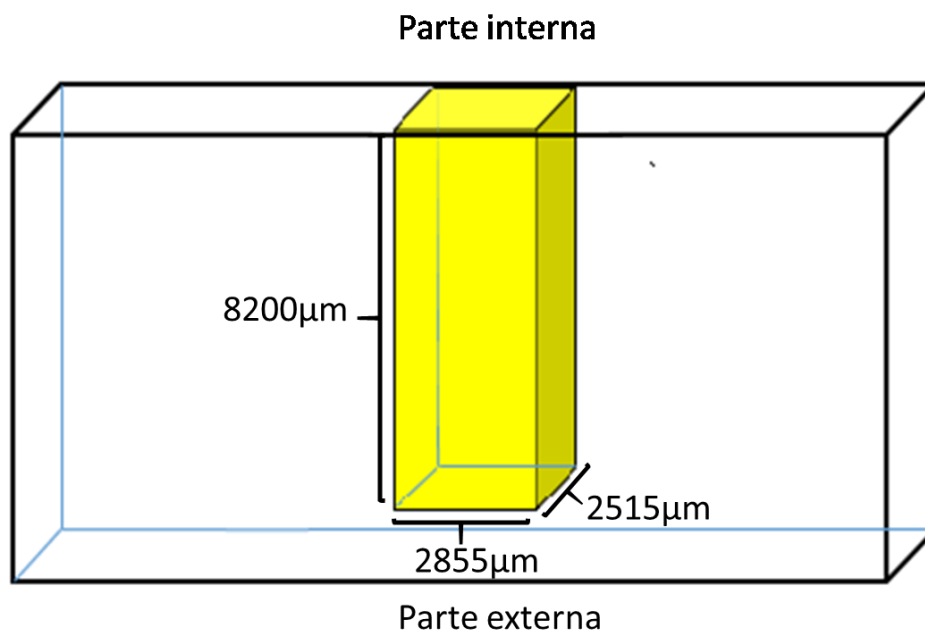


Figura 32. Volume da seção utilizada ($51,67 \mu\text{m}^3$ - amarelo) para o cálculo de volume de agregados no interior da seção impregnada com NPs-Ag-quitosana analisada com uma objetiva de 4x.

A segunda análise da amostra de bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana (análise 2) foi analisada com uma objetiva de 0.4x, lente com menor resolução, permitindo a visualização da seção inteira do bambu impregnado. Da mesma forma, as imagens tomográficas foram processadas, obtendo-se a quantidade de agregados no interior da seção impregnada. Para o cálculo de agregados de NPs-Ag-quitosana no interior da seção impregnada, nas imagens tomográficas referentes a análise 2, foi desconsiderado 1mm dos dois extremos da amostra, conforme ilustrado na Figura 33.

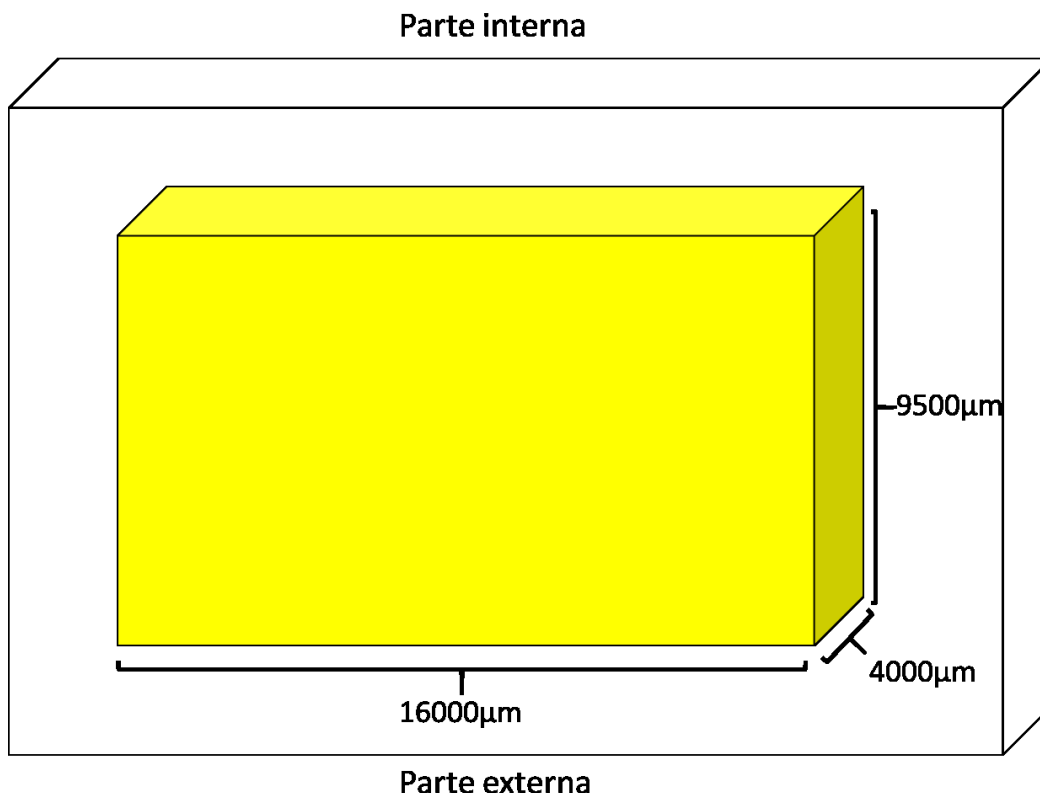


Figura 33. Volume da seção utilizada ($568 \mu\text{m}^3$ - amarelo) para o cálculo de volume de agregados no interior da seção impregnada com NPs-Ag-quitosana analisada com a objetiva de 0.4x.

As partes desconsideradas no processo de quantificação dos agregados foi necessária para que as camadas de agregados externos não influenciassem na quantificação dos agregados no interior das amostras.

4.5.4.3. Difração de raio-X do bambu impregnado

A análise de difração de raios-x foi realizada com duas seções do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana, respectivamente. A princípio, a seção impregnada foi partida na metade de seu comprimento. Uma das metades foi reservada para realização de outras análises e a outra foi analisada longitudinalmente pela difração de raios-x.

Em uma das metades, realizou-se um corte longitudinal da camada superficial com 0,1 cm de largura e analisou-se. Em seguida analisou-se a seção do bambu sem a camada externa, conforme ilustrado na Figura 34.

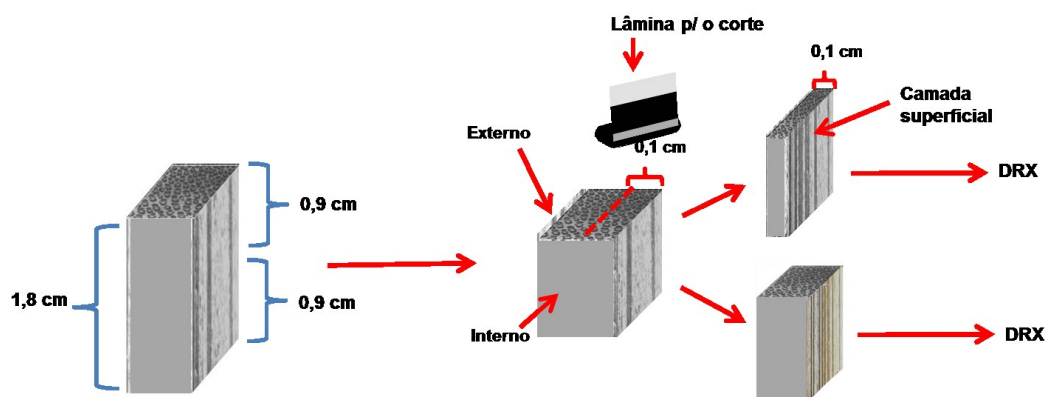


Figura 34. Esquema do corte do bambu impregnado com as NPs-Ag e analisado no DRX.

Cada seção foi analisada em um difratômetro operando com um $\text{CuK}\alpha$ de $\lambda = 1.548 \text{ \AA}$, a 40 kV de voltagem e 40 mA de corrente. A varredura foi de $2\theta = 5^\circ - 90^\circ$, com $0,02^\circ$ por passo e taxa de aquisição de $2^\circ/\text{min}$. Este procedimento foi realizado com as seções do bambu, ambas impregnadas com as NPs-Ag sintetizadas.

Os difratogramas obtidos foram sobrepostos e comparados, verificando-se a possível presença de picos de difração relacionados a celulose cristalina e nanocristalitos de prata reportados na literatura (CORREIA et al., 2015; LI et al., 2016).

4.5.5.

Teste antifúngico qualitativo do bambu impregnado

As seções do bambu sem e com tratamento foram submetidas às condições ambientes por 210 dias, sob temperatura média de 33°C e umidade do ar de 80%. Em seguida, foram avaliadas visualmente quanto à presença de microrganismos.

5. Resultados e Discussões

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussões referentes ao estudo anatômico do bambu *Dendrocalamus giganteus* Wall.ex Munro, à caracterização das NPs-Ag estabilizadas com diferentes ligantes e a impregnação de seções do mesmo com as NPs-Ag sintetizadas.

5.1. Estudo do Bambu *Dendrocalamus giganteus*

5.1.1. Microtomografia Computadorizada

A análise no μ CT forneceu imagens tridimensionais (3D) e bidimensionais (2D) de seções internas do bambu, sendo possível estudar a sua estrutura anatômica através da identificação dos diferentes tecidos presente na matriz vegetal em função da variação de densidade das estruturas identificadas em escala de cinza (COCHARD; DELZON; BADEL, 2015). Na Figura 35 observa-se uma imagem em 3D, na qual é possível identificar os feixes vasculares (A-E) circundados pelo parênquima (E), conforme a morfologia descrita por LIESE, (1985). Nos feixes vasculares verifica-se que os vasos do protoxilema (A), metaxilema (B) e tubo crivado do floema (C) estão escuros, o que de acordo com a técnica, representa regiões onde a radiação incidente não foi atenuada ou

esta atenuação estava abaixo do limite de detecção do equipamento. Esta informação confirma que estes compartimentos são vazios. O feixe de fibras (D) presente ao redor dos vasos do protoxilema, metaxilema e floema, apresenta coloração acinzentada clara, relacionada com a maior atenuação da radiação incidida decorrente da densidade superior presente neste tecido.

O parênquima localizado ao redor dos feixes vasculares e entre os vasos apresenta coloração cinza escuro, revelando que a sua constituição possui densidade inferior à das fibras, ocasionando menos atenuação da radiação.

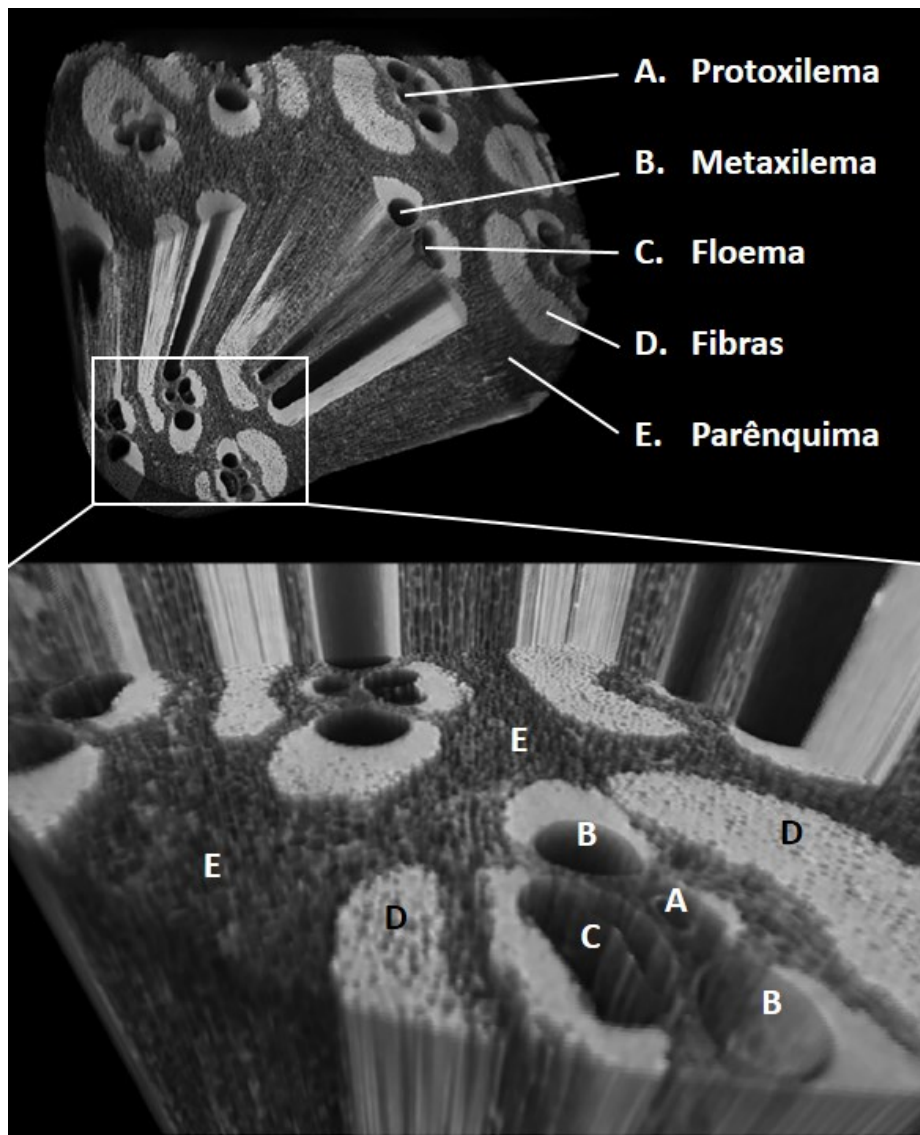


Figura 35. Imagem de μ CT-3D do bambu sem tratamento, seção 5x5x5 mm, ilustrando: A) Protoxilema; B) Metaxilema; C) Floema; D) Fibras; E) Parênquima.

Os resultados obtidos através da μ CT não consideram somente a presença de diferentes constituintes, mas também sua concentração na amostra. Na Figura 36, observa-se células do parênquima com paredes celulares em coloração cinza claro, identificando que os constituintes estão dispostos em concentrações diferentes ao redor das células parenquimáticas.

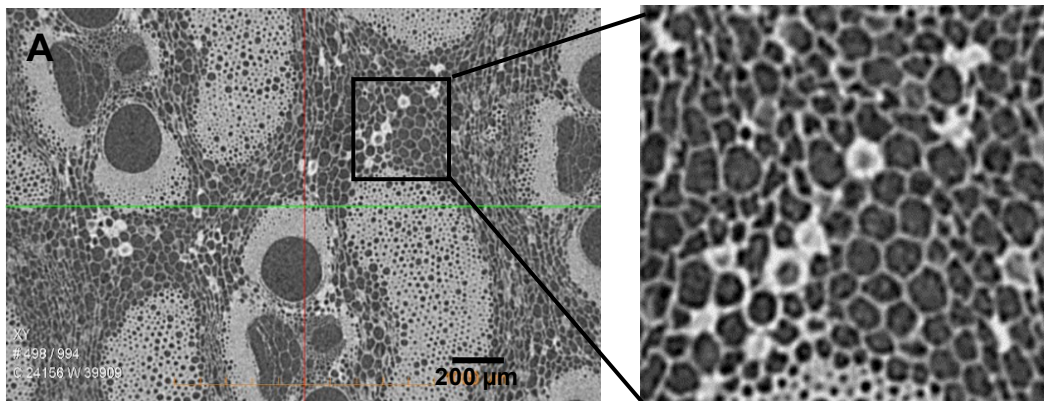


Figura 36. A) Imagem microtomográfica do bambu no plano xy B) Imagem microtomográfica do bambu no plano xy indicando concentração dos constituintes diferenciada em células do parênquima.

Certamente, este é um caso pontual, pois a maioria das demais células apresenta relativa homogeneidade no espessamento de suas paredes celulares. Contudo, é importante ressaltar que o mesmo pode ocorrer com os feixes vasculares, pois a espécie em questão trata-se de uma monocotiledônea, e seu desenvolvimento ocorre de forma difusa e heterogênea (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

5.1.2.

Microscopia eletrônica de varredura - MEV

As imagens MEV apresentadas na Figura 37 ilustram um vaso do metaxilema, na seção longitudinal. As paredes periclinais de duas células justapostas estão posicionadas em ângulos entre 80-90° com relação ao eixo vertical da imagem e a espessura da junção dessas paredes possui em torno de 3,75 μ m de espessura. Além disso, observa-se também na parede interna dos vasos a ocorrência de pontoações, que são os meios de comunicação entre os elementos de vaso e as demais células que o

circuncidam, podendo também apresentar geometria e dimensões diferenciadas dependendo da célula em questão. Logo, estas pontuações estão presentes em todas as células da matriz vegetal, permitindo o transporte de nutrientes em toda a estrutura.

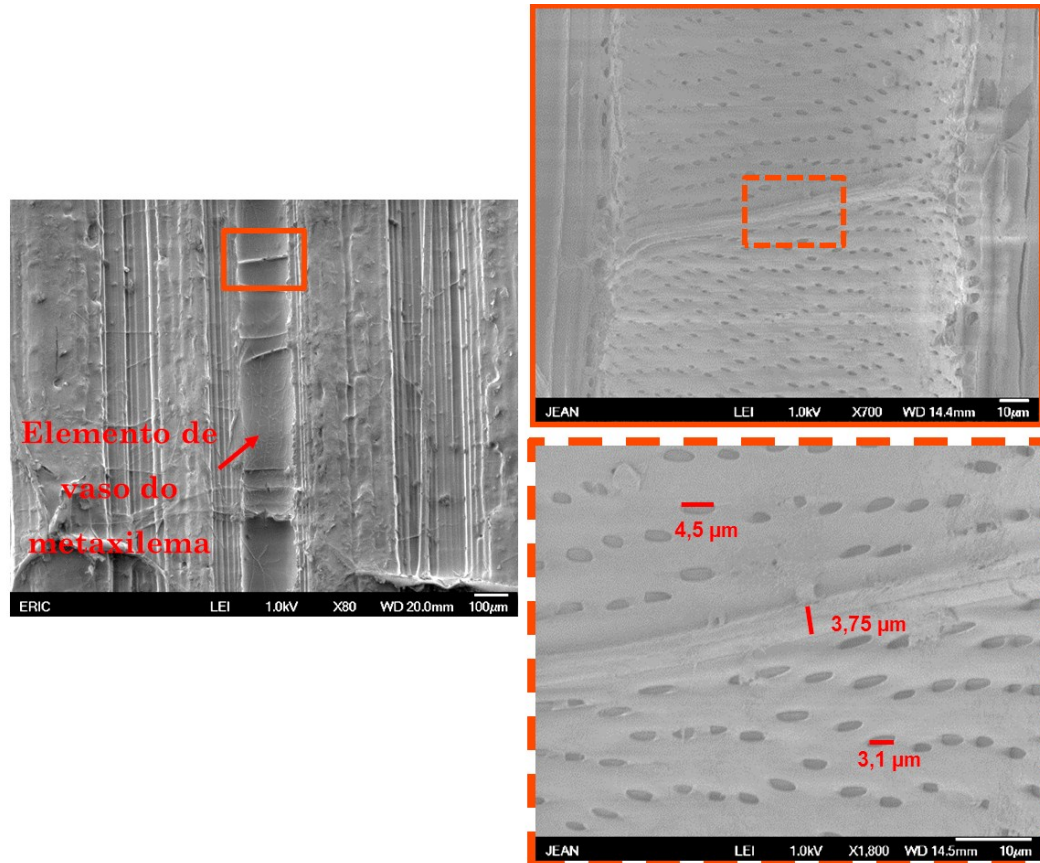


Figura 37. Imagem MEV do elemento de vaso do metaxilema na seção longitudinal. À direita são ilustradas as imagens expandidas das paredes terminas das células no interior do vaso do metaxilema.

5.1.3.

Microscopia Confocal de Varredura a Laser do Bambu

A análise por CLSM foi realizada empregando-se os fluorocromos calcoflúor white e auramina O como auxiliares na detecção da celulose e lignina, respectivamente. A celulose não emite fluorescência, sendo por isso necessário o uso de um fluorocromo específico para ser detectada. O calcoflúor White é comumente utilizado para o estudo de paredes celulares de células vegetais ligando-se seletivamente à celulose e emitindo fluorescência em um comprimento de onda máximo a $\lambda_{\text{emissão}} = 435 \text{ nm}$, quando excitado com uma fonte de luz monocromática em um

comprimento de onda $\lambda_{exc} = 350$ nm. Nas imagens o calcoflúor e consequentemente a celulose são identificados mediante a coloração ciano.

A auramina O é um fluorocromo específico para compostos fenólicos, como a lignina. Possui emissão de fluorescência em $\lambda_{emissão} = 500$ nm, quando excitada com uma fonte de luz monocromática em $\lambda_{exc} = 430$ nm, sendo detectada pela coloração amarela. A lignina é um composto autofluorescente, não sendo necessário o emprego de fluorocromo para ser detectada no CLSM. No entanto, quando analisada concomitantemente com a celulose, sua autofluorescência é mascarada, não sendo detectada. Por isto o emprego da auramina O neste caso foi necessário. Nas imagens a auramina O e consequentemente a lignina são identificadas mediante a coloração amarela. A Figura 38 ilustra as imagens obtidas através do CLSM do feixe vascular, ressaltando as fibras e o parênquima.

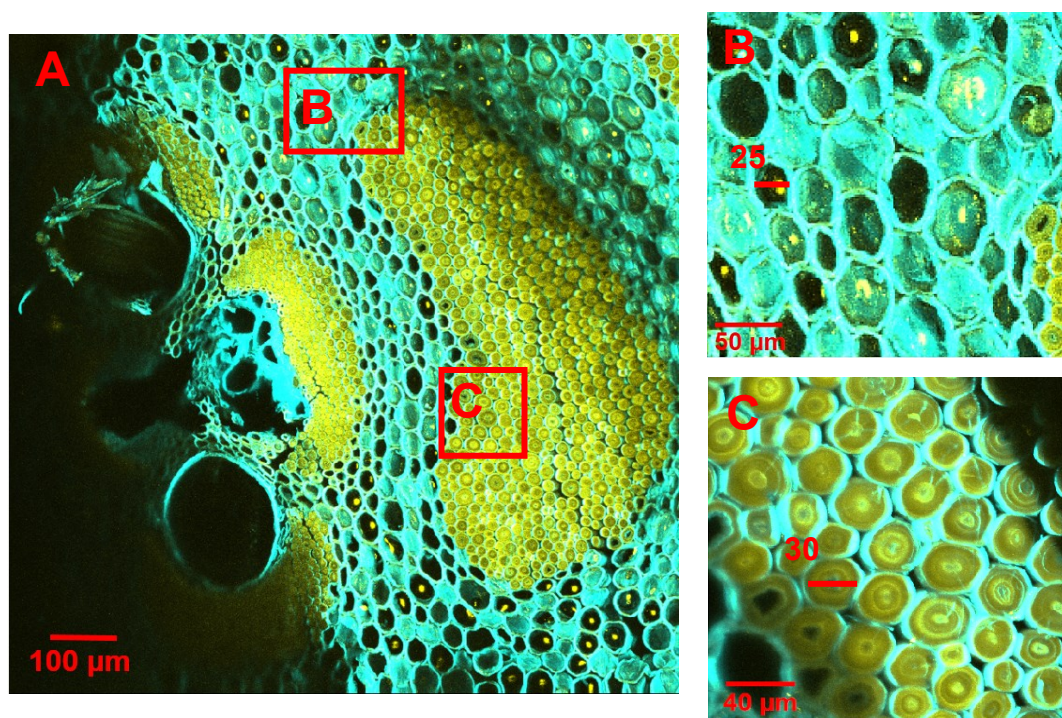


Figura 38. Imagem obtida por CLSM da seção transversal do bambu identificando a celulose (ciano) e lignina (amarelo). A) Feixe vascular; B) Imagem expandida do parênquima; C) Imagem expandida do feixe de fibras.

A parede celular apresenta uma composição complexa pela co-presença dos dois polímeros, gerando uma síntese de cores entre ciano

(celulose) e amarelo (lignina) com uma aparência final de tons de verde claros e escuros. Analisando-se as células do parênquima (Figura 38B), verifica-se a predominância da coloração ciano, indicando a presença preeminente da celulose. Ocorre também a presença da coloração amarela no interior das células, próximo à camada de celulose, mostrando que a lignina está presente, mesmo em quantidades bem pequenas. Considerando-se que as células do parênquima possuem parede celular secundária delgada, cujo percentual de lignina varia entre 15-35%, o resultado obtido é plausível (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014). As células do parênquima possuem geometrias facetadas com dimensões variadas, sendo marcada na imagem uma célula com diâmetro de 25 µm. As fibras (Figura 38C), apresentam a coloração amarela/verde em praticamente todo o feixe, revelando diferentes tonalidades em camadas concêntricas a partir do lume, as quais são referentes à espessura da parede celular secundária lignificada (LIESE, 1985; ROSE, 2003). As mesmas possuem geometrias cilíndricas com diâmetros variados, sendo assinalada na imagem uma fibra com 30 µm de diâmetro.

De acordo com GRITSCH; MURPHY (2005) a deposição da parede secundária nas células do parênquima e fibras ocorrem em estágios diferentes. Em estudos com o bambu *Dendrocalamus asper*, os autores verificaram que no estágio 3, começou a ocorrer a deposição da parede secundária nas fibras, enquanto que nas células do parênquima, havia somente a parede primária. No estágio 4, o último, iniciou o processo de deposição da parede secundária nas células do parênquima, ocorrendo também nova deposição nas fibras e formando as camadas concêntricas. Isto explica os resultados visualizados na Figura 38.

Jl et al. (2013) estudando células vegetais de *Pinus yunnanensis*, também conseguiram detectar as camadas de parede celular secundária através da intensidade e tonalidade de amarelo/verde revelada pela autofluorescência da lignina.

Na Figura 39 A, é ilustrada uma área da interface entre as células do parênquima e as fibras do esclerênquima. Nas Figuras 39B e 39C são ilustradas as mesmas imagens, separando-se as cores para a identificação seletiva da celulose (ciano) e lignina (amarelo/verde).

Confrontando-se as Figuras 39B e 39C, é possível confirmar que o parênquima é rico em celulose, enquanto as fibras são ricas prevalentemente em lignina. Consequentemente os dois componentes estão presente em ambos os tecidos, mas em concentrações diferentes.

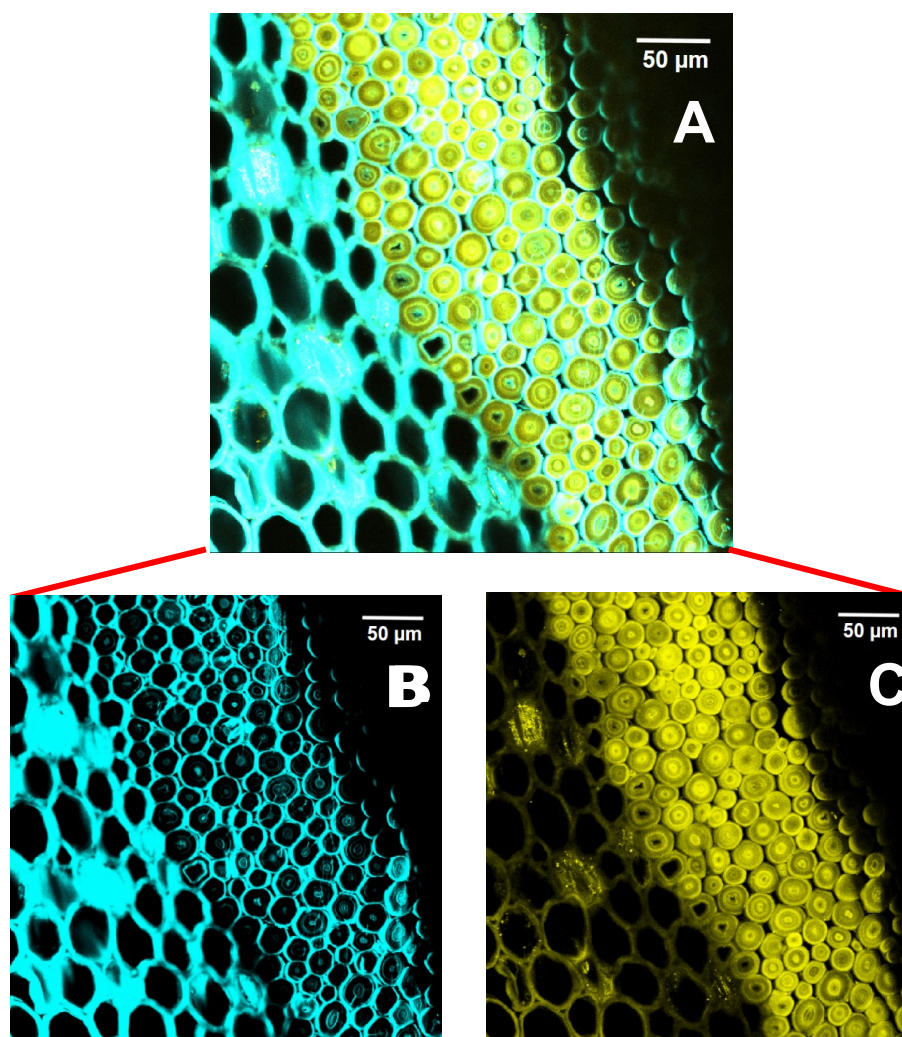


Figura 39. Imagem obtida por CLSM da seção transversal do bambu ilustrando o parênquima e fibras do esclerênquima. A) Identificação da celulose (ciano) e lignina (amarelo/verde); B) Identificação da celulose; C) Identificação da lignina.

A Figura 40A-B, ilustra a seção longitudinal do parênquima e das fibras, caracterizando somente a celulose. Na Figura 40A, observa-se células do parênquima em geometrias quadradas e retangulares com 21 µm de largura. Esta variação na geometria das células pode estar relacionada com o processo de divisão celular, originando células com

diferentes comprimentos. A parede celular apresenta diversas pontoações com dimensões na faixa de 500-900 nm, sendo realçada pontoações com diâmetros de 530 nm, 571 nm e 670 nm.

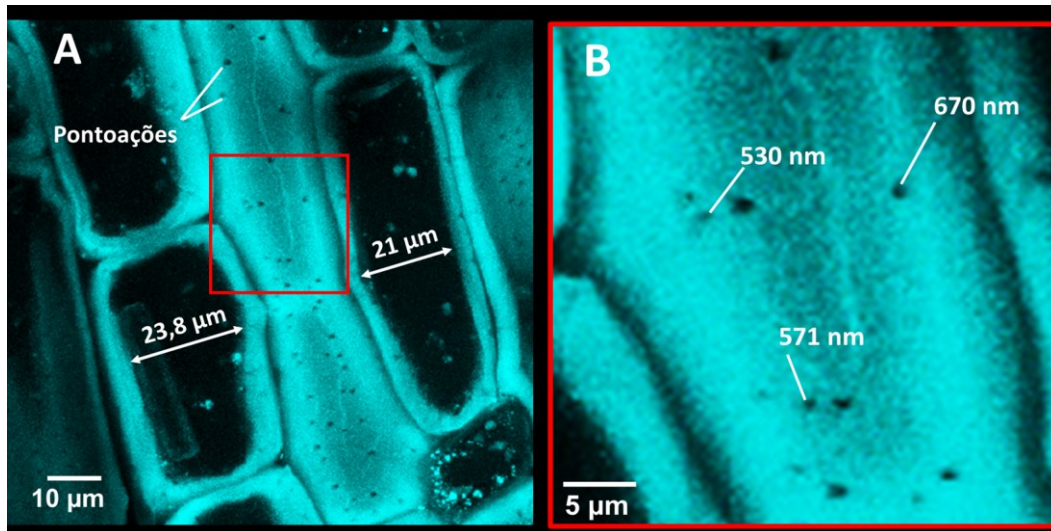


Figura 40. Imagem obtida por CLSM da seção longitudinal do bambu com identificação somente da celulose (ciano), ilustrando as pontoações e diâmetros. A) Células do parênquima; B) Célula do parênquima ampliada.

Na Figura 41, observa-se que as fibras apresentam pontoações com dimensões heterogêneas, com diâmetros na faixa de 1-2 µm, sendo assinalada uma pontoação com diâmetro de 1,69 µm e o lúmen, localizado no centro da fibra com diâmetro de 1,83 µm. Comparando-se os resultados, verifica-se que as pontoações presentes nas paredes celulares do parênquima apresentam diâmetros menores do que o diâmetro das pontoações presentes nas fibras.

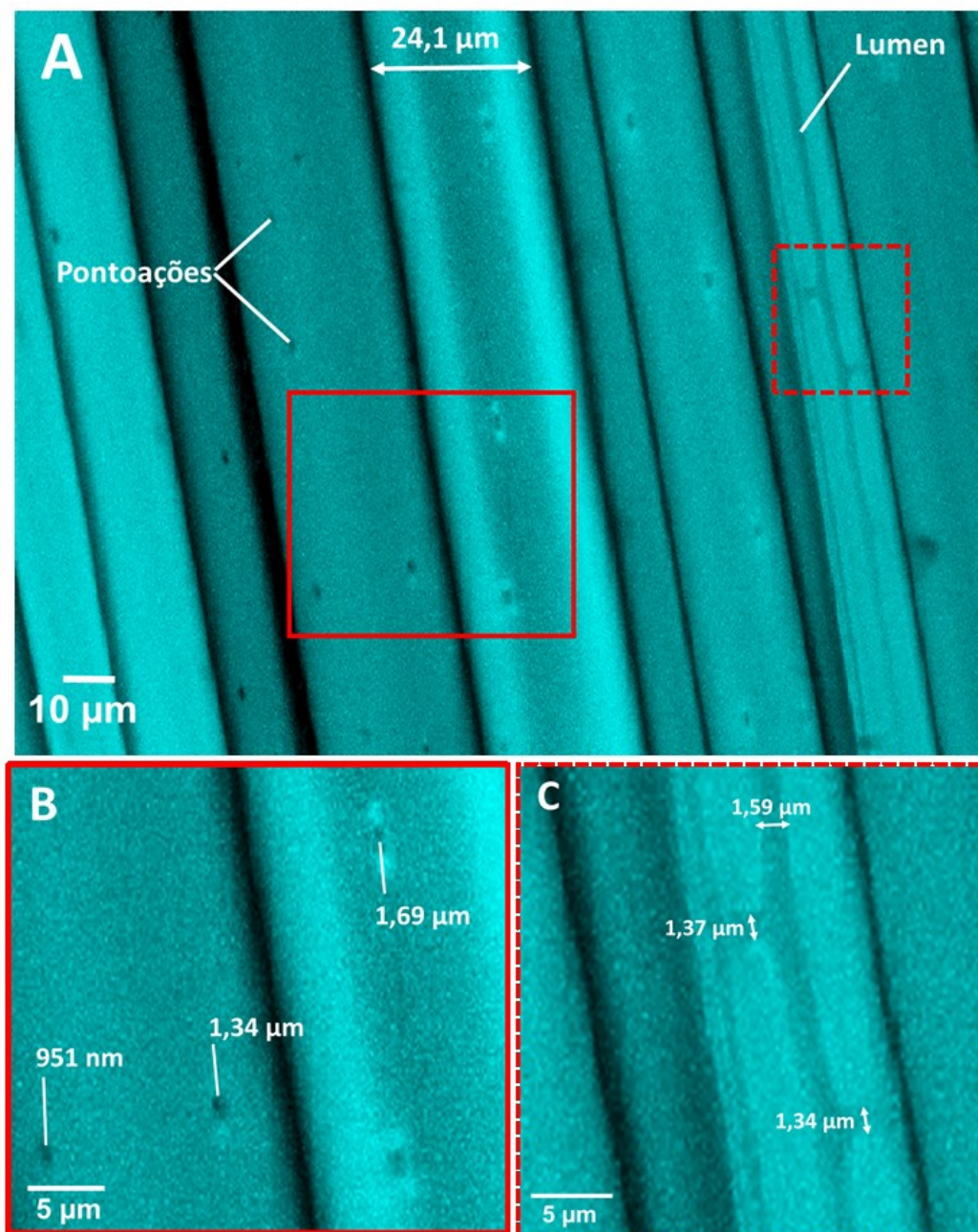


Figura 41. Imagem obtida por CLSM da seção longitudinal do bambu com identificação somente da celulose (ciano), ilustrando as pontoações e diâmetros das fibras. A) Fibras; B) Fibra ampliada; C) lúmen.

Na Figura 42 (A-C), referente à imagem da seção longitudinal do elemento de vaso do metaxilema, pode-se visualizar a coloração amarela/ciano, sugerindo a coexistência da lignina e celulose, que está relacionada com a parede celular secundária lignificada presente no revestimento destes elementos, conforme descritos na literatura (ROSE, 2003). Além disso, verifica-se que as pontoações apresentam geometrias

areoladas com diâmetros entre 4,05 μm e 4,22 μm , circundadas pela presença acentuada de celulose.

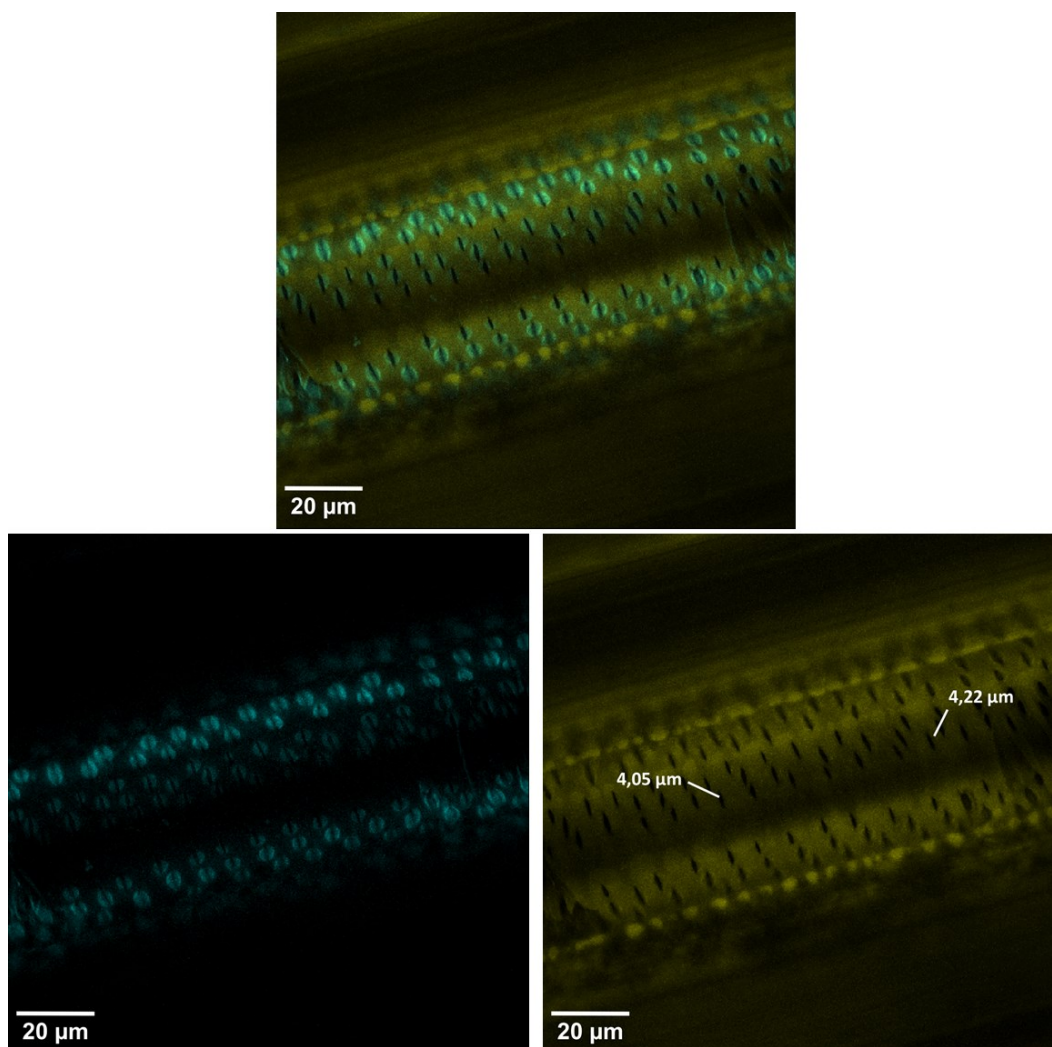


Figura 42. Imagem obtida por CLSM da seção longitudinal do bambu ilustrando o elemento de vaso do metaxilema revestido com uma parede celular secundária lignificada. A) Identificação da celulose (ciano) e lignina (amarelo) B) Identificação da celulose C) Identificação da lignina.

5.2. Caracterização das NPs-Ag

5.2.1. Espectroscopia no UV-Visível, potencial zeta e concentração das nanopartículas de prata (NPs-Ag)

De acordo com a teoria de Mie (MIE, 1908; WRIEDT, 2012) o espectro de extinção de uma dispersão coloidal de partículas esféricas é o conjunto dos fenômenos de absorção e espalhamento da radiação eletromagnética pelas partículas. Os elétrons livres presentes na superfície metálica comportam-se como plasmons superficiais, que oscilam com frequências específicas em função do tamanho das partículas (Figura 43).

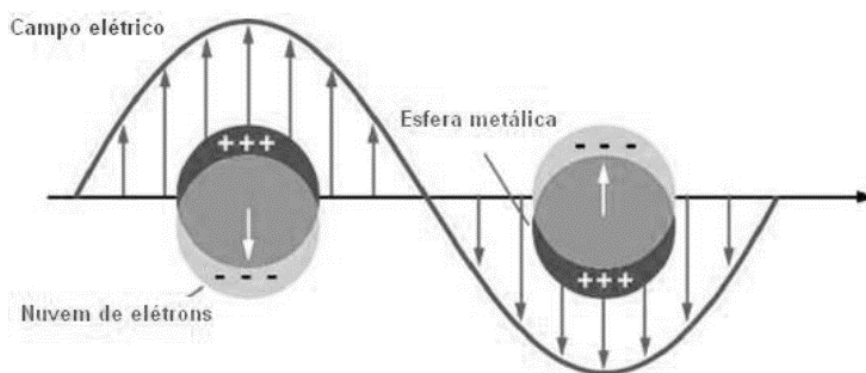


Figura 43. Imagem ilustrativa do fenômeno LSPR (*Localized surface plasmon resonance*). Adaptado de ROMANI (2011).

Quando uma radiação eletromagnética do espectro visível (360-800nm) incide sobre uma partícula com tamanho menor que o comprimento de onda da luz incidente, esta radiação entra em ressonância com os modos oscilatórios dos plasmons superficiais, observando-se o fenômeno de ressonância localizado de plasmons de superfície (LSPR - *Localized Surface Plasmon Resonance*) (DESAI et al., 2012).

Banda de extinção LSPR com elevado comprimento de onda (λ) no intervalo espectral na região do visível está diretamente relacionada com

partículas de maiores diâmetros, em contrapartida, uma banda de extinção com baixo comprimento de onda (λ) está relacionada à partículas com diâmetros menores (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014)

A técnica de espectroscopia UV-Visível, conforme ilustrado na Figura 44, foi utilizada para analisar os espectros de extinção das dispersões coloidais de NPs-Ag-comercial, NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana, apresentando comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) em 398,1 nm, 394,1 nm e 402,2 nm respectivamente. As dispersões coloidais sintetizadas apresentaram coloração amarela transparentes, indicando a formação de partículas de prata em escala nanométrica.

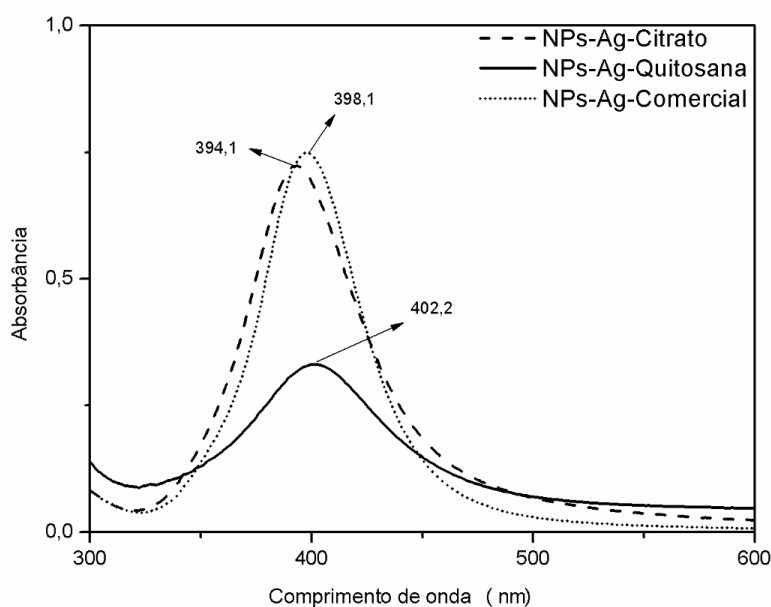


Figura 44. Espectro de extinção na região UV-Visível das NPs-Ag-citrato, NPs-Ag-quitosana e NPs-Ag comercial revestida com citrato trissódico.

Comparando-se os $\lambda_{\text{máx}}$ e a intensidade de absorvância das NPs-Ag-citrato com as NPs-Ag-Comercial, que também são estabilizadas com citrato trissódico, verifica-se uma variação de 4 nm e 0,02 unidades de absorvância, indicando relativa proximidade de tamanho e concentração de NPs-Ag. Valores próximos a estes também foram encontrados por ANTUNES et al. (2013), ao sintetizarem NPs-Ag estabilizadas com citrato trissódico em um estudo de avaliação das propriedades antifúngicas de NPs-Ag.

A banda de extinção referente às NPs-Ag-quitosana apresentaram $\lambda_{\text{máx}}$ superior e intensidade de absorbância inferior em relação às NPs-Ag-Comercial e NPs-Ag-citrato. Neste caso, os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e de intensidade da absorbância não podem ser utilizados para comparar os tamanhos de partículas entre as dispersões analisadas, pois foram empregados agentes estabilizantes com mecanismos de complexação diferentes.

De acordo com o estudo de WANG et al. (2015), a quitosana é um polímero formado por unidades de 2-amino-2-desoxi-*D*-glicopirranose e 2-acetamido-2-desoxi-*D*-glicopirranose, que possui uma conformação globular e forma complexos encapsulando as partículas metálicas. Consequentemente, o meio dispersante das NPs-Ag passa a ser o polímero de quitosana, e a sua constante dielétrica deve ser considerada na avaliação do tamanho da partícula, pois a aplicação de dispersantes com constantes dielétricas diferentes provoca uma interação diferenciada das NPs-Ag com a radiação, promovendo o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ e variação na intensidade da banda de extinção (GHOSH; PAL, 2007).

A variação de intensidade de absorbância observada na Figura 35 também pode ser justificada considerando-se que o encapsulamento dos íons Ag^+ na fase de complexação com a quitosana pode ter influenciado o desempenho do agente redutor, borohidreto de sódio (NaBH_4). Quando o NaBH_4 , entra em contato com o complexo Ag^+ -quitosana, este se depara com dois desafios: o pH da solução do complexo e a matriz polimérica de quitosana que protege a prata iônica complexada. O NaBH_4 é um potente agente redutor que atua preferencialmente em pH acima de 7, porém em pH ácido, o mesmo reage rapidamente, sofrendo decomposição instantânea. Considerando que a solução aquosa do complexo Ag^+ -quitosana possui pH entre 4-5, parte do NaBH_4 pode ser decomposto e a redução dos íons Ag^+ não ser completa, produzindo menos NPs-Ag no meio aquoso. Adicionalmente, o fato da quitosana estar envolvendo os íons metálicos também pode dificultar o processo de redução, pois esta dificulta o acesso do NaBH_4 aos íons Ag^+ que estão no interior da esfera polimérica.

Na síntese de NPs-Ag-citrato, a solução aquosa do complexo Ag-citrato possui pH entre 6-7, bem próximo ao pH de atuação do NaBH_4 . Além disso, o íon citrato, mesmo sendo um ligante tridentado, possui menor comprimento de cadeia, não sendo possível envolver toda a superfície metálica, o que facilita o contato entre o agente redutor e o íon metálico.

A análise do potencial zeta das dispersões revelou que as NPs-Ag-citrato e as NPs-Ag-comercial apresentaram carga superficial negativa, com valor igual a -75,0 mV e -70,6 mV respectivamente, proveniente da coordenação com os íons citrato (Figura 45). Isto indica a relativa estabilidade das mesmas, devido à forte repulsão eletrostática, impedindo a aglomeração das NPs-Ag em solução. Enquanto que as NPs-Ag-quitosana apresentou um valor de potencial zeta positivo, com valor igual a +65,3 mV, atribuído pela presença de cargas positivas em sua superfície, oriundas dos grupos amino protonados presentes na cadeia polimérica de quitosana.

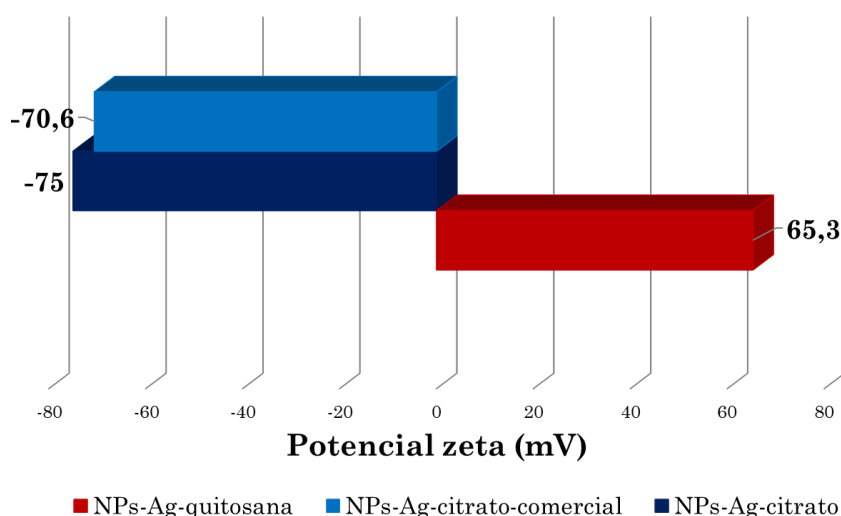


Figura 45. Representação gráfica dos valores de potencial zeta para as NPs-Ag-citrato (-75,0 mV), NPs-Ag-comercial (-70,6 mV) e NPs-Ag-quitosana (+65,3 mV).

A concentração das dispersões sintetizadas e comercial podem ser visualizadas na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3- Valores da concentração de NPs-Ag nas dispersões sintetizadas e comercial obtidos por ICPOES.

NPs-Ag			
	<i>NPs-Ag-citrato</i>	<i>NPs-Ag-quitosana</i>	<i>NPs-Ag-comercial</i>
Concentração (mg L ⁻¹)	229,02	230,00	16,66

5.2.2.

Microscopia eletrônica de varredura por transmissão (MEVT) das Nanopartículas de Prata

Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura por transmissão (MEVT, ou STEM, do inglês, *scanning transmission electron microscope*) obteve-se imagens das NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana com as quais foi possível elaborar a distribuição estatística de diâmetro das NPs sintetizadas. Na figura 46A, observa-se a imagem MEVT referente às NPs-Ag-citrato, apresentando geometria esférica e relativa proximidade. O histograma na figura 46B refere-se à distribuição de diâmetro das NPs-Ag-citrato, apresentando valor médio de $14,3 \pm 3,6$ nm.

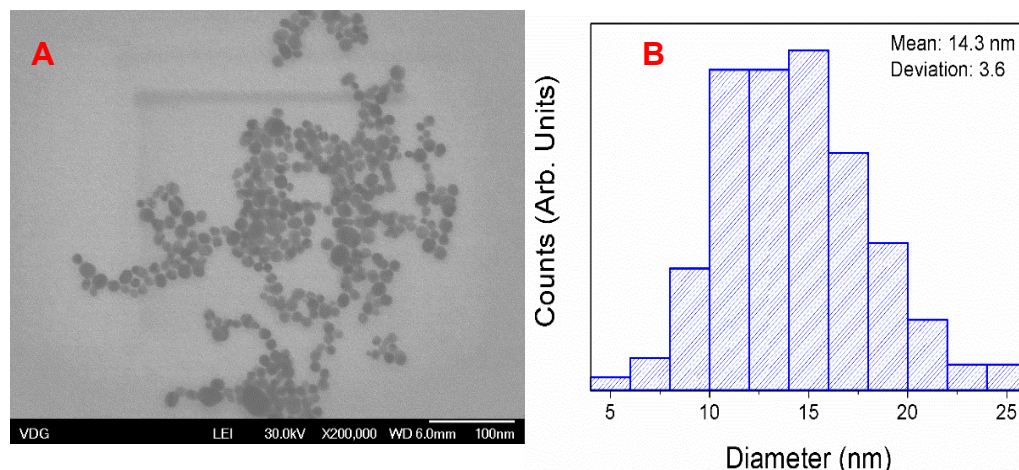


Figura 46. A) Imagem MEVT das NPs-Ag-citrato; B) Histograma de distribuição do diâmetro das NPs-Ag-citrato.

Na Figura 47, observa-se as imagens MEVT das NPs-Ag-quitosana em duas diferentes posições da amostra em exame. Na imagem 47A, as nanopartículas encontram-se dispersas e separadas uma das outras, enquanto que na imagem 47B, as mesmas, se apresentam aglomeradas, mantendo-se próximas umas das outras, provavelmente devido ao processo de evaporação do solvente aquoso durante a preparação da amostra MEVT. Através do processamento da imagem 47 A, foi possível obter um histograma referente a distribuição estatística dos diâmetros das NPs-Ag-quitosana, ilustrado na imagem 47C, apresentando um diâmetro médio de $4 \pm 1,2$ nm, sendo menor que as NPs-Ag-citrato.

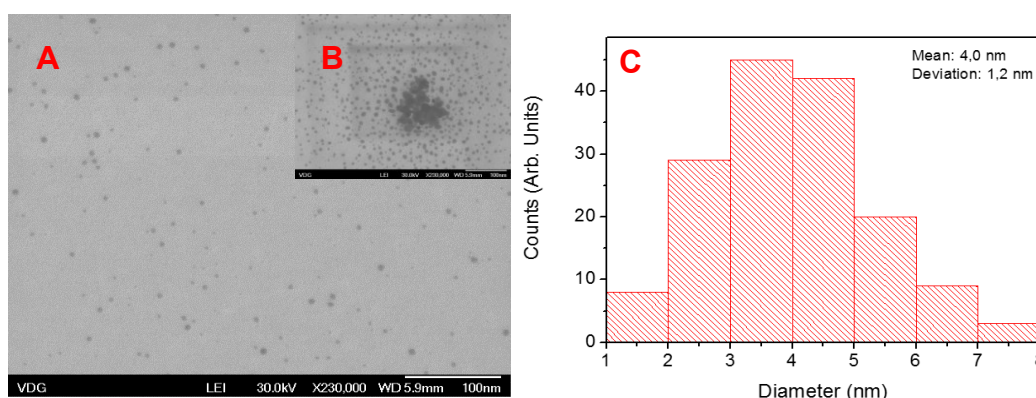


Figura 47. A-B) Imagem MEVT das NPs-Ag-quitosana dispersas e aglomerada; C) Histograma de distribuição de diâmetro das NPs-Ag-quitosana obtido pelo processamento da imagem 47A.

5.2.3.

Espectroscopia no Infravermelho (IV) das Nanopartículas de Prata

Com auxílio da técnica de espectroscopia infravermelho obteve-se os espectros vibracionais dos seguintes compostos: ligante orgânico puro, complexo ligante orgânico- Ag^+ , e sistema ligante-NPs.

Na Figura 48 são apresentados os espectros FT-IR do citrato trissódico, do complexo- Ag^+ -citrato e NPs-Ag-citrato, respectivamente, no estado sólido e liofilizados. Estes foram sobrepostos, identificando-se as bandas referentes à vibração das ligações O-H, C=O e C-O.

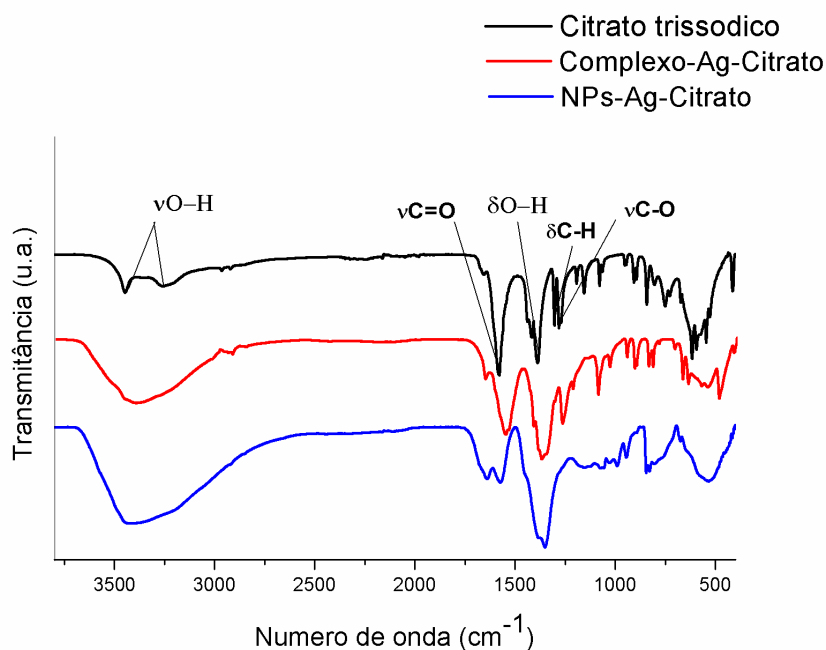


Figura 48. Espectros FT-IR do citrato trissódico (preto), complexo- Ag^+ -citrato (vermelho) e NPs-Ag-citrato (azul) ilustrando as bandas vibracionais que apresentaram um deslocamento significativo pela caracterização da formação do complexo de coordenação.

O estiramento da ligação O-H no citrato trissódico sólido, apresenta-se com duas bandas, uma em 3445 cm^{-1} aguda e fraca correspondente ao OH livre, e uma banda larga e fraca entre 3300 e 3100 cm^{-1} no caso do O-H associado. No entanto, quando visualizamos a mesma banda nos espectros do complexo- Ag^+ -citrato e NPs-Ag-citrato,

verificamos que a mesma se apresenta de forma larga e média entre 3600 e 3000 cm^{-1} . Isto pode ser decorrente da diferença dos processos de preparação da amostra que antecederam a análise, pois o citrato trissódico foi analisado em sua forma sólida, enquanto o complexo- Ag^+ -citrato e NPs-Ag-citrato, foram previamente congelados e liofilizados, restando ainda quantidades residuais de água na amostra.

Tabela 4. Bandas vibracionais relativas as principais ligações presente no citrato trissódico e seus deslocamentos do complexo- Ag^+ -citrato e NPs-Ag-citrato (PAVIA et al., 2010).

Ligações	Banda vibracionais: Número de onda (intensidade, forma)		
	<i>citrato trissódico</i>	<i>Complexo-Ag^+-citrato</i>	<i>NPs-Ag-citrato</i>
O-H	$\nu=3445 \text{ cm}^{-1}$, (f,a)	$\nu=3600\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$, (m,l) $\delta=1375 \text{ cm}^{-1}$, (m,a)	$\nu=3600\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$, (m,l) $\delta=1350 \text{ cm}^{-1}$, (m,a)
	$\nu=3300\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$		
	$\delta=1387 \text{ cm}^{-1}$, (m,a)		
C=O	$\nu_{\text{sim}}=1581 \text{ cm}^{-1}$, (F, a)	$\nu_{\text{sim}}=1554 \text{ cm}^{-1}$, (F,a)	$\nu_{\text{sim}}=1570 \text{ cm}^{-1}$, (m, a)
	$\nu_{\text{ass}}=1659 \text{ cm}^{-1}$, (f, a)	$\nu_{\text{ass}}=1655 \text{ cm}^{-1}$, (f, a)	$\nu_{\text{ass}}=1639 \text{ cm}^{-1}$, (m,a)
C-O	$\nu=1270 \text{ cm}^{-1}$, (f, a)	$\nu=1270 \text{ cm}^{-1}$, (m, L)	$\nu=1153 \text{ cm}^{-1}$, (m,L)
C-H	$\nu=2995\text{-}2985 \text{ cm}^{-1}$, (f,a)	$\nu=2995\text{-}2985 \text{ cm}^{-1}$, (f,a)	$\nu=\text{não é visualizada}$
	$\delta=1373 \text{ cm}^{-1}$, (f,a)	$\delta=1373 \text{ cm}^{-1}$, (f,a)	$\delta=1373 \text{ cm}^{-1}$, (f,a)

δ =deformação angular, ν =estiramento; Forte=F, média=m, franca=f, Larga=L; aguda=a

Na Figura 49, observa-se os espectros expandidos, onde é possível avaliar no espectro do citrato trissódico as bandas referentes à deformação angular da ligação O-H, posicionada em 1387 cm^{-1} e ao estiramento das ligações C=O e C-O, posicionadas em 1581 cm^{-1} e 1270 cm^{-1} , respectivamente. A banda de deformação angular do O-H apresenta deslocamento de 12 cm^{-1} , de 1387 cm^{-1} a 1375 cm^{-1} no complexo- Ag^+ -

citrato. No caso da NPs-Ag-citrato a deformação angular do O-H se deslocou em 37 cm^{-1} , se posicionando em 1350 cm^{-1} .

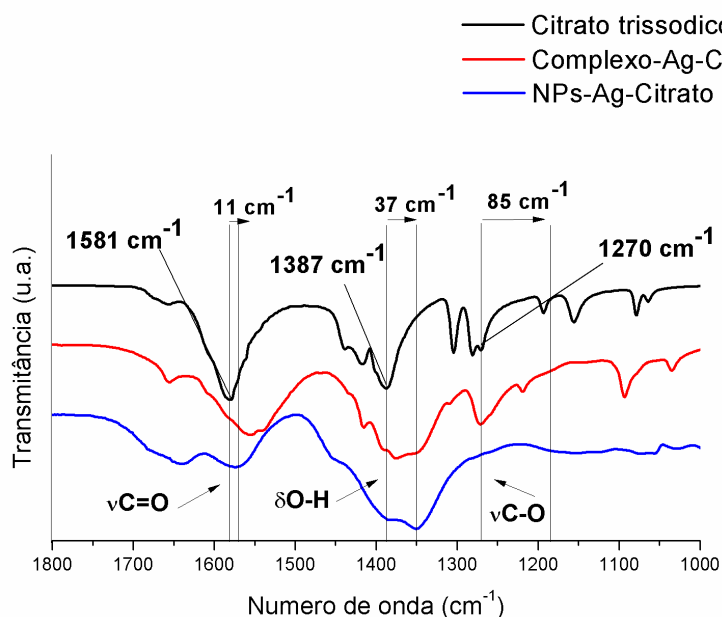


Figura 49. Espectro FTIR expandido do citrato trissódico, Complexo-Ag-citrato e NPs-Ag-citrato ilustrando as bandas que apresentaram deslocamento e caracterizam a formação do complexo de coordenação.

A banda de vibração C=O geralmente se apresenta em dupletos relacionado aos modos de vibração simétrico e assimétrico, ocorrendo na faixa espectral de 1710 cm^{-1} a 1680 cm^{-1} , porém se houver a possibilidade de realizar conjugação, sua absorção passa a ocorrer em frequências mais baixas (PAVIA et al., 2010). No espectro do complexo- Ag^+ -citrato, observa-se um deslocamento de 27 cm^{-1} da banda da vibração simétrica C=O de 1581 cm^{-1} a 1554 cm^{-1} , enquanto que no espectro da NPs-Ag-citrato, a banda se posiciona em 1570 cm^{-1} , porém com menor intensidade.

Todavia, ao analisar-se o comportamento da banda de estiramento C-O, observa-se que no espectro do complexo- Ag^+ -citrato, o modo vibracional permanece em 1270 cm^{-1} , mas no espectro da NPs-Ag-citrato, a banda se desloca para 1153 cm^{-1} , indicando que a ligação C-O na NPs-Ag-citrato ficou mais fraca. Isto pode ser decorrente do estabelecimento de uma ligação de coordenação entre a prata e o oxigênio da ligação C-

O. Os íons carboxilatos têm a possibilidade de realizar uma deslocalização eletrônica por ressonância dentro do sistema conjugado RCOO^- , tornando as ligações C=O e C-O um híbrido de ressonância. A prata se coordenando aos oxigênios da ligação $^-\delta\text{O}-\text{C}-\text{O}^-\delta$, diminuindo a constante de força da ligação C-O do íon carboxilato. A prata possui número de coordenação igual a dois ($\text{NC}=2$), e por isso pode se ligar com grupos carboxilatos e com a hidroxila criando uma ponte intramolecular. Segue o esquema proposto na Figura 50.

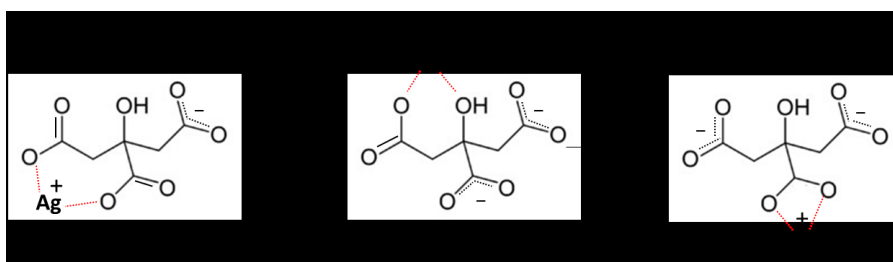


Figura 50. Ilustração da estrutura de coordenação do íon Ag^+ com íon citrato.

Na Figura 51, observa-se os espectros do polímero quitosana, complexo Ag^+ -quitosana e NPs-Ag-quitosana sobrepostos, avaliando-se os deslocamentos das bandas referentes as ligações N-H , O-H , C=O e C-N , todas identificadas no espectro em exame.

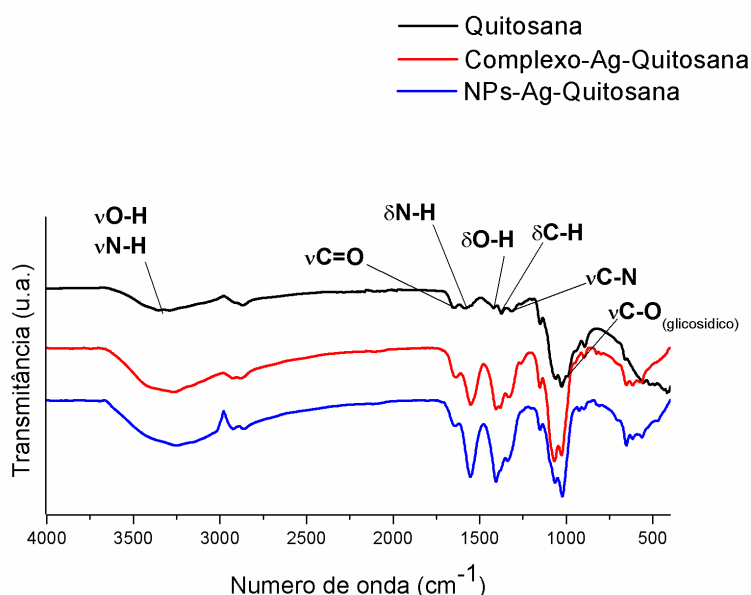


Figura 51. Espectro FTIR da quitosana (preto), Complexo-Ag-quitosana (vermelho) e NPs-Ag-quitosana (azul) ilustrando as bandas que apresentaram deslocamento e caracterizam a formação do complexo de coordenação.

Na tabela 5, pode-se comparar os deslocamentos das bandas vibracionais associados aos estiramentos das ligações N-H, O-H, C=O e C-N e deformações angulares das ligações O-H e N-H nos espectros da quitosana, complexo-Ag⁺-quitosana e NPs-Ag-quitosana.

Tabela 5. Bandas vibracionais relativas às principais ligações presente na quitosana e seus deslocamentos do complexo-Ag⁺-quitosana e NPs-Ag-quitosana.

Ligações	Banda vibracionais: Número de onda (intensidade, forma)		
	<i>quitosana</i>	<i>complexo-Ag⁺-quitosana</i>	<i>NPs-Ag-quitosana</i>
O-H	$\nu=3000-3600 \text{ cm}^{-1}(\text{m},\text{L})$ $\delta=1420 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$	$\nu=3000-3600 \text{ cm}^{-1}(\text{m},\text{L})$ $\delta=1405 \text{ cm}^{-1}(\text{m},\text{a})$	$\nu=3000-3600 \text{ cm}^{-1}(\text{m},\text{L})$ $\delta=1405 \text{ cm}^{-1}(\text{F},\text{a})$
N-H	$\nu=3000-3600 \text{ cm}^{-1}(\text{m},\text{L})$ $\delta=1583 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$	$\nu=3000-3600 \text{ cm}^{-1}(\text{m},\text{L})$ $\delta=1554 \text{ cm}^{-1}(\text{m},\text{a})$	$\nu=3000-3600 \text{ cm}^{-1}(\text{m},\text{L})$ $\delta=1554 \text{ cm}^{-1}(\text{F},\text{a})$
C=O	$\nu=1650 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$	$\nu=1638 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$	$\nu=1643 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$
C-N Aminico	$\nu=1318 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$	$\nu=1330 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$	$\nu=1338 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$
C-O glicosidico	$\nu_{\text{ass}}=1063 \text{ cm}^{-1}(\text{F},\text{a})$ $\nu_{\text{ass}}=1024 \text{ cm}^{-1}(\text{F},\text{a})$	$\nu_{\text{ass}}=1067 \text{ cm}^{-1}(\text{F},\text{a})$ $\nu_{\text{ass}}=1029 \text{ cm}^{-1}(\text{F},\text{a})$	$\nu_{\text{ass}}=1063 \text{ cm}^{-1}(\text{F},\text{a})$ $\nu_{\text{ass}}=1024 \text{ cm}^{-1}(\text{F},\text{a})$
C-H	$\delta=1373 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$	$\delta=1373 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$	$\delta=1373 \text{ cm}^{-1}(\text{f},\text{a})$

δ =deformação angular, ν =estiramento; Forte=F, média=m, franca=f, Larga=L; aguda=a

Conforme ilustrado na Figura 51, os estiramentos das ligações N-H e O-H estão sobrepostos em um intervalo de 3000 e 3600 cm^{-1} , e por isso de difícil interpretação. Avaliando-se a deformação angular das mesmas ligações (Figura 52), na quitosana e no complexo-Ag⁺-quitosana, no intervalo de 1583 a 1405 cm^{-1} , observa-se um deslocamento de 29 cm^{-1} e 15 cm^{-1} respectivamente, indicando a diminuição da frequência de vibração. Isto pode apontar a possível formação de ligações de coordenação entre a prata, oxigênio (O-H) e nitrogênio (N-H). Enquanto

no sistema NPs-Ag-quitosana, estas bandas de vibração permaneceram na mesma posição do complexo-Ag⁺-quitosana

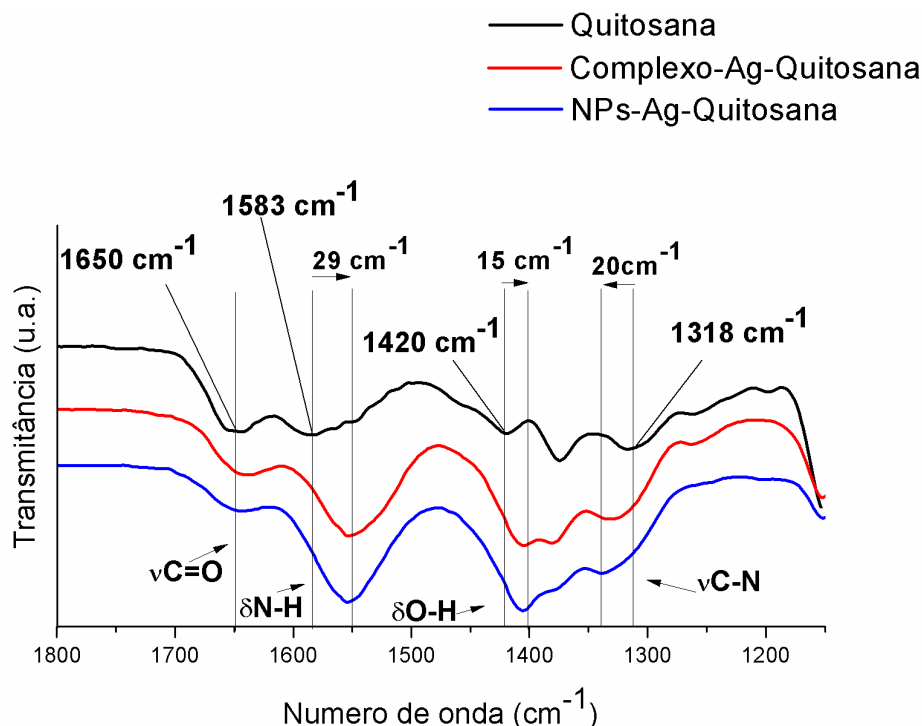


Figura 52. Espectro FTIR da quitosana (preto), Complexo-Ag-quitosana (vermelho) e NPs-Ag-quitosana (azul) ilustrando as bandas que apresentaram deslocamento e caracterizam a formação do complexo de coordenação.

As vibrações de estiramento e dobramento do N-H do grupo amino e do grupo amida coincidem nos mesmos intervalos sendo impossível a identificação da mesma de forma individual. Desta forma a prata pode estar coordenada a qualquer um dos dois grupos. No entanto, se a prata estiver ligada ao nitrogênio do grupo amida, espera-se que a ligação C=O também seja afetada. Observando-se a banda da ligação C=O da quitosana para o complexo-Ag⁺-quitosana, verifica-se que a mesma se deslocou de 1650 para 1638 cm⁻¹, enquanto que no espectro NPs-Ag-quitosana a banda ficou posicionada em 1643 cm⁻¹. Isto mostra que esta vibração teve sua frequência diminuída com a presença da prata iônica e metálica, supondo-se uma interação entre esta e o oxigênio da carbonila (C=O).

A ligação C-N de todas as aminas é identificada por uma banda de estiramento média entre 1350 cm⁻¹ e 1000 cm⁻¹, enquanto que a banda da ligação C-N de uma amida primária e secundária ocorre em 1400 cm⁻¹ (PAVIA et al., 2010). No espectro da quitosana, observa-se a banda da

ligação C-N do grupo amino ocorrendo em 1318 cm^{-1} , a qual é deslocada de 12 cm^{-1} para uma frequência mais alta no espectro do complexo- Ag^+ -quitosana, em 1330 cm^{-1} . Continuando a ser deslocada no espectro NPs-Ag-quitosana posicionada em 1338 cm^{-1} . Isso pode ser explicado pela coordenação da prata com o nitrogênio amínico, o qual assume uma carga parcial positiva tornando-se mais eletronegativo e consequentemente retirando os elétrons da ligação covalente C-N. Isso determina uma redução no comprimento da ligação e o fortalecimento da mesma, promovendo um aumento da frequência da vibração C-N.

Logo, com base nesta análise, pode-se supor que a quitosana esteja coordenada à prata pelo oxigênio da hidroxila(O-H) ou da carbonila (C=O) e pelo nitrogênio do grupo amino (NH_2), conforme o esquema na Figura 53, o que confirma a proposta de OGAWA; OKA; YUI, 1993.

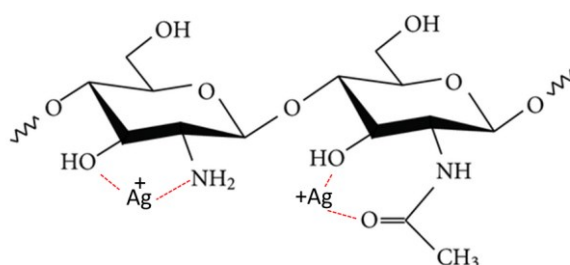


Figura 53. Ilustração de coordenação da quitosana à prata iônica.

Resultados semelhantes foram encontrados por USMAN et al. (2013), na caracterização de NPs de óxido de cobre estabilizadas por quitosana, onde foi observado o deslocamento da banda de vibração N-H, concluindo a coordenação da quitosana ao metal pelo átomo de nitrogênio.

5.3.

Caracterização do bambu *Dendrocalamus giganteus* impregnado com NPs-Ag

5.3.1.

Microtomografia computadorizada 3D do bambu impregnado com NPs-Ag

A técnica de μ CT forneceu imagens tridimensionais, nas quais é possível observar a presença de agregados metálicos não só na parte superficial da seção, mas também no interior da matriz vegetal. As NPs-Ag não foram visualizadas individualmente nas imagens, devido à limitação da técnica, podendo ser detectados apenas aglomerados de NPs-Ag $> 1\mu\text{m}$.

As seções do bambu impregnadas com NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana analisadas com uma objetiva de 4x, forneceram imagens tomográficas referentes a extremidade e parte central das seções analisadas, conforme indicado na seção materiais e métodos (Figura 30). A fim de ter uma visão ampla da impregnação, a seção do bambu impregnada com NPs-Ag-quitosana foi analisada também com a objetiva de 0.4x, fornecendo imagens tomográficas com menor resolução, porém permitindo a visualização da seção inteira em uma única imagem.

Na Figura 54 A-B, observa-se as imagens tomográficas do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato, referentes à parte central. Para uma melhor interpretação visual dos agregados metálicos, no processamento digital, retirou-se a matriz vegetal do bambu, visualizando-se apenas os agregados metálicos de prata.

Na Figura 54 A, verifica-se que os agregados são distribuídos de forma não homogênea, se depositando somente no parênquima, contornando os feixes vasculares, e se localizando preferencialmente na parte externa da amostra examinada. Adicionalmente, na Figura 54 B, é possível observar a distribuição destes agregados metálicos de NPs-Ag-citrato no interior da amostra processada, utilizando uma escala de cores de acordo com os seus volumes dentro do intervalo de $61,63 - 4,16 \times 10^5 \mu\text{m}^3$. Visualmente, os agregados apresentam em sua maioria volumes

relativamente próximos ao menor valor da escala ($61,63\mu\text{m}^3$), sendo observada na parte externa e nas laterais a existência de agregados com volumes maiores ($2,08 \times 10^5\mu\text{m}^3$ e $3,64 \times 10^5\mu\text{m}^3$).

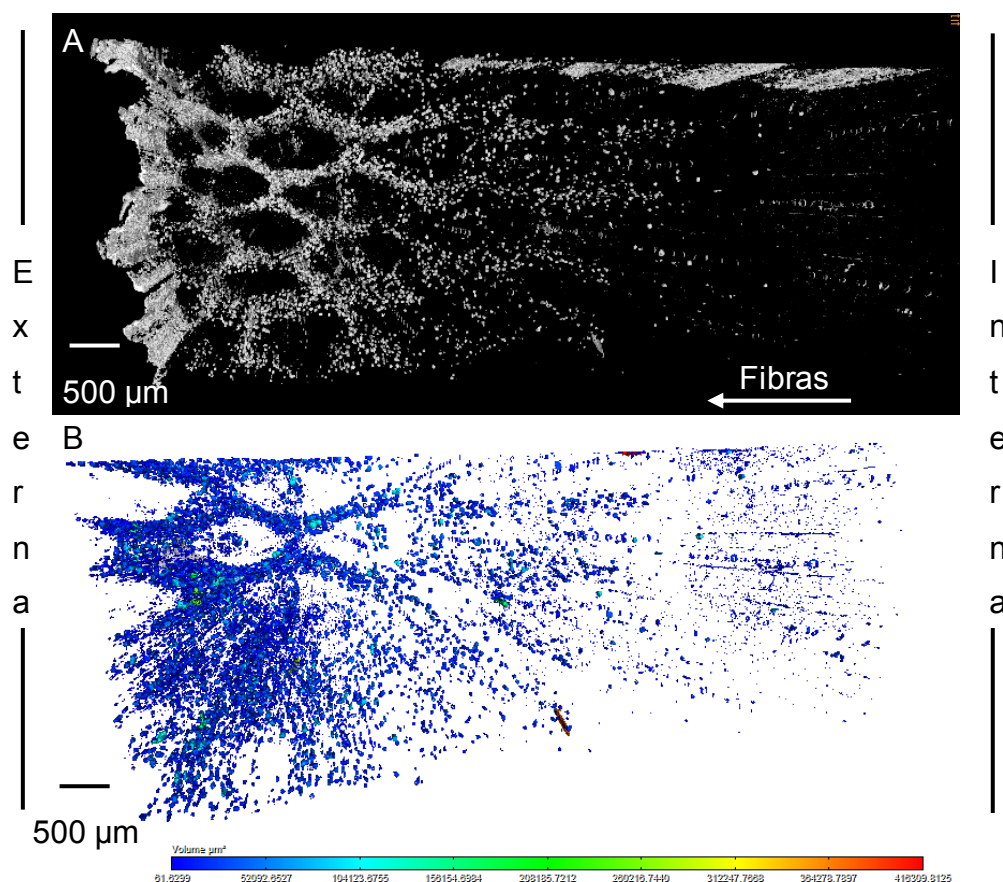


Figura 54. Imagem tomográfica da amostra do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato analisado com uma objetiva de 4x, com exclusão da matriz vegetal na fase de processamento digital. A seta indica a distribuição anisotrópica das fibras ao longo da direção radial, aumentando da parte interna para a parte externa do colmo. A) Seção central da amostra em exame com a exclusão da matriz vegetal. B) Seção central da amostra em exame em cores de acordo com o volume dos agregados no intervalo de $61,63 - 4,16 \times 10^5\mu\text{m}^3$.

A distribuição anisotrópica das fibras é indicada pela seta, mostrando que o aumento de sua concentração ocorre na direção radial do colmo, da parte interna para a parte externa da porção examinada. Os agregados metálicos seguem a mesma distribuição das fibras na direção radial, aumentando da parte interna para a externa e formando um gradiente de concentração, que pode ser ratificado através do gráfico de área ocupada pelos agregados na seção longitudinal *versus* a distância

no eixo transversal aos vasos, ilustrado na Figura 55, obtido pelo processamento da imagem 54 A.

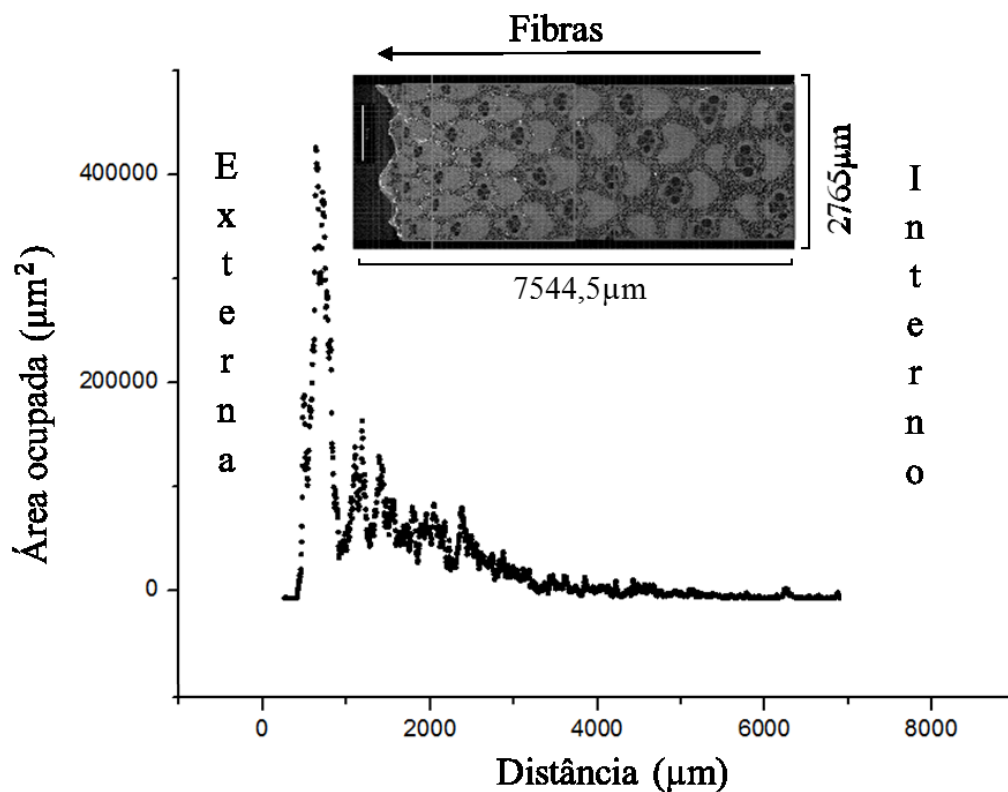


Figura 55. Área total ocupada por aglomerados de NPs-Ag-citrato na seção longitudinal em função da distância no eixo transversal aos vasos, na direção radial do colmo, no sentido da parte externa para a parte interna. Seção de 2765 x 7544,5 x 2765 μm analisada com a objetiva de 4x.

Conforme ilustrado na seção de materiais e métodos (Figura 28), as amostras de bambu impregnado com as NPs-Ag possuíam 18000 x 12000 x 5000 μm (comprimento x espessura x largura). A parte central da seção impregnada analisada no microtomógrafo foi de 4000 x 12000 x 5000 μm , sendo processada digitalmente apenas 2765 x 7544,5 x 2765 μm (Figura 31), que corresponde a 15,36% do comprimento, 62,87% da espessura e 55,3% da largura da amostra impregnada inicialmente. Na Figura 55 é possível verificar que ao longo da seção transversal, que é a espessura da amostra, a área ocupada pelos aglomerados sofre decréscimo em direção a parte interna, apresentando um pico máximo no

limite da camada externa em aproximadamente 700 μm . Na faixa de espessura de 1000 - 2500 μm , a área média ocupada pelos agregados é aproximadamente de 75.000 μm^2 , sendo possível observar a diminuição desta área média no intervalo de 2500 – 3100 μm , se aproximando dos valores mínimos ao longo do eixo transversal.

Estes resultados podem estar interligados com a concentração heterogênea dos constituintes poliméricos, celulose e lignina, ao longo da seção impregnada. De acordo com PEREIRA; BERALDO (2007), durante o desenvolvimento do bambu, o processo de lignificação ocorre em estágios diferentes, no sentido longitudinal, do topo para a base, e no sentido transversal, da parte interna para a externa do colmo. Com base nisto, supõe-se que a concentração diferenciada de lignina ao longo da direção radial possa ser o principal responsável pelo resultado observado. Isto porque a parte externa, onde há maior concentração de lignina, apresentou maior quantidade de agregados, sugerindo uma possível afinidade entre a lignina e as NPs-Ag-citrato.

A Figura 56 mostra um corte 2D da imagem tomográfica da seção do bambu impregnada com NPs-Ag-citrato, onde observa-se na seção transversal (Figura 56 A), aglomerados metálicos em geometrias isodiamétricas, e na seção longitudinal (Figura 56 B) geometrias retangulares e quadradas, semelhante as células do parênquima, visualizadas na Figura 40. Por isso entende-se que os agregados ocuparam todo o espaço de algumas células do parênquima, preenchendo-as completamente.

Uma explicação razoável para este resultado são as dimensões das pontoações presentes na parede das células do parênquima. Na Figura 40, vimos que foram encontradas pontoações com diâmetros de 530 nm e 670 nm e na Figura 46, que as NPs-Ag-citrato apresentavam diâmetros médios de 14,3 nm. Logo a passagem de NPs-Ag-citrato através das células do parênquima não seriam um problema. No entanto, com o processo de secagem da seção impregnada, os agregados metálicos começaram a ser formados, se tornando maiores que o diâmetro das pontoações das células, e impedindo sua saída.

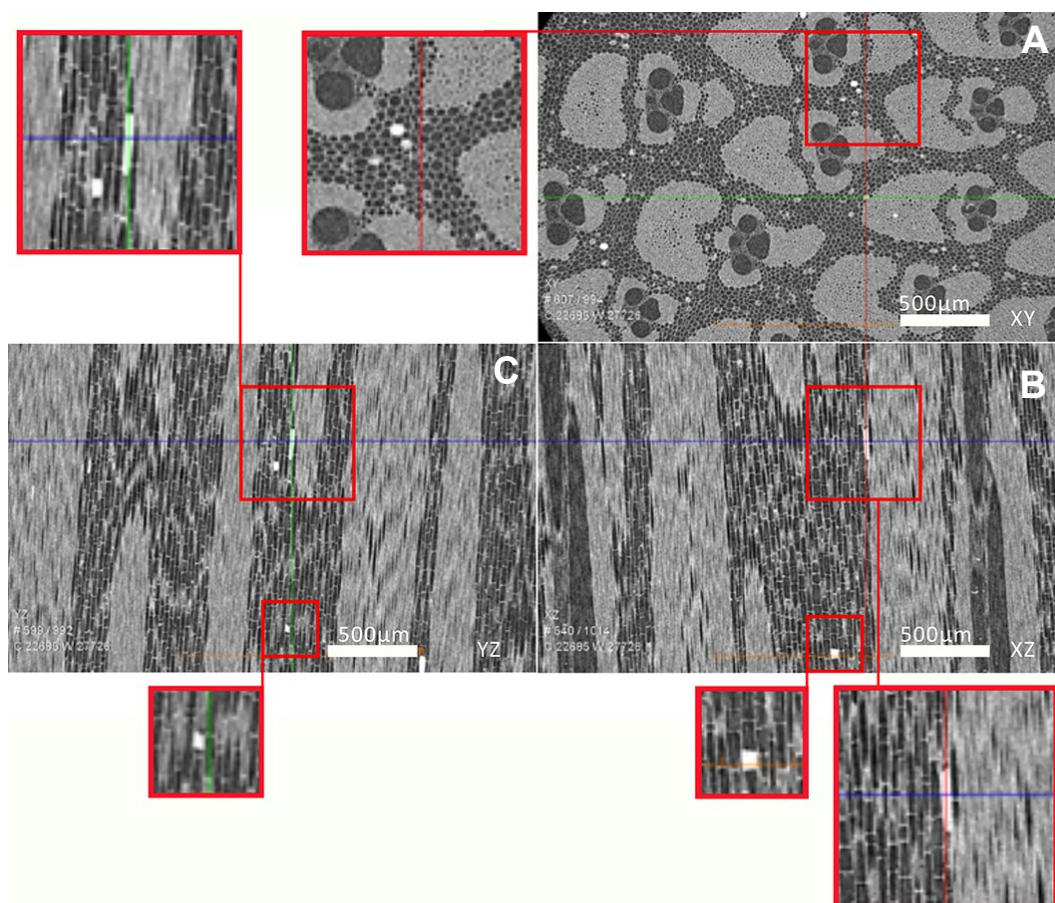


Figura 56. Imagem em 2D obtida pela μ CT da seção do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato. Os retângulos vermelhos ressaltam os aglomerados metálicos em geometrias quadradas e retangulares. A) Seção transversal plano xy. B) Seção longitudinal plano xz. C) Seção longitudinal plano yz.

Esta suposição pode ser confirmada através do processamento digital da Figura 54 A, o qual fornece o volume médio dos agregados e sua distribuição no interior da seção impregnada. Conforme visualizado no histograma da Figura 57 e tabela 6, o volume de amostra processada foi de $46,9 \text{ mm}^3$ (Figura 31), do qual foram contabilizados ao total 13.162 agregados, ocupando um volume interno de $1,21 \times 10^8 \text{ } \mu\text{m}^3$, que representa 0,26% do volume da seção processada. O volume médio de agregados foi de $9,19 \times 10^3 \pm 7,41 \times 10^4 \text{ } \mu\text{m}^3$, tendo 9.450 (71,8%) agregados da população examinada apresentando volumes entre $246,5 \text{ } \mu\text{m}^3$ e $1,0 \times 10^4 \text{ } \mu\text{m}^3$, e o restante da população, com 3.712 (28,2%) agregados, volumes de $1,0 \times 10^4 \text{ } \mu\text{m}^3$ a $8,33 \times 10^6 \text{ } \mu\text{m}^3$, confirmando que

nem mesmo o agregado com o menor volume detectado conseguiria se movimentar através das paredes das células parenquimáticas.

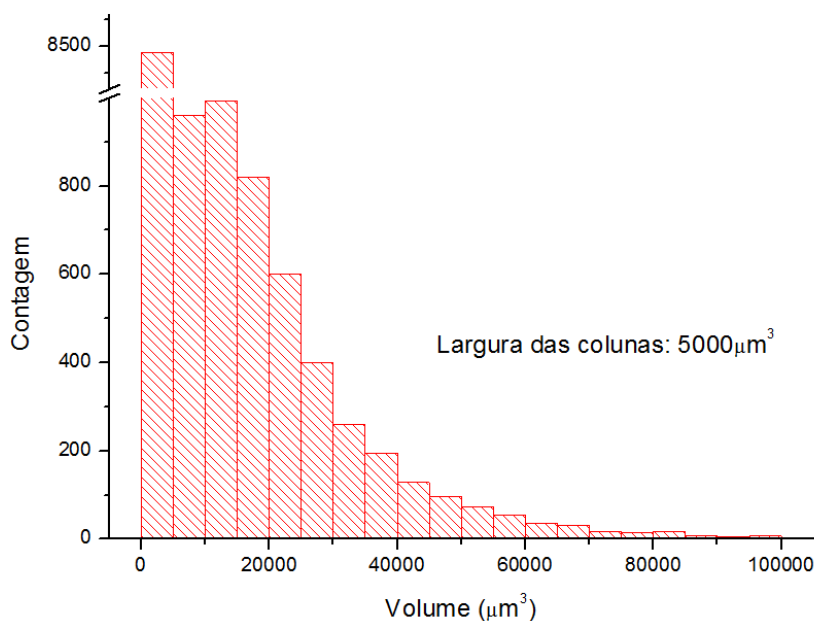


Figura 57. Distribuição de volume dos aglomerados metálicos no interior da amostra central do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato analisado com uma objetiva de 4x.

Tabela 6. Estatística de volume (μm^3) da população de aglomerados de NPs-Ag-citrato no interior do bambu (volume analisado de $46,9 \text{ mm}^3$).

Quantidade	Vol. total	Media de vol.	Desvio padrão	Vol. mínimo	Vol. máximo	Mediana
$1,32 \times 10^4$	$1,21 \times 10^8$	$9,19 \times 10^3$	$7,41 \times 10^4$	246,5	$8,33 \times 10^6$	$1,11 \times 10^3$

Na Figura 58 A-C, podemos observar as imagens tomográficas do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana, referentes à parte central, analisada com a objetiva de 4x. Nestas imagens também foi retirada digitalmente a matriz vegetal do bambu para que os agregados fossem visualizados de forma mais clara e individualizada.

Na Figura 58A, observa-se que há grande quantidade de agregados na seção do bambu processada, apresentando uma distribuição aleatória, em todos os tecidos da matriz vegetal (córtex,

parênquima, fibras, floema, vasos do protoxilema e metaxilema). A distribuição dos agregados na porção processada de acordo com seus volumes em um intervalo de $71,47 - 2,18 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ pode ser visualizada na Figura 58 B, onde é possível verificar que há o predomínio de agregados com volumes menores ($71,47 \mu\text{m}^3$) fora dos vasos e agregados com volumes maiores ($1,10 \times 10^7$, $1,91 \times 10^7$ e $2,18 \times 10^7 \mu\text{m}^3$) localizados no interior de alguns vasos.

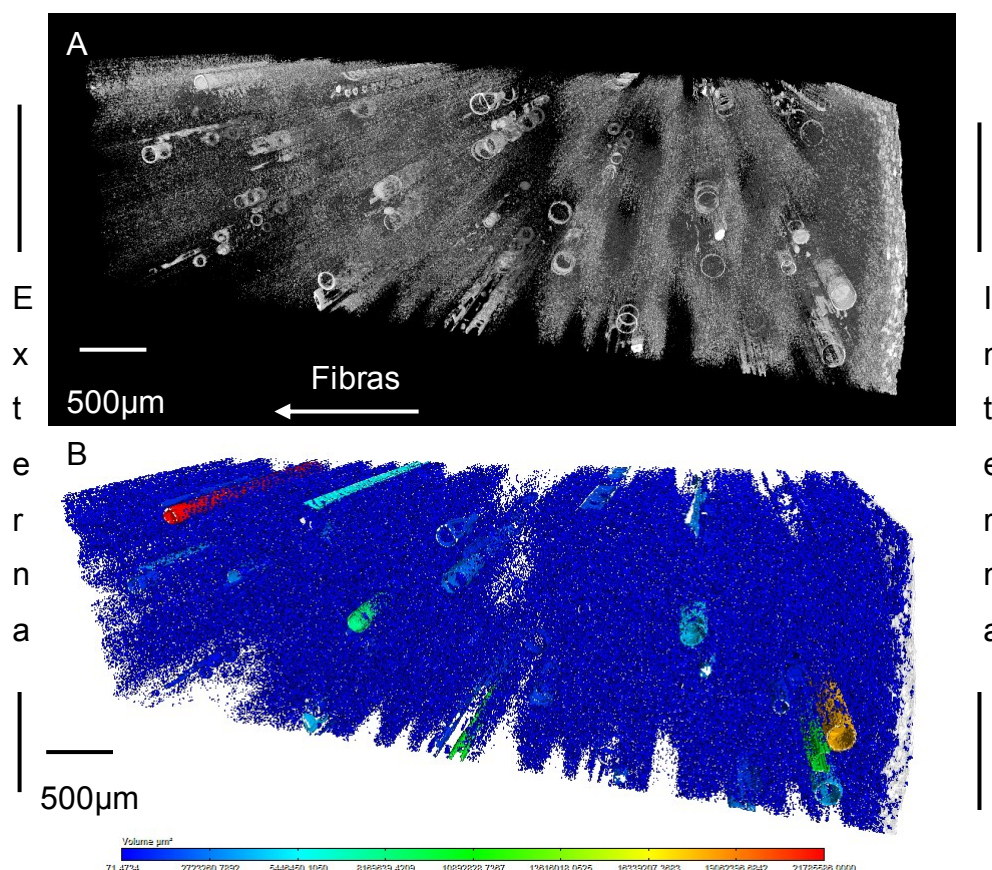


Figura 58. Imagem tomográfica da amostra do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana analisado com a objetiva de 4x, com exclusão da matriz vegetal na fase de processamento digital. A seta indica a distribuição anisotrópica das fibras ao longo da direção radial, aumentando da parte interna para a parte externa do colmo. A) seção central da amostra em exame. B) seção central da amostra em exame em cores de acordo com o volume dos agregados no intervalo de $71,47 - 2,18 \times 10^7 \mu\text{m}^3$.

A distribuição dos agregados ao longo da seção radial apresenta pequenas variações, sendo observado aumento da quantidade de agregados da parte externa para a parte interna da seção processada. Isto pode ser comprovado através do gráfico de área ocupada pelos agregados na seção longitudinal *versus* a distância da amostra no eixo transversal aos vasos, ilustrado na Figura 59.

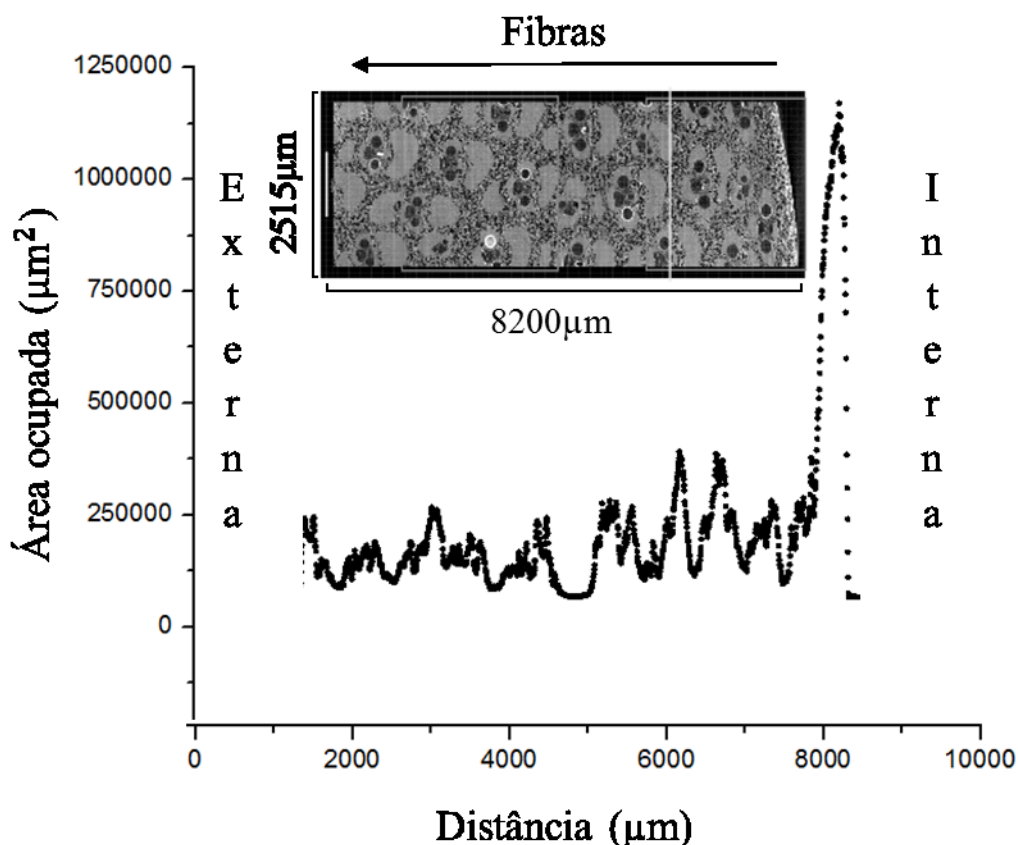


Figura 59. Área total ocupada por aglomerados de NPs-Ag-quitosana na seção longitudinal em função da distância no eixo transversal aos vasos, na direção radial do colmo, no sentido da parte externa para a parte interna. Seção de 2855 x 8200 x 2515 μm analisada com a objetiva de 4x.

Da mesma forma, a parte central da seção impregnada com NPs-Ag-quitosana analisada no microtomógrafo foi de 4000 x 12000 x 5000 μm , sendo processada digitalmente apenas 2855 x 8200 x 2515 μm (Figura 32), que corresponde a 15,86% do comprimento, 68,33% da espessura e 50,3% da largura da amostra impregnada. Na Figura 59 é possível verificar que ao longo da seção transversal, que é a espessura da amostra, a área ocupada pelos aglomerados sofre um pequeno aumento em direção a parte interna, apresentando um pico máximo no limite da seção em aproximadamente 8150 μm . Na faixa de espessura de 500 - 4500 μm , a área média ocupada pelos agregados é aproximadamente de 190.000 μm^2 . Todavia, no intervalo de 4500 – 5000 μm é possível observar que a área média se aproxima dos valores

mínimos ao longo do eixo transversal e sofre um aumento progressivo na faixa de 5000 – 7250 μm , apresentando uma área média ocupada de 250.000 μm^2 .

Na Figura 60, referente à imagem tomográfica do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana em 2D, foi possível discriminar os agregados metálicos e destaca-los em coloração vermelha. Isto nos permitiu detectar nas imagens 60 B e 60 D que, no parênquima, estes agregados apresentaram adesão somente às paredes das células, sem preenche-las completamente. Esta aderência também ocorreu no interior dos vasos, sendo visualizada uma camada interna de revestimento.

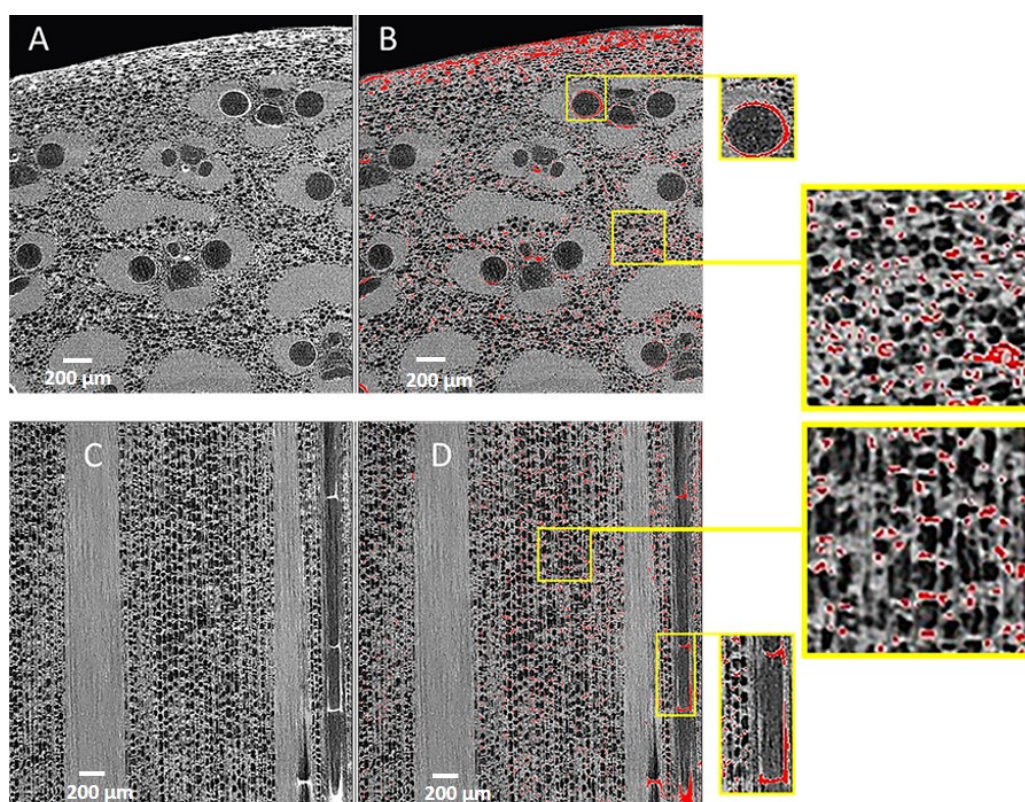


Figura 60. Imagem em 2D obtida pela μCT da seção do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana sem (A e C) e com (B e D) processamento. Os objetos vermelhos ressaltam os aglomerados metálicos aderidos nas paredes internas dos vasos e células do parênquima. A-B) Seção transversal plano xy sem e com processamento. C-D) Seção longitudinal plano xz sem e com processamento.

Estes resultados mostram que os agregados metálicos apresentaram grande afinidade pela parede das células parenquimáticas, preferencialmente nas partes do bambu que, conforme a literatura, apresentam menores concentrações de lignina, que é a parte interna.

Todavia estes aglomerados se depositam também nos vasos, cuja parede interna possui uma espessa camada de parede celular secundária contendo a lignina. Neste caso não podemos cogitar que esta deposição ocorreu devido a diferença do diâmetro das pontoações das paredes dos vasos e o volume dos agregados, pois as extremidades dos vasos são abertas e esta deposição ocorreu em praticamente todos os vasos.

Através do processamento digital da Figura 58 A foi possível verificar quantitativamente a distribuição de volume dos aglomerados no interior da seção impregnada. Conforme visualizado no histograma da Figura 61 e tabela 7, O volume da amostra processado foi de $51,67 \text{ mm}^3$ (Figura 32), do qual foram contabilizados 355.462 agregados, ocupando um volume total de $6,08 \times 10^8$, que representa 1,18% do volume interno da seção analisada. O volume médio de agregados foi de $1,71 \times 10^3 \pm 5,56 \times 10^4 \text{ } \mu\text{m}^3$, tendo 352.000 (99,2%) agregados da população examinada apresentando volumes entre $285,89 \text{ } \mu\text{m}^3$ e $8.000 \text{ } \mu\text{m}^3$, dos agregados. O restante da população, com 3.462 (0,97%) agregados apresentaram volumes superiores, na faixa de $8.000 \text{ } \mu\text{m}^3$ a $2,17 \times 10^7 \text{ } \mu\text{m}^3$.

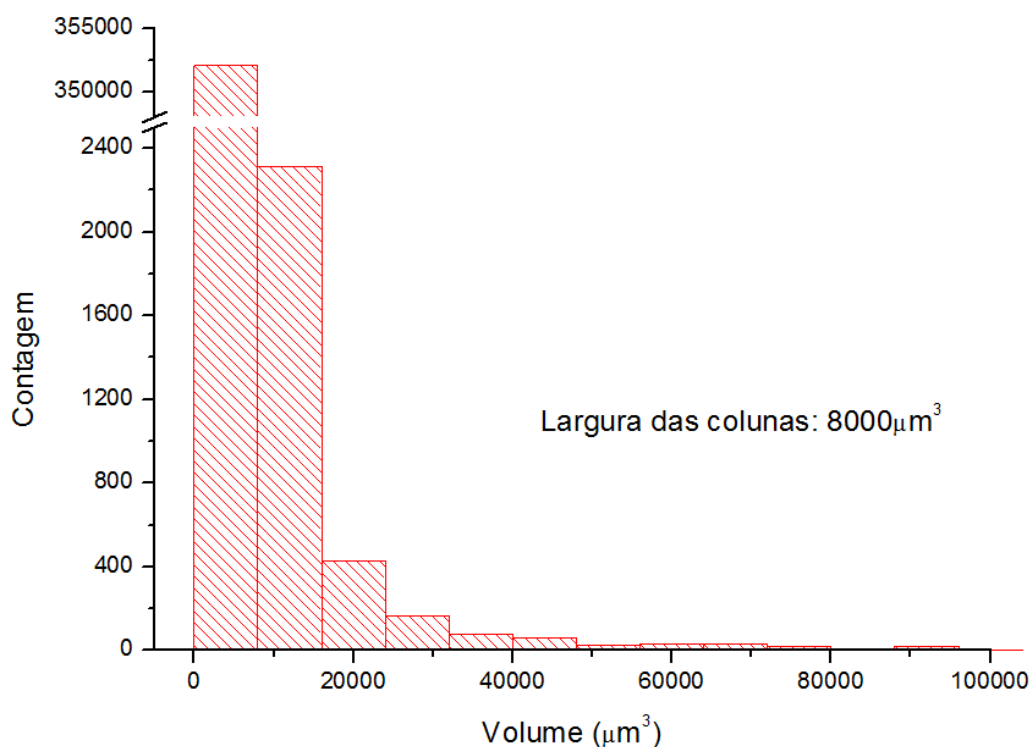


Figura 61. Distribuição de volume dos aglomerados metálicos no interior da amostra central do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana, analisado com objetiva de 4x.

Tabela 7. Estatística de volume (μm^3) da população de aglomerados de NPs-Ag-quitosana, analisado com objetiva de 4x no interior do bambu (volume analisado de $51,67 \text{ mm}^3$).

Quantidade	Vol. total	Media de vol.	Desvio padrão	Vol. mínimo	Vol. máximo	Mediana
$3,55 \times 10^5$	$6,08 \times 10^8$	$1,71 \times 10^3$	$5,56 \times 10^4$	285,89	$2,17 \times 10^7$	$6,43 \times 10^2$

Para facilitar o processamento, conforme visualizado na Tabela 8, o volume da seção do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana foi reduzido para $29,80 \text{ mm}^3$, do qual foram contabilizados ao total 179.470 agregados, ocupando um volume interno total de $2,7 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ e volumes médios de $1,51 \times 10^3 \pm 60.677,8 \mu\text{m}^3$ que representa 0,91% do volume da seção processada. Deste total, 176.474 (98,3%) agregados se depositaram fora dos vasos (FV), apresentando um volume total de $1,72 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ e volumes médios de $646,11 \pm 5045,67 \mu\text{m}^3$. Enquanto que 2.996 (1,67%) agregados se localizaram no interior dos vasos (IV), apresentando um volume total de $9,8 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ e volumes médio de $3,28 \times 10^4 \pm 474.033,69 \mu\text{m}^3$.

Tabela 8. Estatística de volume (μm^3) da população de aglomerados de NPs-Ag-quitosana no interior do bambu (volume analisado de $29,8 \text{ mm}^3$) analisado com objetiva de 4x.

Popul.	Quant.	Vol. total	Media de vol.	Desvio padrão	Vol. mínimo	Vol. máximo	Mediana
IV*	2.996	$9,8 \times 10^7$	$3,28 \times 10^4$	$5,74 \times 10^5$	285.89	$2,18 \times 10^7$	643.26
FV**	176.474	$1,72 \times 10^8$	646.11	$5,05 \times 10^3$	285.89	$2,13 \times 10^5$	321.63
Toda	179.470	$2,7 \times 10^8$	$1,51 \times 10^3$	$6,07 \times 10^4$	285.89	$2,11 \times 10^7$	571.79

*Interior dos vasos, **Fora dos vasos

Os vasos correspondem a 8,5 % ($2,53 \text{ mm}^3$) do volume total da seção analisada, sendo que 36,3% do volume dos agregados detectados em toda a seção impregnada se depositaram em seu interior. Isto significa que 4,1% do volume total de vasos foram ocupados pelos agregados metálicos ($9,8 \times 10^7 \mu\text{m}^3$). Enquanto que 63.7% do total de agregados metálicos detectados na seção impregnada se depositaram nos demais tecidos do bambu, ocupando apenas 0,63% do volume total destes tecidos ($1.72 \times 10^8 \mu\text{m}^3$). Ou seja, nos vasos ocorreram menor quantidade de agregados, porém com volumes maiores. Enquanto que nos demais tecidos se depositaram maior quantidade de agregados, mas com volumes menores. Estes resultados podem estar ligados com a dificuldade e facilidade de introdução dos agregados no interior do parênquima e dos vasos, respectivamente. O menor volume de agregados no parênquima pode estar relacionado com o diâmetro hidrodinâmico da esfera de quitosana contendo as NPs-Ag, que pode ser superior ao diâmetro das pontuações na parede celular das células do parênquima, dificultando o transporte horizontal e a entrada nas NPs-Ag no interior destas.

Já a afinidade dos agregados pelos vasos pode ser melhor discutida ao avaliarmos a Figura 62, referente as imagens tomográficas da seção impregnada com NPs-Ag-quitosana analisada com a objetiva de 0.4x, que devido a sua baixa resolução, nos permite visualizar os maiores agregados ao longo de toda a seção impregnada. Na Figura 62 A, observa-se que os agregados depositados no interior dos vasos formaram anéis metálicos com diferentes dimensões e grandes revestimentos internos, que provavelmente são oriundos de deposições simultâneas de agregados nas paredes terminais deterioradas das células que formam os vasos, conforme ilustrado na Figura 37. Além disso, observa-se na Figura 62 B que alguns vasos não foram somente revestidos, mas também preenchidos pelos agregados, que pode ter ocorrido pela formação de septos ortogonais ao longo dos vasos, que serão melhor observados na Figura 63. Este resultado é confirmado ao avaliar-se a Figura 62 C, onde observa-se a distribuição dos agregados de acordo com seus volumes em

um intervalo de $6,59 \times 10^3 - 1,04 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ no interior dos vasos. Pode-se verificar que os vasos apresentaram graus diferentes de preenchimento, tendo suas paredes internas revestidas na forma de anéis ou cilindros ocos e cilindros totalmente preenchidos. Os vasos com preenchimentos completos apresentaram agregados com volumes maiores ($1,04 \times 10^8 \mu\text{m}^3$), enquanto que vasos com a ocorrência de anéis ou cilindros ocos tiveram agregados com volumes inferiores ($6,59 \times 10^3 - 5,20 \times 10^7 \mu\text{m}^3$).

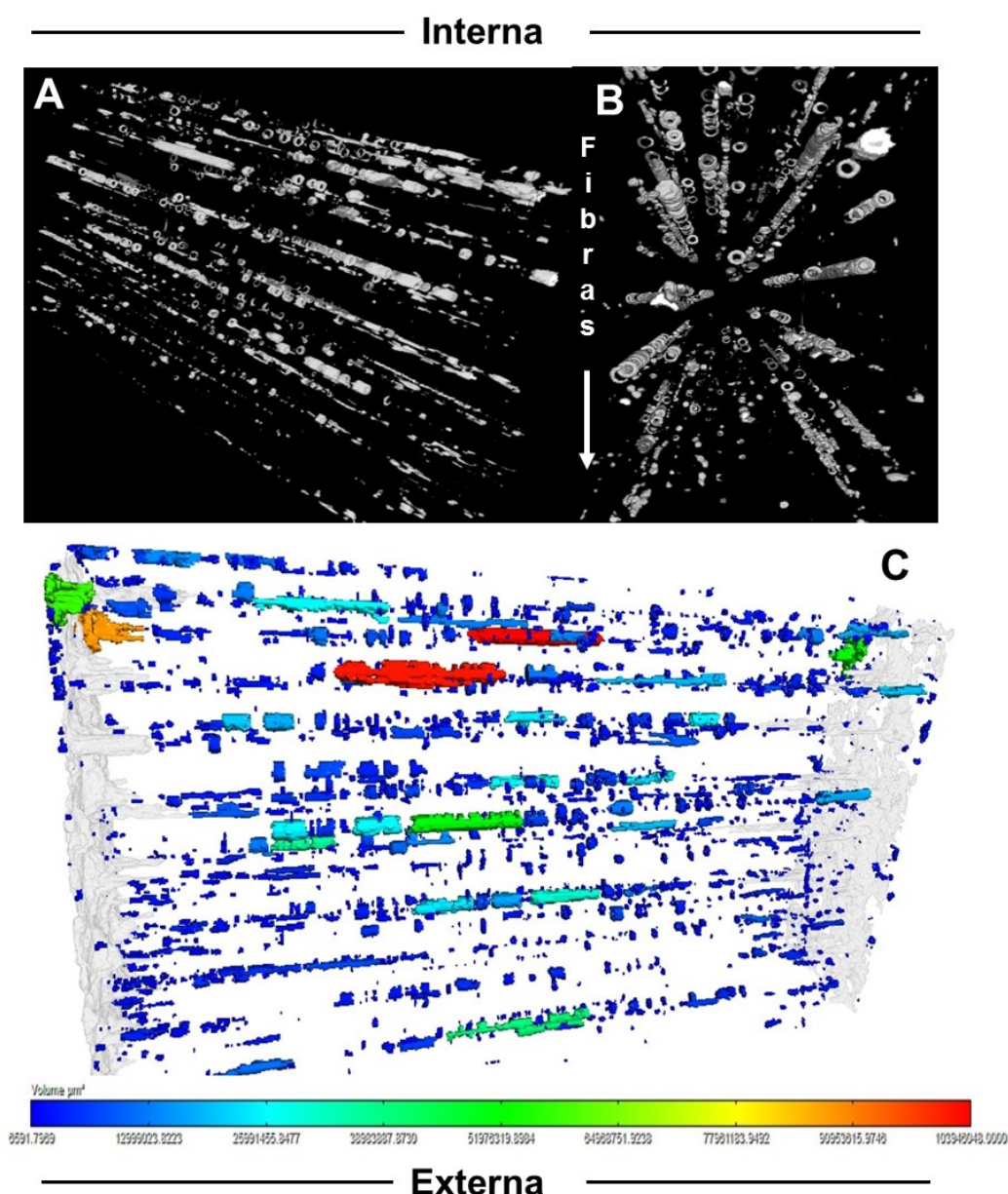


Figura 62. Imagem tomográfica da amostra do bambu impregnado com NPs-Ag-chitosana analisado com a objetiva de 0.4x com exclusão da matriz vegetal na fase de processamento digital. A) Seção do bambu examinado mostrando os anéis de aglomerados no interior dos vasos. B) Seção do bambu examinado mostrando alguns

vasos revestidos e preenchidos e a seta indica a distribuição anisotrópica das fibras ao longo da direção radial, aumentando da parte interna para a parte externa do colmo. C) Seção do bambu examinado mostrando a distribuição de aglomerados metálicos de acordo com seus volumes em um intervalo de $6,59 \times 10^3 - 1,04 \times 10^8 \mu\text{m}^3$.

A Figura 63, referente a imagem tomográfica em 2D, confirma a formação de septos metálicos, que podem ter ocorrido pela deposição dos agregados nas paredes terminais das células que compõe os vasos (Figura 37), fechando completamente algumas de suas partes, e podendo ser também as principais responsáveis pelos preenchimentos observados. No entanto, presença randômica dos septos metálicos ao longo dos vasos, não apresentam intervalos constantes entre um e outro.

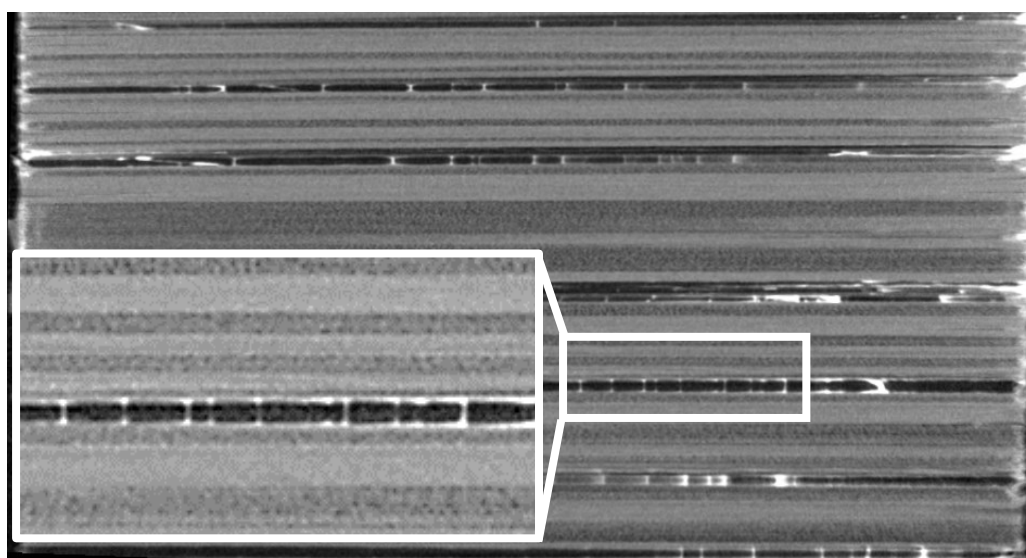


Figura 63. Imagem tomográfica da seção do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana. Nesta seção longitudinal e na ampliação da imagem, evidencia-se deposições ortogonais em relação ao elemento de vaso do metaxilema.

A área ocupada dos agregados ao longo da matriz vegetal pode ser avaliada através do gráfico de área ocupada pelos agregados na seção transversal *versus* a distância da amostra no eixo longitudinal, paralelo aos vasos, ilustrado na Figura 64, onde observa-se uma distribuição relativamente homogênea ao longo do sentido longitudinal.

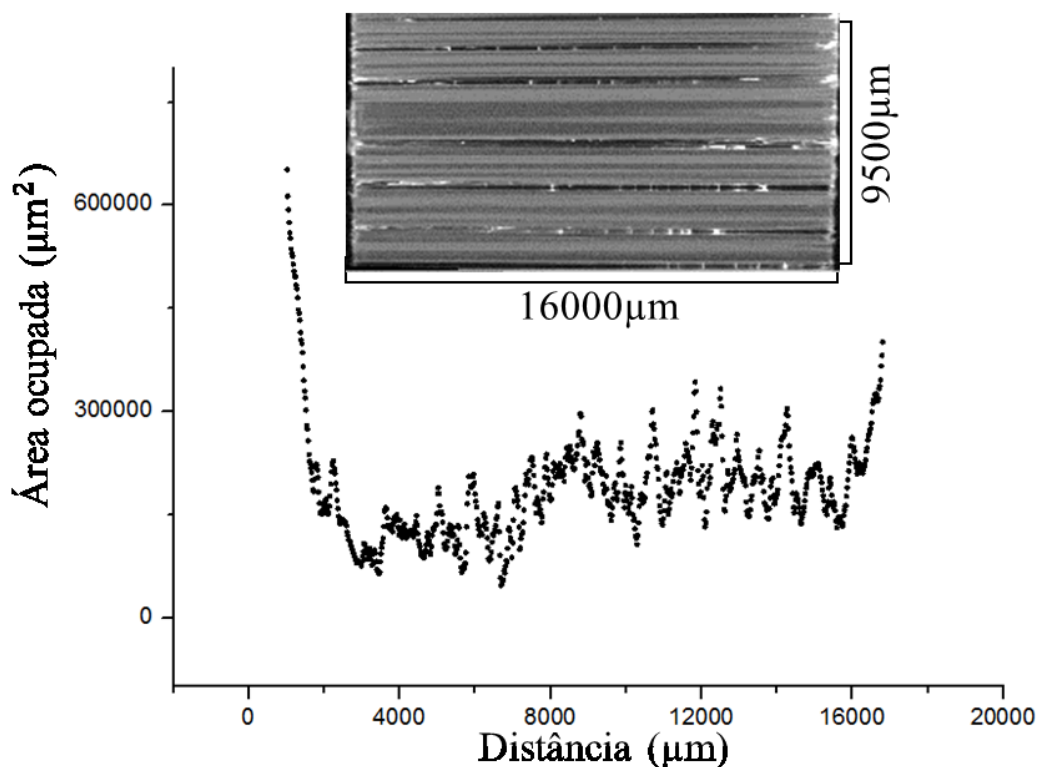


Figura 64. Área total ocupada por aglomerados de NPs-Ag-quitosana na seção transversal em função da distância no eixo longitudinal aos vasos.

A seção impregnada com NPs-Ag-quitosana analisada no microtomógrafo com a objetiva de 0.4x foi de 18000 x 12000 x 5000 μm , sendo processada digitalmente apenas 16000 x 9500 x 4000 (Figura 33), que corresponde a 88,9% do comprimento, 79,17% da espessura e 80% da largura da amostra impregnada. O processamento nos permitiu verificar na Figura 64 que ao longo do eixo longitudinal, que é o comprimento da amostra, a área ocupada pelos aglomerados possui dois grandes picos situados nos limites inicial e final da amostra de aproximadamente 750.000 μm^2 e 400.000 μm^2 , respectivamente, que correspondem as extremidades da amostra que por ter tido contato direto com as NPs-Ag-quitosana obteve maior adesão de agregados, sendo melhor visualizado na Figura 62 C. Na faixa de comprimento de 1000 - 16000 μm , a área média ocupada pelos agregados é aproximadamente de 150.000 μm^2 , tendo uma pequena oscilação no intervalo de 125.000-175.000 μm^2 .

Em sequência, o processamento digital da Figura 62 foi realizado, originando o histograma de distribuição do volume de aglomerados no interior da seção impregnada, conforme visualizado na Figura 65. De acordo com o histograma e valores resumidos na Tabela 9, o volume de amostra analisado foi de 569 mm^3 (Figura 33), do qual foram contabilizados 2.330 agregados, ocupando um volume de $2,88 \times 10^9 \mu\text{m}^3$, que representa 0,51 % do volume da seção do bambu analisada. Observa-se que 2.100 (90,1%) agregados da população examinada apresentaram volumes entre $6,59 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ e $2,0 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, tendo uma população restante de 230 (0,98%) com volumes de $2,0 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ a $1,40 \times 10^8 \mu\text{m}^3$.

O volume médio de agregados foi de $1,24 \times 10^6 \pm 6,23 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, que se encontra dentro da faixa de volumes encontrados no processamento da Figura 58 A visualizados na Tabela 8.

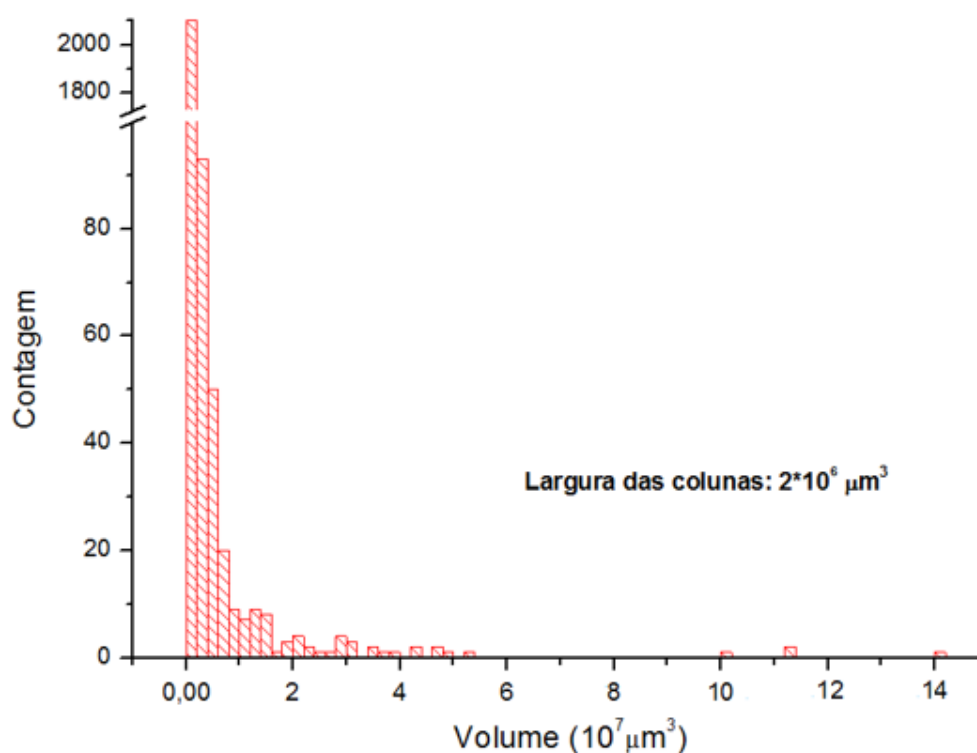


Figura 63. Distribuição de volume dos aglomerados metálicos no interior da amostra central do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana.

Tabela 9. Estatística de volume (μm^3) da população de aglomerados de NPs-Ag-quitosana no interior do bambu (volume analisado de 568 mm^3).

Quantidade	Vol. total	Media de vol.	Desvio padrão	Vol. mínimo	Vol. máximo	Mediana
2330	$2,88 \times 10^9$	$1,24 \times 10^6$	$6,23 \times 10^6$	$6,59 \times 10^3$	$1,40 \times 10^8$	$9,89 \times 10^4$

Comparando-se os resultados quantitativos das impregnações das amostras de bambu, verifica-se que o volume de agregados metálicos contabilizados no interior da seção do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato é inferior ($1,3 \times 10^4$ agregados) em relação ao valor contabilizado na seção do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana ($3,55 \times 10^5$ agregados) totalizando um volume de $1,21 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ que corresponde a 0,26% contra $6,08 \times 10^8 \mu\text{m}^3$, correspondendo a 1,18% da matriz impregnada, respectivamente. Ao compararmos os valores do volume ocupado por cada agregado, verifica-se na seção do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato que 71, 8% dos agregados possuíam volumes entre $246-1,0 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, apresentando um volume médio de $9,19 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. Enquanto que na seção do bambu impregnada com NPs-Ag-quitosana, cerca de 99,2% dos agregados possuíam volumes de $285,89-8,0 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, tendo um volume médio de $1,71 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. Logo, na seção do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato houve menor impregnação e percentual de agregados pequenos, apresentando volume médio de agregados maiores. Estes se depositaram preferencialmente no parênquima, preenchendo as células totalmente, com uma distribuição anisotrópica que determina a maior concentração de agregados na parte externa do bambu. Enquanto que a seção do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana, apresentou maior impregnação e percentual de agregados pequenos com volume médio de agregados menores. A deposição destes agregados ocorreu fora dos vasos com volumes médios de $6,46 \times 10^2 \mu\text{m}^3$ e no interior dos vasos com volumes médios $3,28 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, ocorrendo áreas preenchidas e revestidas dos vasos; e no parênquima, aderência dos agregados nas paredes das células, sem

haver preenchimento. O resumo completo dos valores obtidos pode ser visualizado na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10. Resumo das Estatísticas de volume) das populações de aglomerados de NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana no interior do bambu, analisadas com as objetivas de 4x e 0.4x.

Objetiva	Impregnação	Vol. Processado	Tecido analisado	Quantidade	Vol. total	Media de vol.	Desvio padrão	Vol. mínimo	Vol. máximo	Mediana	% de agregados
4x	NPs-Ag-citrato	46,9	Todos	$1,32 \times 10^4$	$1,21 \times 10^8$	$9,19 \times 10^3$	$7,41 \times 10^4$	$2,46 \times 10^2$	$8,33 \times 10^6$	$1,11 \times 10^3$	0,26
		51,67	Todos	$3,55 \times 10^5$	$6,08 \times 10^8$	$1,71 \times 10^3$	$5,56 \times 10^4$	$2,86 \times 10^2$	$2,17 \times 10^7$	$6,43 \times 10^2$	1,18
	NPs-Ag-quitosana		Todos	$1,79 \times 10^5$	$2,7 \times 10^8$	$1,51 \times 10^3$	$6,07 \times 10^4$	$2,86 \times 10^2$	$2,11 \times 10^7$	$5,72 \times 10^2$	0,91
		29,8	IV*	$2,99 \times 10^3$	$9,8 \times 10^7$	$3,28 \times 10^4$	$5,74 \times 10^5$	$2,86 \times 10^2$	$2,18 \times 10^7$	$6,43 \times 10^2$	0,33
			FV*	$1,76 \times 10^5$	$1,72 \times 10^8$	$6,46 \times 10^2$	$5,05 \times 10^3$	$2,86 \times 10^2$	$2,13 \times 10^5$	$3,22 \times 10^2$	0,58
0.4x	NPs-Ag-quitosana	569	Todos	$2,33 \times 10^3$	$2,88 \times 10^9$	$1,24 \times 10^6$	$6,23 \times 10^6$	$6,59 \times 10^3$	$1,40 \times 10^8$	$9,89 \times 10^4$	0,51

De acordo com os resultados obtidos pelo grupo de pesquisa do Projeto Bambu em parceria com o grupo de pesquisa de Campinas, as fibras de bambu possuem um potencial superficial negativo de -0,8 V. Isto sugere que em uma funcionalização do bambu, as fibras podem apresentar maior adesão por espécies químicas com caráter ácido. Considerando-se que as fibras possuem espessas paredes celulares secundárias lignificadas, constituídas por celulose e lignina em concentrações variadas, dependendo do processo de lignificação, pode-se supor que seu potencial superficial negativo seja proveniente desta constituição. Neste sentido, sendo o revestimento interno dos vasos do metaxilema formados também por uma parede celular secundária lignificada, conforme visualizado na Figura 42, e as NPs-Ag-quitosana possuindo caráter ácido devido aos grupos amino protonados da quitosana, é possível supor que também haja afinidade entre elas.

5.3.2.

Difração de raios-x do Bambu Impregnado com Nanopartículas de Prata

A difração de raio-X é uma das técnicas empregadas para se quantificar o teor de cristalinidade das substâncias. Sua aplicação na análise de materiais lignocelulósicos tem contribuído para a detecção da quantidade de celulose cristalina presente nas fibras e consequentemente no estudo das propriedades mecânicas destes (NAVARRO, 2011). A técnica também é usada na caracterização de NPs-Ag com a presença de planos cristalinos decorrentes da sua estrutura cúbica de face centrada que originam picos de cristalinidade específicos nos ângulos de espalhamento próximos a 38,45 (1,1,1), 46,35 (2,0,0), 64,75 (2,2,0) e 78,05 (3,1,1) (JYOTI; BAUNTHIYAL; SINGH, 2015).

Em seguimento, observa-se na Figura 62 os difratogramas, referentes à análise de DRX da camada externa (62 A) e interna (62 B) da seção do bambu impregnado com NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana.

Em ambos os difratogramas, observa-se dois picos de difração posicionados em ângulos de espalhamento igual a 15° e 22° , relacionados à celulose na forma cristalina, conforme reportado por CORREIA et al. (2015) em um estudo relacionado com o emprego das fibras de bambu como reforço em compósitos. O terceiro pico, posicionado em 38° é concernente aos cristalitos de prata, relacionado ao espalhamento do plano (1,1,1) caracterizando a presença do metal não só na superfície, mas também no interior da seção em tamanhos nanométricos. BANALA; NAGATI; KARNATI (2015) encontrou o mesmo pico de difração em $38,2^\circ$ na caracterização de NPs-Ag sintetizadas com o emprego de folhas de *Mimusops elengi*, em um estudo para aumentar o potencial antimicrobiano da dispersão coloidal. Em outro estudo, JIN et al. (2015a) sintetizou NPs-Ag na diretamente na superfície do bambu, caracterizando-as pela DRX através da presença de um pico de difração em 38° , confirmando os dados obtidos neste trabalho.

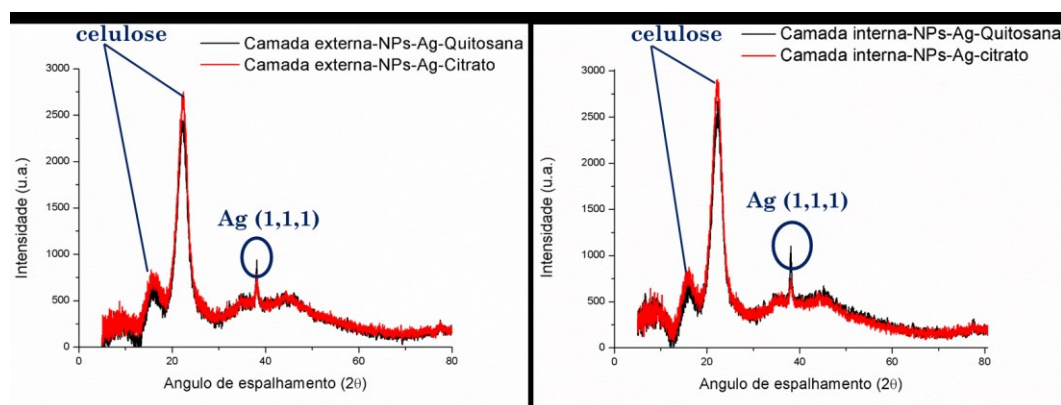


Figura 64. Difratogramas do bambu impregnado com NPs-Ag-quitosana e NPs-Ag-citrato. A) Camada externa (superficial) do bambu impregnado; B) Camada interna do bambu impregnado.

5.4.

Teste de potencial antifúngico das NPs-Ag sintetizadas

Testes anteriores foram realizados por nossa equipe, onde o efeito antimicrobiano de ambas as NPs-Ag sintetizadas foi avaliado em teste microbiológico controlado com cultura do fungo *Aspergillus niger*,

apresentando real efeito inibidor de seu crescimento, conforme comprovado pelo artigo em anexo a este trabalho. O mesmo artigo relata apenas o potencial antifúngico das NPs-Ag-citrato, porém obtivemos o mesmo desempenho inibidor com as NPs-Ag-quitosana. No entanto, o maior interesse deste estudo é verificar este efeito inibidor na matriz vegetal do bambu.

As amostras de bambu sem e com tratamento de NPs-Ag sintetizadas foram acompanhadas ao longo de 210 dias em condições ambientes com temperatura média de 33°C e umidade relativa do ar de 80%, visando simular as condições ambientais naturais em que o bambu é atacado em regiões subtropicais.

De acordo com a Figura 65, observou-se que as amostras impregnadas permaneceram visualmente intactas, sem a presença de fungos, enquanto que a seção do bambu sem tratamento apresentou proliferação de fungos. Um estudo semelhante foi realizado por LI et al., 2016, onde seções de madeira de bambu foram tratadas com NPs de óxido de zinco e submetidas a um protocolo microbiológico, sendo testadas seis espécies de fungos diferentes, dentre elas, o *Aspergillus niger*.

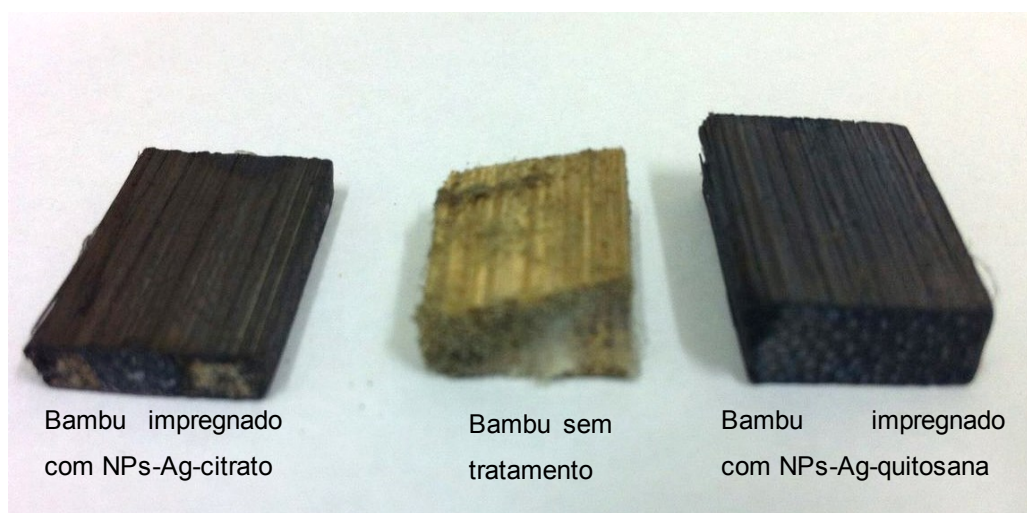


Figura 65. Seções de bambu sem e com tratamento, após exposição contínua ao ambiente natural por 210 dias à temperatura média de 33°C e umidade relativa de 80%.

6 Conclusões

Através deste trabalho pôde-se obter as seguintes conclusões:

- ✓ As NPs-Ag foram caracterizadas por UV-Vis, Potencial ζ , FT-IR e MEVT ;
- ✓ Potencial ζ confirmou a carga superficial negativa para NPs-Ag-citrato (-75mV) e NPs-Ag-quitosana (+65,3mV);
- ✓ FT-IR permitiu identificar variações das bandas vibracionais das possíveis interações entre grupos funcionais e Ag⁺ e NPs-Ag;
- ✓ MEVT: diâmetros médios para as NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana de $14,3 \pm 3,6$ nm e $4 \pm 1,2$ nm, respectivamente;
- ✓ A μ CT, MEV e CLSM possibilitou conhecer a morfologia da matriz do bambu sem tratamento de NPs-Ag;
- ✓ A μ CT permitiu a caracterização de agregados metálicos: NPs-Ag-citrato localizaram-se somente no parênquima, enquanto que NPs-Ag-quitosana localizaram-se em toda a estrutura vegetal;
- ✓ O processamento digital revelou que os agregados metálicos ocuparam 0,26% e 1,18% da amostra de bambu impregnada com NPs-Ag-citrato e NPs-Ag-quitosana, respectivamente.
- ✓ Avaliação qualitativa das amostras impregnadas com ambas as NPs-Ag mostraram que as mesmas foram protegidas contra a proliferação de fungos.

7

Trabalhos futuros

- ✓ Analisar o diâmetro hidrodinâmico de ambas as NPs-Ag sintetizadas;
- ✓ Repetir a impregnação de seções do bambu em triplicata, tomando o cuidado de selecionar amostras de uma mesma seção circular transversal, para avaliar a influência da concentração de celulose e lignina na localização e concentração dos agregados metálicos no interior da matriz vegetal;
- ✓ Reproduzir o mesmo procedimento acima com amostras da mesma seção circular transversal com intervalos periódicos ao longo de um ano, com bambu totalmente desenvolvido.
- ✓ Impregnar as seções do bambu com NPs-Ag estabilizadas com carboximetilcelulose (CMC), cuja estrutura polimérica é semelhante à quitosana, porém carregada negativamente, que nos possibilitará entender se a localização preferencial observada pelas placas crivadas é decorrente da carga ou da semelhança de constituintes químicos;
- ✓ Impregnar as seções do bambu com NPs-Ag estabilizadas com um ligante neutro.

ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. Bamboo fibre reinforced biocomposites: A review. **Materials and Design**, v. 42, p. 353–368, 2012.

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Adv.**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.

ALVES, H. et al. Comparison of pore space features by thin sections and X-ray microtomography. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 94, p. 182–190, 2014.

ALVES, H. D. L. **Metodologia de microtomografia computadorizada com dupla energia para caracterização mineralógica de rochas**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

AMENTA, V. et al. Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 463–476, out. 2015.

ANTUNES, A. M. DE S. et al. Trends in Nanotechnology Patents Applied to the Health Sector. **Recente Patents on Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 29–43, 2012.

ANTUNES, F. S. et al. Síntese , caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 20–26, 2013.

ASHOK, P. C. et al. Waveguide confined Raman spectroscopy for microfluidic interrogation. **Lab Chip**, v. 11, n. 7, p. 1262–1270, 2011.

AZZINI, A. Amido a partir de bambu. **Bragantia**, v. 43, n. 1, p. 45–50, 1984.

AZZINI, A.; BERALDO, A. L. Determinação de fibras celulósicas e amido em cavacos laminados de três espécies de bambu gigante. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, n. 57, p. 45–51, 2000.

BANALA, R. R.; NAGATI, V. B.; KARNATI, P. R. Green synthesis and characterization of Carica papaya leaf extract coated silver nanoparticles through X-ray diffraction, electron microscopy and evaluation of bactericidal properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 5, p. 637–644, 2015.

BEER, C. et al. Toxicity of silver nanoparticles — Nanoparticle or silver ion? **Toxicology Letters**, v. 208, n. 3, p. 286–292, 2012.

BERALDO, A.; SETTE, L. D. **Occurrence of filamentous fungi in.**

[s.l.: s.n.].

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–46, 2003.

CARDOSO, C. **Acre possui maior floresta nativa com bambu do mundo**. Disponível em: <<http://www.agencia.ac.gov.br/acre-possui-maior-floresta-nativa-com-bambu-do-mundo/>>. Acesso em: 2 maio. 2016.

CASTANEDA-MENDOZA, A. et al. Carbon accumulation in the aboveground biomass of a *Bambusa oldhami* plantation. **Agrociencia**, v. 39, p. 107–116, 2005.

CLOUTIER, M.; MANTOVANI, D.; ROSEI, F. Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 637–652, nov. 2015.

COCHARD, H.; DELZON, S.; BADEL, E. X-ray microtomography (micro-CT): a reference technology for high-resolution quantification of xylem embolism in trees. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 1, p. 201–206, jan. 2015.

CORREIA, V. D. C. et al. Potential of bamboo organosolv pulp as a reinforcing element in fiber-cement materials. **Construction and Building Materials**, v. 72, p. 65–71, 2014.

CORREIA, V. DA C. et al. Bamboo cellulosic pulp produced by the ethanol/water process for reinforcement applications. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 1, p. 127–135, 2015.

DAHL, J. A.; MADDUX, B. L. S.; HUTCHISON, J. E. Toward greener nanosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2228–2269, 2007.

DE-DEUS, G. et al. Assessing accumulated hard-tissue debris using micro-computed tomography and free software for image processing and analysis. **Journal of endodontics**, v. 40, n. 2, p. 271–6, fev. 2014a.

DE-DEUS, G. et al. Lack of causal relationship between dentinal microcracks and root canal preparation with reciprocation systems. **Journal of endodontics**, v. 40, n. 9, p. 1447–50, set. 2014b.

DESAI, R. et al. Size Distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment. **International Journal of Nanoscience**, p. 121102044327005, 2012.

DÍAZ, C. et al. Nanostructured copper oxides and phosphates from a new solid-state route. **Inorganica Chimica Acta**, v. 377, p. 5–13, 2011.

DONG, X. et al. Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 16, p. 6573–6576, 2009.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, p. 56–62,

2016.

FEI, B. et al. Preparation and Size Characterization of Silver Nanoparticles Produced by Femtosecond Laser Ablation in Water. **Chinese Physics Letters**, v. 25, n. 12, p. 4463–4465, 2008.

FERNANDES, J. S.; APPOLONI, C. R.; FERNANDES, C. P. Determinação de Parâmetros Microestruturais e Reconstrução de Imagens 3-D de Rochas Reservatório por Microtomografia de Raios X. **Revista Ciencias Exatas e Naturais**, v. 11, n. 1, p. 35–47, 2009.

FRIEDMAN, A. J. et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens. **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. 5, p. 1231–9, maio 2013.

FUENTES, C. A. et al. Wetting behaviour and surface properties of technical bamboo fibres. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 380, n. 1–3, p. 89–99, 2011.

FUENTES, C. A. et al. Effect of physical adhesion on mechanical behaviour of bamboo fibre reinforced thermoplastic composites. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 418, p. 7–15, 2013.

FUTURE CHEMISTRY. **Operater's Manual**Alemanha, 2010.

GARCÍA-SERNA, J.; PÉREZ-BARRIGÓN, L.; COCERO, M. J. New trends for design towards sustainability in chemical engineering: Green engineering. **Chemical Engineering Journal**, v. 133, n. 1–3, p. 7–30, 2007.

GHAVAMI, K. Bamboo as reinforcement in structural concrete elements. **Cement and Concrete Composites**, v. 27, n. 6, p. 637–649, 2005.

GHAVAMI, K.; RODRIGUES, C. S.; PACIORNIK, S. Bamboo functionally graded composite material. **Asian Journal Of Civil Engineering**, v. 4, p. 1–10, 2003.

GHOSH, S. K.; PAL, T. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 4797–862, 2007.

GLÓRIA, B. A. DA; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006.

GRITSCH, C. S.; MURPHY, R. J. Ultrastructure of fibre and parenchyma cell walls during early stages of culm development in *Dendrocalamus asper*. **Annals of Botany**, v. 95, n. 4, p. 619–629, 2005.

GROUP, B. P. Bamboo Science & Culture. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 25, p. 56, 2012.

HAISS, W. et al. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 2007.

HARRINGTON, B. J.; HAGEAGE, G. J.; ABMM, D. Calcofluor White : A Review of its Uses and Applications in Clinical Mycology and Parasitology. **Laboratorymedicine**, v. 34, n. 5, p. 361–367, 2003.

HEBEL, D. E. et al. Process-controlled optimization of the tensile strength of bamboo fiber composites for structural applications. **Composites Part B: Engineering**, v. 67, n. October 2013, p. 125–131, 2014.

JANG, M.; LEE, S.; HWANG, Y. S. Characterization of Silver Nanoparticles under Environmentally Relevant Conditions Using Asymmetrical Flow Field-Flow. **Plos One**, v. 17, p. 1–13, 2015.

Jl, Z. et al. Distribution of lignin and cellulose in compression wood tracheids of *Pinus yunnanensis* determined by fluorescence microscopy and confocal Raman microscopy. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 212–217, 2013.

JIN, C. et al. Silver mirror reaction as an approach to construct a durable, robust superhydrophobic surface of bamboo timber with high conductivity. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 635, p. 300–306, jun. 2015a.

JIN, C. et al. Fabrication, superhydrophobicity, and microwave absorbing properties of the magnetic γ -Fe₂O₃/bamboo composites. **Materials & Design**, v. 85, p. 205–210, nov. 2015b.

JYOTI, K.; BAUNTHIYAL, M.; SINGH, A. Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, 2015.

KASPROWICZ, M. J.; KOZIOŁ, M.; GORCZYCA, A. The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. **Canadian journal of microbiology**, v. 56, n. March, p. 247–253, 2010.

KETCHAM, R. A; CARLSON, W. D. Acquisition, optimization and interpretation of {X}-ray computed tomography imagery: applications to the geosciences. **Computers & Geosciences**, v. 27, p. 381–400, 2001.

KIM, I.-Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 1, p. 1–21, jan. 2008.

KIM, S. et al. Chitosan. In: KÜHTREIBER, W. M.; LANZA MD, R. P.; CHICK MD, W. L. (Eds.). **Cell Encapsulation Technology and Therapeutics**. 1. ed. [s.l.] Birkhäuser Boston, 1999. p. 450.

KIM, S. W. et al. An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 760–764, 2009.

KIM, S. W. et al. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 40, n. 1, p. 53–58, 2012.

KIMBERLY-CLARK, P. **Produtos GreenHarvest**. Disponível em:

<<http://www.kcprofessional.com/sustainability/greenharvest-products>>. Acesso em: 25 maio. 2016.

KRITHIGA, N.; JAYACHITRA, A.; RAJALAKSHMI, A. Synthesis , characterization and analysis of the effect of copper oxide nanoparticles in biological systems. **Indian Journal of NanoScience**, v. 1, n. 1, p. 6–15, 2013.

LABORDA, F. et al. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 904, p. 10–32, 2016.

LI, J. et al. Fabrication of superhydrophobic bamboo timber based on an anatase TiO₂ film for acid rain protection and flame retardancy. **RSC Adv.**, v. 5, n. 76, p. 62265–62272, 2015.

LI, J. **Nanostructured Biomaterials**. China: Springer International Publishing, 2015. v. 1

LI, J. et al. Wet chemical synthesis of ZnO nanocoating on the surface of bamboo timber with improved mould-resistance. **Journal of Saudi Chemical Society**, jan. 2016.

LIESE, W. Anatomy and properties of bamboo. **Bamboo Workshop Hangzhou**, p. 196–393, 1985.

LIESE, W. **The anatomy Bamboo culms**. ESTADOS UNIDOS DA AMERICA: BROCHURA, 1998.

LIMA, I. et al. Caracterização De Materiais Cerâmicos Através Da Microtomografia Computadorizada 3D. **Revista Brasileira de Arqueometria Restauração Conservação**, v. 1, n. 2, p. 22–27, 2007.

LIMA, T. H. DE. **Modificação do cimento ortopédico com nanopartículas de prata**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

LONG, H. et al. 3D quantification of mineral components and porosity distribution in Westphalian C sandstone by microfocus X-ray computed tomography. **Sedimentary Geology**, v. 220, n. 1–2, p. 116–125, set. 2009.

LÓPEZ, O. H. **Bamboo, The Gift of the Gods**. 1. ed. Colombia: Bogotá, 2003.

MACHADO, A. H. L. et al. Micro reatores: Novas oportunidades em síntese química. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 4, p. 1076–1085, 2014.

MALL, I. D.; SRIVASTAVA, V. C.; AGARWAL, N. K. Adsorptive removal of Auramine-O: Kinetic and equilibrium study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, n. 1, p. 386–395, 2007.

MARIA, F. et al. Caracterização Anatômica e Física do Bambu Gigante (*Dendrocalamus giganteus* Munro). **Floresta e Ambiente**, p. 8, 2015.

MARINHO, N. P. et al. *Dendrocalamus giganteus*). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 2, p. 413–418, 2012.

MARINHO, N. P. **Características das fibras do bambu (dendrocalamus giganteus) e potencial de aplicação em painéis de fibra de média densidade (MDF)**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2012.

MARINHO, N. P.; NISGOSKI, S.; DE MUÑIZ, G. I. B. Avaliação das dimensões das fibras de colmos de bambu, *Dendrocalamus giganteus* (Wall) Munro, em diferentes idades. **Ciencia Florestal**, v. 24, n. 1, p. 251–256, 2014.

MENDES, S. P. et al. A Case of Male Sterility in the Endangered Endemic Species *Pitcairnia encholirioides* L.B.Sm. (Bromeliaceae) of Brazilian Atlantic Forest Inselbergs. **International Journal of Plant Sciences**, v. 177, n. 6, p. 1–13, 2016.

MIE, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. **Annalen der Physik**, v. 330, n. 3, p. 377–445, 1908.

MOHANAN, C. **Diseases of bamboos in Asia: an illustrated manual**. New Delhi: International Network for Bamboo and Rattan (INBAR), 1997.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções reagentes e solventes; padronização, preparação e purificação**. 2. ed. São Paulo: [s.n.].

NASCIMENTO, A. M. DO; LÚCIA, R. M. DELLA. Estrutura do colmo do Bambu gigante (*Dendrocalamus giganteus* (wall) Munro.). **Floresta e Ambiente**, v. 2, p. 10, 1995.

NAVARRO, C. I. T. **Caracterização Microestrutural das Fibras Naturais: Etlingera elatior, Costus e Helicônia bihai**. [s.l.] Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2011.

NETO, J. M. D. R. et al. A microtomografia computadorizada de raios x integrada à petrografia no estudo tridimensional de porosidade em rochas. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 41, n. 3, p. 498–508, 2011.

NETO, L. G.; GIANNETTI, B. F. **Advances in Cleaner Production, Proceedings of the 2nd International Workshop**. (Universidade Paulista, Ed.) Contabilidade dos Fluxos de CO₂ em uma Plantação Comercial de Bambu Visando a Produção Papeleira. **Anais...** São Paulo: 2009 Disponível em: <http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sessoes/4b/1/l.ghelmandi_netto_-_resumo_exp.pdf>

OGAWA, K.; OKA, M.; YUI, T. X-Ray study of chitosan transition-metal complexes. **Chemical Materials**, v. 5, p. 726–728, 1993.

OLIVEIRA, A. R. DE F. **Desenvolvimento de um microscópio confocal de varredura laser para**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2012.

PADOVANI, G. C. et al. Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 621–636, nov. 2015.

PANDA, H. **Bamboo Plantation and Utilization Handbook**. [s.l.] Asia Pacific Business Press Inc, 2011.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PENG, H. et al. Physicochemical characterization of hemicelluloses from bamboo (*Phyllostachys pubescens* Mazel) stem. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 41–50, 2012.

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, São Paulo: Canal6, 2007.

PETICA, A. et al. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. **Materials Science and Engineering: B**, v. 152, n. 1–3, p. 22–27, ago. 2008.

PINTO, R. J. B. et al. Antifungal activity of transparent nanocomposite thin films of pullulan and silver against *Aspergillus niger*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 143–148, 2013.

PRADO, A. G. S. QUÍMICA VERDE, OS DESAFIOS DA QUÍMICA DO NOVO MILÊNIO. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738–744, 2003.

PRATES, E. M. B. **Morfologia externa e anatomia do colmo de dendrocalamus asper (poaceae: bambusoideae) em duas localidades no distrito federal , brasil** eduarda maria bhering prates. [s.l.] Universidade de Brasília, 2013.

PRIMO, E. N. et al. Dispersion of bamboo type multi-wall carbon nanotubes in calf-thymus double stranded DNA. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 329–336, 2013.

PULIT, J. et al. Nanosilver against fungi. Silver nanoparticles as an effective biocidal factor. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 795–798, 2013.

RAM, A. F. J.; KLIS, F. M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2253–2256, 2006.

RAPOSO, R. C. F. **Nanoestruturas Orgânicas Anfífilas: Síntese e Caracterização**. [s.l.] faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa, 2013.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

RAZERA, I. A. T. **Fibras lignocelulósicas como agente de reforço de compósitos de matriz fenólica e lignofeólica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.

ROCKWELL, C. A. et al. Logging in bamboo-dominated forests in southwestern Amazonia: Caveats and opportunities for smallholder forest management. **Forest Ecology and Management**, v. 315, p. 202–210, 2014.

ROMANI, E. C. **Fabricação e caracterização óptica e morfológica de nanopartículas de ouro em substrato vítreo**. [s.l.] Pontifícia

Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2011.

ROSE, J. K. C. **The Plant Cell Wall**. 1. ed. Canadá: CRC Press LLC, 2003.

SABA, N.; TAHIR, P. M.; JAWAID, M. A review on potentiality of nano filler/natural fiber filled polymer hybrid composites. **Polymers**, v. 6, n. 8, p. 2247–2273, 2014.

SABNANI, C.; LATKAR, M.; SHARMA, U. Can bamboo replace steel as reinforcement in concrete, for the key structural elements in a low cost house, designed for the urban poor? **International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS) Vol**, v. 1, n. 2, p. 257–262, 2013.

SANTI, T. O Papel. **Monthly Journal Of Pulp And Paper Technologies**, v. 4, p. 14, 2015.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.

SHANG, J.; GAO, X. Nanoparticle Counting: Towards Accurate Determination of the Molar Concentration. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 21, p. 7267–7278, 2014.

SHEN, Q. et al. Surface properties of bamboo fiber and a comparison with cotton linter fibers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 35, n. 3–4, p. 193–195, 2004.

SHRIVER, D.; ATKINS, P. **Química Inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

SIGMA ALDRICH. **Sodium citrate tribasic hydrate**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/25114?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 1 nov. 2016.

SILVA, L. F. **Aquisição, processamento e análise de imagens 3D: MicroTC e FIB-SEM na caracterização de defeitos em solda molhada**. [s.l.] Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2014.

SITI, S. et al. Bamboo Based Biocomposites Material, Design and Applications. In: MASTAI, Y. (Ed.). **Materials Science - Advanced Topics**. [s.l.] InTech, 2013. p. 560.

SOUZA, R. O. R. M.; MIRANDA, L. S. M. Reações sob fluxo contínuo: Da química verde a um processo verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 34–43, 2014.

TAN, S. C. et al. The degree of deacetylation of chitosan: Advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, n. 4, p. 713–719, 1998.

TIBURTINO, R. F. et al. Resistência De Duas Espécies De Bambu Tratadas Contra Fungos Xilófagos. **Revista Árvore**, v. 39, n. 3, p. 567–574, 2015a.

TIBURTINO, R. F. et al. Tratamento preservativo de duas espécies de bambu por imersão prolongada e boucherie modificado. **Floresta e**

Ambiente, v. 22, n. 1, p. 124–133, 2015b.

TOMAZELLO FILHO, M.; AZZINI, A. Estrutura anatomica, dimensoes das fibras e densidade basica de colmos de Bambusa vulgaris Schrad. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 36, n. Agosto, p. 43–50, 1987.

UN COMTRADE DATABASE. **Overview of International Trade of Bamboo and Rattan Products**. Disponível em: <http://www.inbar.int/sites/default/files/Trade_Report_2013-EN-A4.pdf>. Acesso em: 25 maio. 2016.

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA. **Estrutura da célula vegetal**. Disponível em: <http://www.passeiweb.com/na_ponta_lingua/sala_de_aula/biologia/biologia_vegetal/celula_vegetal/celula_vegetal>.

USMAN, M. S. et al. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4467–4479, 2013.

WANG, L.-S. et al. Synthesis and anti-fungal effect of silver nanoparticles-chitosan composite particles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 2685–2696, 2015.

WILHELM, S. et al. **Confocal Laser Scanning Microscopy Principles**. Disponível em: <<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/referencelibrary/laserconfocal.html>>.

WRIEDT, T. Mie Theory: A Review. In: HERGERT, W.; WRIEDT, T. (Eds.). **The Mie Theory Basics and Applications**. 14. ed. Berlin: Springer, 2012. p. 259.

YASIN, S.; LIU, L.; YAO, J. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Bamboo Leaves Extract and Their Antimicrobial Activity. **Journal of Fiber Bioengineering and Informatics**, v. 1, n. March, p. 77–84, 2013.

YOUSSEFIAN, S.; RAHBAR, N. Molecular Origin of Strength and Stiffness in Bamboo Fibrils. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11116, 2015.

YU, Y. et al. Surface functionalization of bamboo with nanostructured ZnO. **Wood Science and Technology**, v. 46, n. 4, p. 781–790, 18 jul. 2012.

YUE, J. et al. Microreactors with integrated UV/Vis spectroscopic detection for online process analysis under segmented flow. **Lab on a chip**, v. 13, n. 24, p. 4855–63, 2013.

ZAKIKHANI, P. et al. Extraction and preparation of bamboo fibre-reinforced composites. **Materials and Design**, v. 63, p. 820–828, 2014.

ZHANG, F. et al. Application of silver nanoparticles to cotton fabric as an antibacterial textile finish. **Fibers and Polymers**, v. 10, n. 4, p. 496–501, 2009.

ZHU, Z. et al. Electrocatalytic activity of Pt nanoparticles on bamboo

shaped carbon nanotubes for ethanol oxidation. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 28, p. 8517–8520, 2010.

Apêndice

Espectroscopia no Infravermelho (IV) das Nanopartículas de Prata

As moléculas possuem $(3N-6)$ ou $(3N-5)$ graus de liberdade vibracionais dependendo da geometria da molécula. As ligações químicas possuem modos vibracionais característicos, do tipo estiramento ou deformação angular. Cada vibração ou dobramento apresenta uma frequência característica em função de diferentes fatores: constante de força da ligação, massas atômicas dos átomos envolvidos na ligação, solvente e as interações intermoleculares molécula-molécula ou molécula-solvente.

As vibrações das ligações químicas, quando apresentam um momento dipolo flutuante diferente de zero, absorvem radiação eletromagnética na região do infravermelho, a qual está compreendida numa faixa de λ entre 2,5 μm a 25 μm , ou número de onda ($\tilde{\nu}$) entre 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . A variação do campo elétrico associado ao momento dipolo elétrico da ligação gera uma frequência de oscilação que entra em ressonância com o campo elétrico da radiação eletromagnética incidente. A absorção da energia da luz incidente, de acordo com a frequência de vibração intrínseca da ligação em exame, é detectada pelo equipamento FT-IR (infravermelho por transformada de Fourier, do inglês, FT-IR-Fourier transform infrared spectroscopy). O resultado é um espectro com bandas vibracionais com $\tilde{\nu}$ específicos, que representam os modos vibracionais das ligações que compõem a molécula, ou complexo, em análise. Somente ligações com variação de momento dipolo podem absorver radiação na região do infravermelho. Quanto maior for a variação do momento dipolo, maior será a intensidade da banda vibracional associada a ligação em exame. Por convenção, a radiação eletromagnética na região do infravermelho é referida em termos de $\tilde{\nu}$, que é obtida através da equação 5:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad 5$$

Então $\tilde{\nu}$ maiores significam λ menores, frequência e energias maiores. O $\tilde{\nu}$ em que a vibração ocorre está relacionado com a força da ligação e massa dos átomos envolvidos pela equação 6, onde K representa a constante de força da ligação, c é a velocidade da luz e μ^* é a massa reduzida dada pela equação 7.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad 6$$

$$\mu^* = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad 7$$

Neste sentido, quanto maior for k, a ligação absorverá radiação em $\tilde{\nu}$ maiores, e o contrário ocorrerá com a massa dos átomos envolvidos na ligação, ou seja, quanto maior for a massa atômica, menor será a frequência de vibração e por isso a mesma absorverá em menores $\tilde{\nu}$.

Preparo da solução de quitosana – 10 g/L

Inicialmente, analisou-se o grau de desacetilação da quitosana de acordo com a metodologia proposta por (TAN et al., 1998), obtendo-se o valor médio de 75%. Em seguida, preparou-se uma solução concentrada, pulverizando-se lentamente 0,75 g do polímero em um béquer contendo 20 mL de solução de ácido acético a 1%(v/v), em agitação a 1400 rpm e temperatura a 80°C. Após a dispersão completa da quitosana, retirou-se o sistema do aquecimento e adicionou-se 10 mL de água ultrapura, mantendo-o sob agitação. Quando o sistema atingiu a temperatura

ambiente, transferiu-se quantitativamente a mistura para um balão volumétrico de 50,00 mL e avolumou-se com água ultrapura, obtendo-se uma solução de quitosana a 15 g L. Desta solução concentrada, transferiu-se uma alíquota de 6.665 mL para um balão volumétrico de 10,00 mL e avolumou-se com água ultrapura, resultando na solução de quitosana a 10 g L⁻¹.

Artigo publicado

Key Engineering Materials
ISSN: 1662-9795, Vol. 668, pp 86-91
doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.668.86
© 2016 Trans Tech Publications, Switzerland

Submitted: 2015-05-06
Accepted: 2015-06-09
Online: 2015-10-13

Synthesis Of Silver Nanoparticles With Potential Antifungal Activity For Bamboo Treatment

Omar Pandoli^{1,a}, Fatima Ventura Pereira-Meirelles¹,
Eric Monteiro Lobo Lobo Luz¹, Aline Assumpção¹,
Raquel dos Santos Martins¹, Tommaso del Rosso², Khosrow Ghavami^{3,b}

¹ Department of Chemistry, Universidade Pontifícia Católica, Rio de Janeiro, Brazil

² Department of Physics, Universidade Pontifícia Católica, Rio de Janeiro, Brazil

³ FZEA/USP-Pirassununga, Universidade Pontifícia Católica, Rio de Janeiro, Brazil

^aomarpandoli@puc-rio.br, ^bghavami@puc-rio.br

Keywords: silver nanoparticle, flow chemistry, antifungal activity, bamboo

Abstract. To increase the durability of bamboo it is important to find an easy method to fill the micro and meso structure of the biological matrix using a nano-structural material with an antifungal activity. A colloidal solution of silver nanoparticle (Ag-NPs) is a dispersion of metal nanoparticle in water with a diameter between 5-100 nm. Even if the biological mechanism is not completely understood yet, Ag-NPs show a satisfactory bactericidal and antifungal activity. We present a simple and rapid production of Ag-NPs made by a sol-gel synthesis in flow mode by means of microreactor technology through a chemical reduction of AgNO₃ with NaBH₄ in presence of two different organic ligands: sodium/potassium tartrate and trisodium citrate. The synthesis of Ag-NPs in continuous flow compared to the batch technique allowed to reduce the time of synthesis, facilitating the reproducibility of the process and consequently obtaining NPs with more uniform physical and chemical characteristics. The microorganisms of the genus *Aspergillus* were used for the microbiological tests. The effect of different Ag-NPs on microbial growth was observed daily. In particular, it was shown that the response of the fungus is inversely proportional to the size of the nanoparticles, cell growth is disrupted depending on the proportion between silver and organic ligand and microbial static effect, especially in relation to sporulation stage was also observed.

Introduction

In the current global scenario, there has been a constant search for alternative sources of energy in order to preserve the environment and by avoiding generating harmful waste. The introduction of bamboo to substitute industrial materials are of great social and economic importance. Bamboo is a plant with unique mechanical properties in terms of strength and hardness [1]. Highly resistant and malleable, bamboo presents the high stiffness and strength-to-weight ratio compared to any wood [2]. It is known that the mechanical properties are attributed to its fibres [3]. Specific Bamboo species, being a fast-growing and eco-friendly natural resource is an excellent material that can be used in different areas of engineering aiming at the use for sustainable practices. The textile industry leverage the pulp of bamboo and turn it into cloth, and through that produce clothes in general. In civil industry, bamboo is extremely valuable due to its low cost production, handling and disposal and due to its fast growth rate which generates biodegradable waste. Its replacement for steel in concrete has been considered in civil construction due to its strength. Besides its application in furniture, objects, entertainment products like skateboards, and decorating materials. However, the great drawback of the use of bamboo is its durability. Being an organic material, it is also subject to several types of degradation, mainly the attack of microorganisms. Thus, the applicability and versatility of bamboo is reduced [1].

A proposal to address this issue is to use "engineering bamboo", where the bamboo matrix is filled with nanostructures material to improve the physical, chemical and mechanical properties.

All rights reserved. No part of contents of this paper may be reproduced or transmitted in any form or by any means without the written permission of Trans Tech Publications, www.ttp.net. (ID: 139.82.70.177-22/02/16,21:46:16)

Among the studies reported, we can mention bamboo pulp with ZnO Nanoparticle to enhance the antimicrobial activity and ultraviolet protective property of bamboo [4], and durable bamboo rayon grafted with silver nanoparticle [5]. For the textile industry the new research into antimicrobial fiber technologies have become important where silver nanoparticles are used to modify cotton fibers and protect them against microbial attack [6, 7, 8]. The silver nanoparticles, due to their size, can pass through the cell membrane of microorganism being oxidized within the cell and causing the same irreparable damage. This behavior was observed in fungi [9, 10] and bacteria [11, 12]. Therefore, nanoparticles with smaller diameter have a better inhibitor performance solving microbial attacks. The fungus *Fusarium solani*, which attacks the bamboo, when tested with silver nanoparticles, showed an inhibition rate of approximately 80%. This result promises the same performance of the front nanoparticles for other fungi [10]. In this paper the experiments were performed with a strain of the fungus *Aspergillus niger*, which although it is not an usual precursor of fungus diseases in bamboos, it shows high resistance to traditional fungicides. Therefore, it was chosen for preliminary tests to analyze the performance of the nanoparticles synthesized homemade. The synthesis of Ag-NPs in batch processes and continuous flow micro-reactors [13] were performed changing two organic ligands (sodium citrate and tartrate of sodium and potassium) in different proportions with the aim to increase the rate of inhibition of the fungus growth.

Materials and Methods. Silver nitrate (AgNO_3 , >99.9% pure), sodium borohydride (NaBH_4 , >99% pure), and trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{Citrate}$, > 99% pure), were purchased from Sigma Aldrich (Brazil). Tartrate of sodium and potassium (NaK Tartrate , >99.9% pure), was purchased from Isomar (Brazil). All reagents supplied were of analytical grade and used without further purification. Double deionized (DI) water with a measured resistivity of $18.2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$ was used to make all the solutions for the desired reactions. For the synthesis of silver nanoparticle in flow mode two syringe pumps were used, purchased from Future Chemistry, and one glass micro reactor from Micronit. The syringe pumps are able to inject the solutions of silver precursor and organic ligand into the micro Chanel devise to improve the mixing and a formation of the organic-metal complex in a real short time compared with the batch mode. PFA (perfluoroalkoxyalkane) tube and PEEK (polyetheretherketone) connection, purchased from Upchurch, were used to inject the two solutions into the micro reactor with $6 \mu\text{L}$ internal volume. The antifungal experiments were carried out using *Aspergillus niger*. The fungus was obtained from the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, (UFRRJ). Sabouraud medium from Micromed was used for evaluating fungi growth.

Synthesis of silver nanoparticles. Silver nanoparticles (Ag-NPs) were synthesized employing sodium borohydride as reduction agent, and two organic ligands, $\text{Na}_3\text{Citrate}$, and NaK Tartrate , as stabilizers. Both ligands have, respectively, three and two carboxylate groups whom are able to complex silver ion (Ag^+) at first step of organic-metal complex formation. At the second step, during the formation of silver metal nanoparticle, they acted as capping agents to prevent the aggregation of Ag-NPs. The reduction process, in batch and flow mode, always carried out at room temperature with a molar ratio $\text{NaBH}_4 : \text{AgNO}_3$ of 2:1. In batch mode, an AgNO_3 solution ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) was mixed with an individual organic ligand ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) for a minimum of 3 hours in a 10 mL glass vial under stirring. Then the mixed solution of $\text{Ag}^+ : \text{Ligand}$, at different molar ratio (1:1, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10), was added drop - wise into a fresh NaBH_4 solution ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) under vigorous stirring. For the other case, in flow mode reaction, an AgNO_3 solution ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) was mixed with an individual organic ligand ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) into a glass micro reactor system. The two solutions were injected by means of two syringe pumps at different flow rate to obtain different molar ratio between $\text{Ag}^+ : \text{Ligand}$. Depending on the flow rate injection ($0.25 - 1.0 \text{ mL/min}$), the resident time of the solution was between 0.015 sec and 0.036 sec . The $\text{Ag}^+ : \text{Ligand}$ complex flowing out from the micro reactor dropped directly into the fresh NaBH_4 solution ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) under vigorous stirring. The synthesis in flow mode was concluded in a few minutes, instead of 3 hours of the batch mode. After one day, the suspended nanoparticles was analyzed (Table 1) with UV-VIS

spectrophotometer (Perkin-Elmer 950 lambda). No further purification was carried out for the anti-fungal test.

Microbiological assays. In microbiological tests, the microorganisms of the genus *Aspergillus* were used as test agent. *Aspergillus niger* was cultivated on Sabouroud (S) or potato-dextrose-agar (PDA) medium during 48-72h at 37°C. Then, it was inoculated on Petri dishes containing different silver nanoparticles, as previously described [14]. The plates were incubated at 37°C in the presence of the Ag-NPs and the microbial growth was observed daily until 72 hours. For the microbiological assays two strategies were used and the results are summarized on table 2 and table 3. In the first case (table 2) 100 µL of colloidal solution of Ag-NP was spread on the plates with inoculated *Aspergillus niger*. In the second case (Table 3) circular filter paper with 5 mm of diameter was soaked in to a colloidal solution and placed in the center of the Petri dishes.

Results and Discussion

A diluted colloidal solution of silver nanoparticles was analyzed with a UV-VIS spectrophotometer and the size of the nanoparticle was estimated by the empirical equation (1) [15-16]. The relation between the diameter of the silver nanoparticles and the absorption maximum is given by the following relation, in which D is the particle diameter in nm and λ_{max} is the maximum wavelength of the Surface Plasmon Resonance (SPR) band of the nanoparticles in nm:

$$D = -0,005441 \lambda_{max}^2 + 5,654 \lambda_{max} - 1367 \quad (1)$$

The validity of the calculated empirical diameter value of Ag-NPs, showed in table 1 was confirmed by a Scanning Electron Microscopy analysis (SEM, JEOL, Japan). In figure 1 is shown the SEM image for a colloidal solution R8.

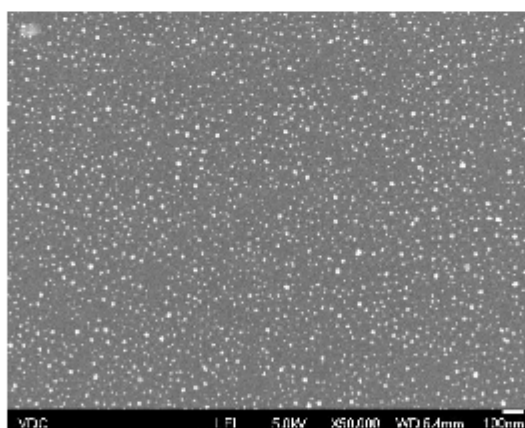


Fig. 1, SEM image of Ag-NPs (R8) with 100 nm bare.

Table 1. Different Size Silver Nanoparticles

Sample of Ag-NPs	Synthesis mode	Ligand	Ag ⁺ /Ligand	Abs	λ_{max} [nm]	Diameter [nm]
R1	Batch	Na ₃ Citrate	1:1	0.68	402.6	27.4
R2	Batch	Na ₃ Citrate	1:4	0.77	403.1	28.0
R3	Batch	Na ₃ Citrate	1:6	0.69	405.8	31.4
R4	Batch	Na ₃ Citrate	1:8	0.81	405.6	31.2

R5	Batch	Na ₃ Citrate	1:10	0.76	417.2	44.8
R6	Batch	NaKTartrate	1:1	0.92	402.2	26.8
R7	Batch	NaKTartrate	1:10	0.84	405.4	30.9
R8	Flow	NaKTartrate	1:1	0.54	397.6	20.9
R9	Flow	Na ₃ Citrate	1:1	0.60	393.0	48.5
R10	Flow	Na ₃ Citrate	1:1	0.55	420.6	14.6
R11	Flow	Na ₃ Citrate	1:2	0.50	400.1	24.2

Microbiological tests were developed in duplicate and the results are presented in table 2 and table 3. It is worth mentioning that fungus can grow with different forms according to the medium and environmental conditions. The cell form can be seen in white while the black/slightly green color can be seen during sporulation. Table 2 presents fungus behavior in the presence of 100 μ L of colloidal solution of silver nanoparticles synthesized in batch condition with different molar ratio between Ag^+ and organic ligand (Na₃ citrate and NaK tartrate). In the first column the results of the control experiments without Ag-NP can be seen.

The effect on the ligand coated/silver nanoparticles on *Aspergillus* growth and sporulation is noticed. It can be observed that the higher is the amount of citrate ligand the higher is the stimulation of both, the growth and the sporulation of the fungi. With a colloidal solution of Ag-NPs synthesized from Ag^+ : citrate 1:1 to 1:8 molar ratio, at the first 24h, growth population was slightly inhibited. At 48h a sporulation was stimulated on plates containing Ag-NP synthesized with Ag^+ :citrate 1:6 to 1:10 molar ratio. From 48-72h all the plates present a similar sporulation pattern (data not shown).


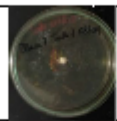






Table 2: Effect of different sized Ag-NPs synthesized in batch condition with different molar ratio of Ag^+ /Ligand (Na₃ citrate or NaK tartrate) on *Aspergillus* behavior.

	Control	Ag^+ / Na ₃ Citrate					Ag^+ / NaK Tartrate	
		1:1	1:4	1:6	1:8	1:10	1:1	1:10
		R1 d=27.4nm	R2 d=28.0nm	R3 d=31.4nm	R4 d=31.2nm	R5 d=44.8nm	R6 d=26.8nm	R7 d=30.9nm
24h								
48h								

Silver nanoparticles prepared in the presence of different molar ratio between Ag^+ and organic ligands, were also tested. For both Na₃Citrate and NaK Tartrate the proportion of Ag^+ : Ligand 1:1 during the synthesis seems to be the most adequate to inhibit the growth of fungi. Particularly, it was clearly seen that the growth was inhibited during the first 24h, while sporulation of the fungi were inhibited for at least 48h. This could be in consequence of the smaller diameter of Ag-NP obtained in this conditions [10, 12]. To confirm the Ag-NPs action on fungus growth, the only effect of the organic ligand was analyzed in the presence of the microorganism. In all the cases the microbiological tests had the same behaviour of the control without any change. In this case the importance of the Ag-NPs to influence the fungus growth was assessed.

Table 3 presents the fungus behavior with different silver nanoparticles soaked in 5 mm paper filter. Here, the relation between Ag^+ and ligand (citrate or tartrate) used in the continuous flow synthesis experiments was changed according to the flow rate injection of the silver precursor and organic ligand as shown in table 3.

Table 3: Effect of Ag-NP synthesised in flow mode under different relations of Ag^+ :ligand (citrate or tartrate) on *Aspergillus* behavior

Ligand	NaK Tartrate	Ag^+ / Na_3 Citrate		
Ag^+ : Ligand	1:1	1:1	1:1	1:2
Flow Rate Ag^+ : Ligand [mL/min]	1:1	0,5:0,5	1:1	0,5:1
Control	R8 d=20.9 nm	R9 d=48.5 nm	R10 d=14.6 nm	R11 d=24.2 nm
24h				
72h				

At the first 24hs, it can be observed, by the absence of white cells into the Petri dishes that the fungus did not grow up. On the other hand, at 72h the growth was re-established and the typical sporulation halo appeared around the paper soaked with Ag-NP. This effect is more significant in the experiments R8 and R10, respectively, with particle size $d=20.9$ nm and $d=14.6$ nm.

It is worth noting that also in batch condition (Table 2) the Ag-NP with the smallest diameter, R1 with $d=27.4$ nm and R6 with $d=26.8$ nm, showed the best inhibition effect on the fungus growth.

Summary

Aspergillus present different behavior in the presence of different sized silver nanoparticles. Ag-NP affects cell growth and sporulation by different ways. In summary, the response of the fungus is inversely proportional to the size of the nanoparticles and cell growth is disrupted depending on the proportion between silver and organic ligand. In particular, with smaller quantity of organic ligand and smaller sized Ag-NP a higher inhibition of growth fungus was shown. The smallest sized Ag-NPs, obtained respectively, in batch mode (R1 e R6) and in flow mode (R8 and R10) showed the most adequate inhibition of fungus growth.

The synthesis with microreactor device shows to be the best control of the process parameters, such as, flow rate, resident and mixing time, which allow fast reaction and good reproducibility of smaller sized silver nanoparticles compared with the batch mode reaction.

The next step of our study will be to focus on testing the Ag-NPs with a specific filamentous fungi isolated from a Brazilian giant bamboo *Dendrocalamus Giganteus* Munro [17].

Acknowledgement

We gratefully acknowledge the Agency FAPERJ and CNPQ for funding the research and the scholarship of the master student R.M and the undergraduate student E.L. (PIBIT).

References:

- [1] K. Ghavami, Bamboo as reinforcement in structural concrete elements, *Cement & Concrete Composites*. 27 (2005) 637–649.
- [2] Information on <http://www.wood-database.com/lumber-identification/monocots/bamboo/>
- [3] L. Zou, H. Jin, W.Y. Lu, X. Li, Nanoscale structural and mechanical characterization of the cell wall of bamboo fibbers, *Materials Science and Engineering C*. 29 (2009) 1375–1379.
- [4] G. Zhang, Y. Liu, H. Morikawa, Y. Chen, Application of ZnO nanoparticles to enhance the antimicrobial activity and ultraviolet protective property of bamboo pulp fabric, *Cellulose*. 20 (2013) 1877–1884.
- [5] M. D. Teli, J. Sheikh, Study Of Grafted Silver Nanoparticle Containing Durable Antibacterial Bamboo Rayon, *Cellulose Chem. Technol.* 47 (2013) 69–75.
- [6] H. Mucha, D. Hoter, M. Swerev, *Antimicrobial Finishes and Modifications*, Eds. Melland International, (2002) cap 8 pp.148-151.
- [7] F. Z. Hang, X. Wu, Y. Chen, A. H. Lin, Application of Silver Nanoparticles to Cotton Fabric as an Antibacterial Textile Finish, *Fibers And Polymers*. 10 (2009) 496-501.
- [8] K. Kulthong, S. Srisung, K. Boonpavanitchakul, W. Kangwansupamonkon, R. Maniratanachote, Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat, *Particle and Fibre Toxicology*. 7 (2010) 8-16. doi: 10.1186/1743-8977-7-
- [9] K. S. Woo, K. S. Kim, K. Lamsal, Y. J. Kim, S. B. Kim, M. Jung, S. J. Sim, H. S. Kim, S.J. Chang, J. K. Kim, Y. S. Lee, An In Vitro Study Of The Antifungal Effect Of Silver Nanoparticles On Oak Wilt Pathogen *Raffaelea* Sp., *J. Microbiol. Biotechnol.* 19 (2009) 760–764.
- [10] S. W. Kim, J. H. Jung, K. Lamsal, Y. S. Kim, J. S. Min, Y. S. Lee, Antifungal Effects Of Silver Nanoparticles Against Various Plant Pathogenic Fungi, *Mycobiology*. 40 (2012) 53-58.
- [11] Z. M. Xiu, Q. B. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, P. J. J. Alvarez, Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity Of Silver Nanoparticles, *Nano Lett.* 12 (2012) 4271–4275.
- [12] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy, *RSC Adv.* 4 (2014) 3974–3983.
- [13] A. H. L. Machado, O. Pandoli, L. S. M. Miranda, R. O. M. A. de Souza, Micro Reatores: Novas Oportunidades em Síntese Química, *Revista Virtual Quím.*, 6 (2014) 1076-1085.
- [14] A. B. Vermelho, A. F. Pereira, R. R. R. Coelho, *Práticas de Microbiologia* 1ª ed. Rio de Janeiro Editora Guanabara Kogran (Grupo Gen) 2006.
- [15] Flow chemistry practical course, 2nd edition, (2011) Information on www.futurechemistry.com
- [16] D. Rucha, V. Mankad, S. K. Gupta, P. K. Jha, Size Distribution of Silver Nanoparticles: UV-Visible Spectroscopic Assessment, *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 4 (2012) 30-35.
- [17] R. G. da Silva, A. L. Beraldo, M. B. Ferreira, R. C. Bonugli-Santos, L. D. Sette, Occurrence of filamentous fungi on *Dendrocalamus Giganteus* in Brazil, VIII World Bamboo Congress Proceedings, information on <http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/index.html>

Non-Conventional Materials and Technologies for Sustainable Development
10.4028/www.scientific.net/KEM.668

Synthesis of Silver Nanoparticles with Potential Antifungal Activity for Bamboo Treatment
10.4028/www.scientific.net/KEM.668.86

DOI References

- [1] K. Ghavami, Bamboo as reinforcement in structural concrete elements, *Cement & Concrete Composites*. 27 (2005) 637-649.
10.1016/j.cemconcomp.2004.06.002
- [3] L. Zou, H. Jin, W.Y. Lu, X. Li, Nanoscale structural and mechanical characterization of the cell wall of bamboo fibers, *Materials Science and Engineering C*. 29 (2009) 1375-1379.
10.1016/j.msec.2008.11.007
- [4] G. Zhang, Y. Liu, H. Morikawa, Y. Chen, Application of ZnO nanoparticles to enhance the antimicrobial activity and ultraviolet protective property of bamboo pulp fabric, *Cellulose*. 20 (2013) 1877-1884.
10.1007/s10570-013-9979-2
- [7] F. Z. Hang, X. Wu, Y. Chen, A. H. Lin, Application of Silver Nanoparticles to Cotton Fabric as an Antibacterial Textile Finish, *Fibers And Polymers*. 10 (2009) 496-501.
10.1007/s12221-009-0496-8
- [8] K. Kulthong, S. Srisung, K. Boonpavanitchakul, W. Kangwansupamonkon, R. Maniratanachote, Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat, *Particle and Fibre Toxicology*. 7 (2010).
10.1186/1743-8977-7-8
- [9] K. S. Woo, K. S. Kim, K. Lamsal, Y. J. Kim, S. B. Kim, M. Jung, S. J. Sim, H. S. Kim, S.J. Chang, J. K. Kim, Y. S. Lee, An In Vitro Study Of The Antifungal Effect Of Silver Nanoparticles On Oak Wilt Pathogen *Raffaelea* Sp., *J. Microbiol. Biotechnol*. 19 (2009).
10.5423/rpd.2011.17.2.136
- [10] S. W. Kim, J. H. Jung, K. Lamsal, Y. S. Kim, J. S. Min, Y. S. Lee, Antifungal Effects Of Silver Nanoparticles Against Various Plant Pathogenic Fungi, *Mycobiology*. 40 (2012) 53-58.
10.5941/myco.2012.40.1.053
- [11] Z. M. Xiu, Q. B. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, P. J. J. Alvarez, Negligible Particle Specific Antibacterial Activity Of Silver Nanoparticles, *Nano Lett*. 12 (2012) 4271-4275.
10.1021/nl301934w
- [12] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy, *RSC Adv*. 4 (2014) 3974 -3983.
10.1039/c3ra44507k
- [16] D. Rucha, V. Mankad, S. K. Gupta, P. K. Jha, Size Distribution of Silver Nanoparticles: UVVisible Spectroscopic Assessment, *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 4 (2012) 30-35.
10.1166/nnl.2012.1278