



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0714227-7 A2**

(22) Data de Depósito: 05/07/2007
(43) Data da Publicação: 29/01/2013
(RPI 2195)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 3/00

(54) **Título:** MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

(30) **Prioridade Unionista:** 30/11/2006 GB 06 23925.5, 05/07/2006 US 60/818,579, 05/07/2006 US 60/818,579, 30/11/2006 GB 06 23925.5

(73) **Titular(es):** Janssen Pharmaceutica N.V.

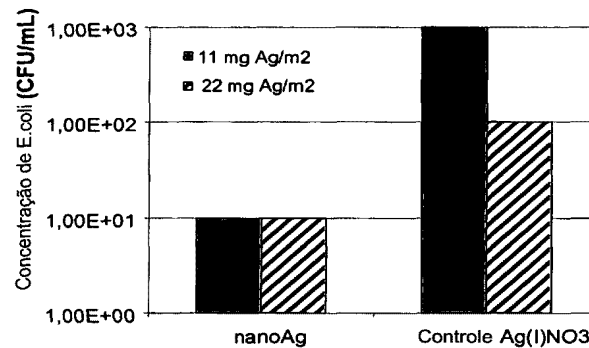
(72) **Inventor(es):** Tom Vercauteren, Willy Verstraete, Wim de Windt

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007006145 de 05/07/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/003522de 10/01/2008

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS. A presente invenção refere-se a um método para a produção de uma composição compreendendo nanopartículas coloidais de metais incluindo prata, ouro, zinco, mercúrio, cobre, paládio, platina, ou bismuto, produzidas pelo contato de um metal ou composto metálico com bactérias. Uma modalidade do método compreende uma etapa de incubação de bactérias probióticas com uma solução aquosa compreendendo pelo menos 4 mM de um sal de prata ou de ouro. Uma composição resultante de nanop prata é útil como um agente antimicrobiano altamente eficiente, por exemplo quando impregnado sobre um veículo, ou como um agente algicida ou como um agente herbicida.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**".

CAMPO DA INVENÇÃO.

5 A presente invenção refere-se à produção de compostos metálicos coloidais em uma membrana bacteriana. A presente invenção também refere-se a métodos para a produção de partículas de prata ou de ouro de nanodimensão por meio de um processo biológico. Em particular, a presente invenção se refere ao uso de bactérias probióticas tal como existem, mas não se limitando a, *Lactobacillus* sob condições específicas para a produção
10 de nanoprecipitados metálicos, em particular nanopartículas de prata ou de ouro com um objetivo de melhorar a sua eficiência antimicrobiana. A presente invenção também se refere à desinfecção de produtos incluindo um veículo impregnado por uma composição compreendendo nanopartículas de prata ou nano-ouro coloidais produzidos pelo dito método.

15 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO.

Processos eficazes de desinfecção são necessários para o tratamento de grandes quantidades de materiais poluídos, tais como água, especialmente águas domiciliares e águas de circulação industrial e efluentes aquosos (tais como aqueles que estão presentes na indústria de processamento de gêneros alimentícios) contendo microorganismos que não podem ser descarregados ou reutilizados sem tratamento por razões higiênicas, operacionais ou ambientais. Os processos eficazes de desinfecção são também necessários para o tratamento de superfícies, tais como em ambientes, equipamentos, reservatórios, sistemas de condicionamento de ar e similares.
20 Os processos de desinfecção ambientalmente compatíveis estão principalmente baseados no uso de compostos com oxigênio ativo, tais como peróxido de hidrogênio, ou compostos monoméricos de amônio quaternário.

O peróxido de hidrogênio é um desinfetante moderadamente ativo, brando com propriedades bactericidas. Conhece-se que concentrações de peróxido de hidrogênio de 25 mg/L inibem o crescimento de algumas bactérias, entretanto uma redução eficaz da contagem de germes, mesmo em uma concentração de peróxido de hidrogênio muito mais eleva-
30

da, ou leva muitas horas ou necessita de radiação ultravioleta adicional. As últimas gerações, entretanto, necessitam tanto de um equipamento oneroso como de gastos substanciais de eletricidade. Por isso, a desinfecção de grandes quantidades de materiais poluídos, tais como água, por exemplo, para o tratamento de água em instalações de esgotos e as suas produções, tais medidas são praticamente inadequadas e/ou antieconômicas. Por isso, vários modos de superar estas desvantagens já foram tentados na técnica.

Conhece-se bem na técnica que os íons de prata e os compostos a base de prata são altamente tóxicos aos microorganismos, mostrando por isso fortes efeitos bactericidas contra muitas espécies comuns de bactérias incluindo a *Escherichia coli*. Também foi mostrado que os híbridos de nanopartículas de prata com macromoléculas anfifílicas hiper-ramificadas exibem revestimentos de superfície antimicrobianos eficazes. Encontrou-se que dispersões aquosas estáveis de nanopartículas de prata na forma de hidrossóis não-tóxicos de prata elementar mostraram-se fortemente bactericidas contra a *E. coli*, uma concentração de $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ causaram uma inibição de 100 % do crescimento bacteriano. Encontrou-se que as nanopartículas de prata se acumulam nas membranas bacterianas e de algum modo interagem com certos elementos de construção da membrana bacteriana, causando assim modificações estruturais, degradação e, finalmente, a morte da célula. Tem sido relatado em geral que a superfície das bactérias seja negativamente carregada, em valores biológicos de pH, devido à dissociação de um número excessivo de grupos carboxílicos e outros grupos na membrana. Foi sugerido que as nanopartículas de prata introduzidas na matriz de carbono da membrana gere uma carga superficial devido ao seu movimento e fricção dentro da matriz e as forças eletrostáticas deste modo poderiam ser uma causa da interação das nanopartículas com as bactérias. Além disso, a prata tenderá a ter uma afinidade mais elevada para reagir com compostos de fósforo e enxofre contidos na membrana bacteriana mas também no DNA. Um terceiro modo possível da ação é a liberação de íons de prata que podem também contribuir para o efeito bactericida das nanopartículas de prata.

Várias espécies de microorganismos, por exemplo, *Lactobacillus sp.* e o fungo *Fusarium oxysporum*, foram mostrados como biosorvendo a Ag(I) para a sua superfície celular e desintoxicando esse íon pela redução a Ag(0), ou pela ação da redutase ou por quinonas liberadoras de elétrons, ou por ambas.

Uma formulação antimicrobiana não citotóxica compreendendo nanopartículas de prata biologicamente estabilizadas com um tamanho variando de 1 nm a 100 nm e um veículo no qual a concentração de nanopartículas de prata biologicamente estabilizadas, acima citadas, varia de 1 ppm a 6 ppm já é conhecida na técnica.

Também é conhecido um método para preparação de um complexo de biomolécula de prata coloidal compreendendo:

- o fornecimento de uma mistura de uma biomolécula, um sal de prata e uma fonte de íons haleto em uma solução única; e
- irradiar a mistura com uma luz possuindo um comprimento de onda na região do visível, em que o sal de prata e a fonte de íons haleto são solúveis em água; as quantidades da biomolécula, do sal de prata e da fonte de íons haleto são tais que, a etapa de irradiação resulta na formação de complexos de biomolécula e prata coloidal.

Também foi descrito um processo para a preparação de partículas metálicas coloidais com nanodimensão, o dito processo compreendendo o tratamento do fungo molhado ou do extrato de fungo com uma solução de íons metálicos em uma faixa de temperatura variando de 15°C a 40°C durante um período de tempo variando entre 2 horas e 120 horas e separando a biomassa para obter as partículas metálicas coloidais com nanodimensão.

Os métodos convencionais de produção para produção das nanopartículas de prata possuem diversas desvantagens, tais como altos preços de produção, a produção de uma proporção significativa de subprodutos, ou a existência de um limite superior para a concentração das nanopartículas obtidas. Por exemplo o método de produção mais recente necessita de um tempo de produção significativamente mais elevado e está baseado na utilização de um fungo que pode ser patogênico. Por isso, existe uma ne-

cessidade na técnica por um método para produzir nanopartículas de prata que seja confiável, barato e reduza ou evite a formação de subprodutos.

Um processo para biosorção da Ag(I) por meio de *Lactobacillus*, a sua dependência do pH em uma faixa de variação de pH de 2 a 6 e a sua dependência de uma faixa de temperatura variando de 10°C a 60°C, bem como o mecanismo de redução da Ag⁺ a Ag⁰ pelo *Lactobacillus*, também já foi estudado.

Também é conhecido na técnica um processo para o preparo de nanopartículas de prata por biorredução utilizando *Aeromonas sp.*, em uma mistura com íons de prata, amônia e hidróxido de sódio, a 60°C durante umas duas horas.

Os processos acima mencionados sofrem de desvantagens tais como temperatura elevada, pH ácido e/ou alto tempo de incubação necessário, ou uma atividade bactericida insuficiente das nanopartículas de prata resultantes dos mesmos.

Existe, assim, uma necessidade na técnica para a produção de nanopartículas de prata ou de ouro por um método que esteja livre dessas desvantagens.

Existe também na técnica uma necessidade por um método simples, favorável ao ambiente e reprodutível para a produção de nanopartículas de prata ou de ouro com elevadas propriedades antimicrobianas.

Existe também uma necessidade na técnica de um método correspondente para a produção nanopartículas de prata ou de ouro que sejam conhecidos por serem úteis em determinadas aplicações médicas.

As formas coloidais de metais diferentes de ouro ou prata e os compostos dos ditos metais, também são conhecidas na técnica por possuírem propriedades e aplicações valiosas. Por exemplo, o subcitrato de bismuto coloidal é solúvel em água especialmente em um pH variando de aproximadamente 3 a 8 e foi utilizado por décadas para o tratamento de úlceras gástricas e duodenais e a infecção por *Helicobacter pylori* em conjunto com antibióticos. As formas coloidais de mercúrio, compostos de mercúrio inorgânicos e pomadas de mercúrio metálico foram usados topicamente para

vários usos terapêuticos incluindo o tratamento de eczema infeccionado ou impetigo (sais de mercúrio), o tratamento da sífilis (calomel), o tratamento da psoríase (óxido mercúrico ou mercúrio amoniado). As formas coloidais de paládio e platina foram usadas como catalisadores de várias reações químicas incluindo reações orgânicas de redução e hidrogenólise e similares. As nanopartículas de platina na forma de coloidal também são conhecidas como agentes anticâncer. O cobre coloidal, opcionalmente quelado com o ácido salicílico, é um forte agente anti-inflamatório e as formas sublinguais de cobre coloidal ou zinco coloidal são conhecidas como sendo ativas na luta contra o resfriado e a influenza. Também, o zinco coloidal pode ser especialmente eficaz contra vírus. Em todos estes vários campos há uma necessidade permanente de se fornecer formas físicas alternativas dos metais coloidais ou dos compostos metálicos coloidais de modo a melhorar a sua eficiência nos seus campos relevantes de aplicação.

15 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Na sua expressão mais ampla, a presente invenção se refere ao uso de bactérias para a produção de compostos metálicos coloidais na membrana bacteriana e o uso subsequente das bactérias revestidas como um agente antimicrobiano. Em particular a presente invenção se refere ao:

- 20 • Uso de bactérias para a produção de compostos de metal coloidal contactando as ditas bactérias com uma mistura de sais metálicos e outros sais, sob um pH controlado fazendo com que as bactérias produzam compostos metálicos coloidais sobre sua membrana, e
- 25 • Uso das bactérias acima citadas revestidas com compostos metálicos nas suas membranas como um agente antimicrobiano.

Em uma modalidade a presente invenção se refere à produção de nanoprecipitados metálicos por probióticas e outras bactérias que podem ser usados como um agente antimicrobiano na água potável, em revestimentos de superfícies e outros materiais.

30 Mais especificamente algumas bactérias podem reduzir os sais de Ag(I) à Ag(0) coloidal que se precipita como nanopartículas de Ag na superfície da célula. A biomassa coberta da prata coloidal, ou de outros nano-

precipitados metálicos, pode ser facilmente colhida de uma fase aquosa pela filtração ou centrifugação, pode ser lavada e enxaguada e também processada e fornece um produto coloidal com fortes propriedades antimicrobianas, tanto em suspensão (diluída) como quando processada em revestimentos.

5 De maneira interessante uma série de bactérias probióticas, isto é, bactérias que são produzidas industrialmente devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana quando elas estão presentes no trato digestivo humano, demonstra esta capacidade de produzir Nanoprecipitados de Ag na sua superfície celular. Estas bactérias incluem, mas não são limitadas a, ce-
10 pas de *Lactobacillus* probióticos de fermentação.

Pela adição de uma combinação específica de sais (AgNO_3 , NH_4Cl , NaOH e outros) a uma cultura concentrada de células de bactérias e controlando o pH, um produto de prata coloidal é formado com fortes propriedades antimicrobianas. Outros sais metálicos combinados com certas ce-
15 pas bacterianas resulta em nanoprecipitados com propriedades similares e isto é também parte da presente invenção.

Pelo ajuste da proporção "massa de prata" para "massa de células biológicas" (Ag:CDW, com CDW = peso seco de células), a reatividade e as propriedades do produto coloidal final de prata podem ser variadas, quan-
20 to a tamanho da partícula coloidal, a distribuição de tamanhos da partícula coloidal e outras propriedades das mesmas.

Os compostos de prata coloidal produzidos na superfície das bactérias possuem uma faixa de variação muito ampla de aplicações, consistindo em mas não limitados a: desinfecção de água, uso como agente desinfetante em produtos de limpeza, como agente de limpeza, formulação
25 em revestimentos antimicrobianos, aplicações médicas, consumo humano, uso em tecido, aplicação em pomadas e lubrificantes, como um catalisador, etc.

O processo de produção é direto, com eficiência de custos, tem
30 um alto rendimento e pode ser facilmente ampliado na escala, o tamanho e a distribuição das partículas podem ser controlados e a reatividade antimicrobiana da nanoprata produzida supera outros produtos de prata coloidal em

concentrações muito baixas (ppb). Além disso, o produto pode ser processado sob formas diferentes: seco, na forma de suspensão ou como pélete "molhada", ele pode ser formulado em diferentes aplicações. Nenhum resíduo de reagentes químicos está presente no produto final, já que pode ser enxaguado com água pura sem a perda da atividade.

O uso de bactérias probióticas abre muitas aplicações em cuidado de saúde e na indústria alimentícia. O produto das bactérias revestidas de Ag seria em particular adequado para as seguintes aplicações:

- Formulação de produtos de limpeza e desinfecção (hospitais, laboratórios, terrenos para criação de animais e outros);
- Aplicação em filtros de cerâmica ou outros filtros para desinfecção de água, o mesmo para a água potável, água de piscinas, água de criação de animais, água de germinação de aquacultura e muitos outros;
- Aplicação em desinfecção de revestimentos: polímeros, fibras têxteis, metais;
- Conveniente para formulação de pomadas para desinfecção da pele, lubrificantes, etc.;
- Aplicações para desinfetar a água potável: nos países em desenvolvimento, mochileiros, aviões e muitos outros (método de baixa fácil) e
- Combate a agentes patogênicos: *Legionella*, *Cryptosporidium*, Hepatite, Herpes, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, tipos diferentes de bactérias, fungos e vírus.

Um objetivo da presente invenção é fornecer as nanopartículas de prata ou de ouro da boa qualidade. É um primeiro aspecto da presente invenção a fornecer um método biológico melhorado para a produção de uma composição compreendendo nanopartículas coloidais de prata ou de ouro, o dito método compreendendo o uso de bactérias probióticas, em particular uma espécie *Lactobacillus*, tais como *Lactobacillus fermentum* e contactando a dita biomassa com uma solução aquosa de um sal de prata (I) ou um sal de ouro (III). A presente invenção está baseada no achado inesperado de que certos parâmetros de processo específicos para a produção de nanopartículas de prata ou de ouro por biorredução afetam muito a eficiência

de produção e as características das nanopartículas resultantes. Em particular os métodos específicos da presente invenção afetam muito a atividade antimicrobiana de uma composição resultante compreendendo as nanopartículas de prata.

5 É um outro aspecto da presente invenção que a composição de nanopartículas de prata e de ouro obtida por biorredução sob essas condições específicas podem ser também processadas, por exemplo, separadas da biomassa, enquanto mantém ou mesmo também melhora suas atividades ou outras propriedades relevantes, tais como estabilidade durante o armazenamento. Alternativamente um pós-tratamento químico, por exemplo, por 10 meio de espécies oxidantes, tal como um peróxido ou um persal, de uma composição de nanopartículas de ouro ou de prata obtidas por biorredução sob essas condições específicas pode mesmo melhorar as propriedades da composição resultante de nanopartículas.

15 É também uma vantagem do processo de acordo com a presente invenção que o tamanho e a distribuição das nanopartículas de prata ou de ouro resultantes possam ser controlados de um modo reprodutível.

 É também uma vantagem da presente invenção que o dito método atinge um resultado altamente confiável dentro de significativamente 20 pouco tempo, com baixo custo e de um modo favorável ao ambiente, reduzindo a necessidade de produtos químicos potencialmente tóxicos e/ou onerosos. Nenhum resíduo perigoso de reagentes químicos é deixado na composição resultante do método de acordo com a presente invenção, em ampla escala já que a biomassa usada se origina de um microorganismo inofensivo, por exemplo, um probiótico. Desse modo, é uma vantagem da presente 25 invenção que o método forneça uma composição que, durante a aplicação com organismos eucarióticos, não afete substancialmente tais organismos. Em uma modalidade específica, a presente invenção fornece uma composição com elevada atividade antimicrobiana que também trabalha contra agentes patogênicos marinhos, sem afetar substancialmente os organismos eu- 30 carióticos. É uma vantagem adicional da presente invenção que a mesma permita a produção de uma composição compreendendo a nanopartícula de prata ou o

nano-ouro em uma alta concentração como tal e compreendendo a nanoprta ou o nano-ouro compostos substancialmente por prata ou ouro nos seus estados metálicos respectivamente, por exemplo compreendendo mais do que aproximadamente 95 % de Ag^0 no teor total de prata ou mais do que
5 aproximadamente 95 % de Au^0 no teor total de ouro respectivamente.

É uma outra vantagem da presente invenção que o produto ou a composição resultantes possam ser processados facilmente e de modo seguro mantendo ou até melhorando a sua atividade. A composição pode ser seca, ou mantida na forma de suspensão ou como uma pélete molhada e
10 podem ser formuladas sob formas diferentes, tais como formulações de aerossol ou impregnação sobre um veículo, sem afetar a atividade antimicrobiológica devido à estabilidade das partículas de nanoprta.

Em ainda outra modalidade, a presente invenção se refere ao uso de uma composição de prata coloidal produzida de acordo com o método supracitado como um algicida ou agente herbicida.
15

DEFINIÇÕES.

Os termos "nanoprta" ou "nano-Ag" tal como aqui utilizados para os objetivos da presente invenção se referem às nanopartículas de prata metálica (Ag^0). Dentro do significado da presente invenção, as ditas nanopartículas podem ou não ser depositadas sobre uma biomassa. Essas nanopartículas podem variar de tamanho entre aproximadamente 0,1 nm e aproximadamente 100 nm, por exemplo, dentro de uma faixa de variação de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 5 nm. Essas nanopartículas também podem variar sua distribuição de tamanhos em torno dos seus tamanhos médios.
20
25

Os termos "nano-ouro" ou "nano-Au" tal como aqui utilizados com o objetivo da presente invenção se referem às nanopartículas de ouro metálicos (Au^0). Dentro do significado da presente invenção, as ditas nanopartículas podem ou não ser depositadas sobre uma biomassa. As nanopartículas podem variar no tamanho entre aproximadamente 0,1 nm e aproximadamente 100 nm, por exemplo, dentro de uma faixa de variação de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 5 nm.
30

O termo "biomassa" tal como aqui utilizado com o objetivo da presente invenção se refere ao material orgânico consistindo em, ou derivado de, espécies bacterianas usadas para a produção de "nanoprata" ou "nano-ouro".

5 O termo "bactérias probióticas" tal como aqui utilizado com o objetivo da presente invenção se refere a bactérias que quando administrado em quantidades adequadas a um hospedeiro, tal como um mamífero, uma espécie marinha (por exemplo, um peixe) ou um ser humano, conferem um efeito benéfico sobre a saúde do dito hospedeiro.

10 O termo "prata (I)" ou "Ag(I)" tal como aqui utilizado com o objetivo da presente invenção se refere aos íons de prata monovalentes positivamente carregados ou Ag^+ .

Os termos "ouro (I)" e "ouro (III)" tal como aqui utilizado com o objetivo da presente invenção se refere aos íons de ouro monovalentes ou
15 trivalentes positivamente carregados respectivamente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS.

A figura 1 mostra o efeito antimicrobiano do tratamento com partículas de nanoprata de acordo com uma modalidade da presente invenção em concentrações diferentes da contagem total de células e a sobrevivência
20 de *E. coli*.

A figura 2 mostra o espectro de análise por difração de RAIOS X de partículas de nanoprata de acordo com uma modalidade da presente invenção.

A figura 3 mostra o efeito da proporção de prata para o peso seco de célula durante a produção de partículas de nanoprata de acordo com
25 uma modalidade da presente invenção para a atividade antimicrobiana das ditas partículas contra a *Salmonella typhimurium*.

A figura 4 mostra o espectro de análise por difração de raios-X de partículas de nanoprata de acordo com outra modalidade da presente
30 invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO.

É um primeiro aspecto da presente invenção fornecer um méto-

do simples para a produção de uma composição compreendendo nanopartículas de prata ou nano-ouro coloidais compreendendo uma etapa de incubação de bactérias probióticas com uma solução aquosa compreendendo pelo menos 4 mM de um sal de prata ou de ouro.

5 De acordo com a presente invenção, as bactérias probióticas convenientes incluem gêneros tais como, mas não limitados a, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* e *Bacillus*. Sem restrição, as bactérias probióticas podem pertencer a uma ou várias das seguintes espécies: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Escherichia coli* Nissle, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus acidophilus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus polyfermenticus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus sporogenes*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus polymyxa*.

20 Para os objetivos de várias modalidades do método de acordo com a presente invenção, qualquer sal de prata solúvel em água pode ser usado. Tal como aqui utilizado, o termo "sal de prata" também abrange hidratos e outros solvatos de tais sais de prata. Tipicamente, um sal de prata solúvel em água pode ser aqui definido como um sal de prata com uma solubilidade em água de pelo menos 0,1 g/L na temperatura da realização do método de acordo com a presente invenção, por exemplo, na temperatura ambiente. Sem restrição, o sal de prata pode ser um sal de prata inorgânico ou um sal de prata orgânico tal como, mas não limitado a, acetato de prata, cloreto de prata, perclorato de prata, clorato de prata, brometo de prata, fluoreto de prata, lactato de prata, nitrato de prata, sulfato de prata ou tartarato de prata.

30 Para os objetivos de várias modalidades do método de acordo

com a presente invenção, qualquer sal de ouro solúvel em água pode ser usado. Tal como aqui utilizado, o termo "sal de ouro" também abrange hidratos e outros solvatos de tais sais de ouro. Tipicamente, um sal de ouro solúvel em água pode ser aqui definido como um sal de ouro com uma solubilidade em água de pelo menos 0,1 g/L na temperatura da realização do método de acordo com a presente invenção, por exemplo, na temperatura ambiente. Sem restrição, o sal de ouro pode ser monovalente ou trivalente. Sem restrição, o sal de ouro pode ser um sal de ouro inorgânico ou um sal de ouro orgânico ou um sal de ouro variado tal como, mas não limitado a, cloreto de ouro(III), tiomalato de sódio e ouro monohidratado, brometo de ouro(III), iodeto de ouro(III) e nitrato de ouro(III).

De acordo com uma modalidade da presente invenção, a concentração inicial de sal de prata ou de ouro na solução aquosa a ser incubada deve estar em pelo menos 4 mM, por exemplo pelo menos 10 mM, ou como um determinado exemplo, em pelo menos 50 mM.

De acordo com outra modalidade da presente invenção, a dita solução aquosa pode compreender também componentes adicionais que sejam suscetíveis a influir no comportamento, em particular melhorar, as propriedades da composição resultante. Neste aspecto, em uma modalidade da presente invenção em que a nanop prata é desejada, o método pode compreender uma etapa de incubação de bactérias probióticas (tal como aqui anteriormente definido) com uma solução aquosa compreendendo pelo menos 4 mM de um sal de prata e também compreendendo amônia e/ou um sal de amônio. Os sais de amônio convenientes para esta modalidade são tais como, mas não limitados a, cloreto de amônio, nitrato de amônio, fosfato de amônio, sulfato de amônio, carbonato de amônio, formiato de amônio e brometo de amônio. A quantidade de sal de amônio e/ou amônia usado nesta modalidade da presente invenção deve ser preferivelmente suficiente para permitir a formação de uma quantidade substancial de um complexo de amônio e prata ou de amônia e prata tal como, mas não limitado a, um complexo de prata (I) e amônia sob a forma de $\text{Ag}(\text{NH}_2)^+$ e/ou $\{\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\}^+$. De acordo com outra variante desta modalidade da presente invenção, a solu-

ção aquosa a ser incubada pode compreender também uma quantidade adequada de um hidróxido de metal alcalino tal como, mas não limitada a, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio. Uma quantidade adequada pode ser definida quanto a uma faixa adequada de pH a ser atingida, como
5 explicado aqui abaixo.

De acordo com outra modalidade da presente invenção, o método compreende uma etapa de incubação de bactérias probióticas (tal como aqui anteriormente definido) com uma solução aquosa compreendendo pelo menos 4 mM de um sal de ouro e também compreendendo uma quantidade
10 adequada de um hidróxido de metal alcalino tal como, mas não limitado a, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio na ausência de amônia e/ou de um sal de amônio.

O hidróxido de metal alcalino adequado tal como, mas não limitado a, hidróxido de sódio e/ou hidróxido de potássio podem ser acrescentados à solução aquosa de incubação em concentrações até aproximadamente
15 1 M. Preferivelmente, a incubação é realizada sob condições tais que o pH seja pelo menos 8, por exemplo, dentro de uma faixa de variação de aproximadamente 8 à aproximadamente 12, ou como uma modalidade mais específica dentro de uma faixa de variação de aproximadamente 8,5 à aproximadamente
20 11.

De acordo com uma modalidade da presente invenção, a proporção ponderal de prata ou peso de ouro para o peso seco de células (daqui por diante abreviado como CDW) das bactérias probióticas é pelo menos aproximadamente 0,01, por exemplo, pelo menos aproximadamente 0,05 ou
25 pelo menos aproximadamente 0,1. De acordo com outra modalidade da presente invenção o Ag:CDW ou a proporção em peso Au/CDW não estão acima de aproximadamente 20, preferivelmente abaixo de aproximadamente 10, por exemplo, abaixo de 5.

De acordo com uma modalidade da presente invenção, a etapa
30 de incubação do método é realizado em uma temperatura de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 45 °C, preferivelmente em uma temperatura de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C, por exemplo na tem-

peratura ambiente.

Conforme outra modalidade da presente invenção, a etapa de incubação do método pode ser realizada durante um período de tempo de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 30 minutos, por exemplo
5 de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 20 minutos. A pessoa versada é capaz de determinar com uma experimentação limitada o período de tempo mais apropriado para a incubação, dependendo de outros parâmetros de processo tais como, mas não limitados a, a concentração de sal de prata ou de ouro, a temperatura de incubação, o Ag:CDW ou a proporção
10 em peso Au/CDW, a presença ou a ausência de amônia ou de um sal de amônio e similares. Tal como já é convencional na técnica, a incubação pode ser realizada sob agitação durante pelo menos uma parte do tempo de incubação.

O método de acordo com a presente invenção também pode
15 compreender uma etapa de processamento adicional da composição resultante compreendendo nanopartículas coloidais de prata ou de ouro. O dito processamento adicional pode compreender uma ou várias etapas tal como, mas não limitado a, a remoção de pelo menos a parte da biomassa das nanopartículas de prata ou de ouro ou fracionamento da biomassa por meio de
20 tratamento mecânico, enzimático e/ou fisicoquímico, por exemplo, por ultrassom. Cada uma das tais remoções de biomassa ou métodos de fracionamento são bem conhecidos aos versados na técnica. Alternativamente, ou adicionalmente, o dito processamento pode incluir uma etapa de tratamento químico de estabilização ou até de melhoria de certas propriedades desejáveis da composição resultante compreendendo nanopartículas coloidais de
25 prata ou de ouro. Como uma particular modalidade de tal processamento químico, uma composição de nanopartículas de ouro ou de prata de acordo com a presente invenção pode ser tratada depois da incubação e opcionalmente com a remoção da biomassa, com um agente de oxidação, tal como
30 um peróxido ou um persal de modo a produzir um precipitado de nanopartículas de prata ou de ouro com uma estabilidade melhorada e/ou (em relação à nanoprata) com uma atividade antimicrobiana mais elevada. Dentro desta

modalidade da presente invenção, o peróxido orgânico e inorgânico adequado inclui, mas não é limitado a, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e similares. Persais adequados para o uso nesta modalidade da presente invenção incluem, mas não são limitados a, sais alcalinos solúveis em água que são capazes de formar o peróxido de hidrogênio pela dissociação, por exemplo, quando tais sais são dissolvidos em água, um íon de peróxido é liberado. Exemplos adequados disso incluem percarbonatos, perboratos, persilicatos e perfosfatos associado com um cátion, tal como um metal alcalino. Especialmente preferido é o percarbonato de sódio possuindo a fórmula empírica $2\text{Na}_2\text{CO}_3, 3 \text{H}_2\text{O}_2$. Em suporte a esta modalidade da presente invenção, a pessoa versada sabe que:

- Tais persais podem ser superiores ao peróxido de hidrogênio quanto à capacidade de desinfecção,
- O peróxido de hidrogênio é um desinfetante fraco e tem uma pobre permeabilidade em bactérias e
- Quando um persal é dissolvido em água e libera o peróxido de hidrogênio, o sal alcalino extrai um próton do peróxido de hidrogênio liberado formando o íon de hidroperóxido que, em contraste com o peróxido de hidrogênio, é um desinfetante forte e é prontamente permeável às bactérias.

Em qualquer momento do processo da presente invenção, a porção sólida compreendendo a nanop prata ou o nano-ouro coloidais pode ser separada da porção líquida por qualquer método bem conhecido pela pessoa versada. Por exemplo, pode ser separado por centrifugação e subsequente decantação da fração líquida, ou por filtração.

No método de acordo com a presente invenção, pelo menos um sal de prata ou de ouro pode ser em parte substituído com um sal de cobre ajustando cuidadosamente uma ou várias das condições operacionais da reação tal como, mas não limitado a, pH, temperatura de incubação, tipo de sal e concentração do sal. No método de acordo com a presente invenção, espécies de bactérias probióticas também podem ser pelo menos em parte substituídas com microorganismos ou bactérias alternativos ajustando cuidadosamente uma ou várias condições operacionais da reação tais como,

mas não limitado a, pH, temperatura de incubação, tipo de sal e concentração (ouro ou prata) do sal. Tais bactérias alternativas podem ser selecionadas do grupo consistindo em bactérias que são geralmente consideradas como seguras ao ambiente, mais especificamente aquelas bactérias conhecidas por possuírem uma capacidade biorredutora.

Embora o método de acordo com a presente invenção tenha sido principalmente descrito aqui em relação à prata e ouro, ele não está limitado aos mesmos, mas como mencionado na sua expressão mais ampla é também aplicável a outros metais ou compostos metálicos, contanto que uma ou mais condições operacionais da reação tais como, mas não limitado a, pH, temperatura de incubação, tipo de sal e concentração de sal, sejam apropriadamente adaptadas. Tal adaptação está dentro dos limites da experiência regular da pessoa versada, considerando os ensinamentos gerais aqui incorporados. Os metais de interesse especial dentro do alcance da presente invenção incluem o zinco, o mercúrio, o cobre, o paládio, a platina e o bismuto.

Um segundo aspecto da presente invenção é um uso antimicrobiano de uma composição de nanop prata produzida pelo método acima descrito, baseado no achado inesperado de que uma concentração eficaz de tal composição de nanop prata em um tratamento antimicrobiano pode ser excepcionalmente baixa, dependendo das bactérias visadas, por exemplo, aproximadamente 0,5 ppm ou mesmo mais baixo, por exemplo aproximadamente 0,05 ppm ou mais baixo e tal como encontrado que uma redução substancial na quantidade de bactérias indesejáveis pode ser observada dentro de um período de tempo limitado, por exemplo, dentro de não mais do que aproximadamente 5 horas. Os alvos bacterianos adequados deste aspecto da presente invenção incluem uma ampla faixa de variação de germes Gram positivos e Gram negativos tais como, mas não limitados a, *Pseudomonas aeruginosa* (por exemplo, cepa CMCM-2-22), *Pseudomonas cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae* (por exemplo, cepa ATCC-10031), *Eschericia coli*, *Streptococcus faecalis* (por exemplo, cepa ATCC-10541), *Staphylococcus cohnii*, *Staphylo-*

coccus aureus (por exemplo, IP 52154 ou cepa ATCC-6538), *Bacillus subtilis* (cepa ATCC-19659) (todas sendo costumeiras cepas bacterianas hospitalares), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Thiobacillus ferrooxidans* (por exemplo, cepa ATCC 13661), *Lactobacilli*, *Thermophilic bacilli*, *Trychophyton interdigitale* (por exemplo, cepa ATCC-640), *Clostridium sporogenes* (cepa ATCC-3584), *Clostridium perfringens* (cepa ATCC-13124), *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e similares. A composição de nanoprata da presente invenção também pode ser ativa contra fungos, incluindo por exemplo *Candida albicans* (por exemplo, cepa APCC-2091) *Mycobacterium smegmatis* (por exemplo, cepa IP 7326), *Aspergillus niger* (por exemplo, cepa IP 218), *Penicillium verrucosum* e similares e também pode ter atividade antiparasítica contra, por exemplo, o *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* e similares.

O uso antimicrobiano (ou antifúngico ou antiparasítico ou antiviral), de acordo com uma modalidade particular da presente invenção, pode ser na forma de uma composição de desinfecção líquida em que uma composição de nanoprata produzida pelos métodos acima descritos pode ser combinada com um segundo agente antimicrobiano ou uma mistura de tais agentes. Os exemplos adequados de um segundo agente antimicrobiano incluem, mas não são limitados a, peróxido de hidrogênio, sais de amônio quaternário, ácido peracético, persais (o último sendo tal como descrito aqui acima em relação ao primeiro aspecto da presente invenção) e misturas dos mesmos em quaisquer proporções conhecidas. Em particular, a dita combinação pode fornecer efeitos sinérgicos para a atividade antimicrobiana.

Em uma modalidade específica, o dito segundo agente antimicrobiano pode ser um agente antimicrobiano de oxidação tal como, mas não limitado a, dióxido de cloro, monocloramina, um hipoclorito, permanganato de potássio, iodo ou cloro. As composições de desinfecção líquidas de acordo com essa modalidade da presente invenção podem incluir também um ou mais estabilizadores, tal como, por exemplo, o ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido bromídrico ou ácido bórico ou misturas dos mesmos, normalmente com o objetivo de ajustar o pH da composição dentro de uma faixa de va-

riação adequada para o manejo e o uso. Entre estabilizadores ácidos inorgânicos, o ácido fosfórico é especialmente preferido. Na prática, o estabilizador ácido acima citado pode já estar comumente incorporado em uma quantidade adequada no peróxido de hidrogênio em um grau comercialmente disponível. O estabilizador opcionalmente usado na presente invenção também pode ser um ácido carboxílico orgânico, tal como ácido tartárico, ácido cítrico (ou um hidrato dos mesmos), ácido benzóico, ácido picolínico, ácido nicotínico e ácido isonicotínico. As misturas de ácidos inorgânicos e orgânicos podem ser consideradas também com esta finalidade. Os estabilizadores acima citados, quando presentes, estão preferivelmente em uma quantidade eficaz para o ajuste do pH e/ou a estabilidade de armazenamento de longo prazo da composição de desinfecção líquida. Estas composições líquidas de desinfecção da presente invenção também podem incluir pelo menos um componente selecionado do grupo consistindo em tensoativos, inibidores de corrosão e fragrâncias (perfumes).

Tensoativos adequados do uso nas composições de desinfecção da presente invenção incluem por exemplo, mas não são limitados a, compostos ativadores de superfície catiônicos, não-iônicos, anfotéricos e zwitteriônicos, preferivelmente os adequados para o contato com gêneros alimentícios ou água potável na dosagem relevante e misturas de tais compostos. Uma ampla faixa de tensoativos não-iônicos é potencialmente útil aqui. Os exemplos não-restritivos de tensoativos aniônicos incluem, por exemplo, os selecionados do grupo consistindo em glicóis polietoxilados e/ou glicóis polipropoxilados, monoésteres de ácidos graxos C_8 - C_{20} , monopalmitato de sorbitano e similares. Os exemplos específicos de tensoativos anfotéricos adequados incluem o 3-dodecilpropionato de sódio, 3-dodecilaminopropano sulfonato de sódio, N-alquilaaurinas e betaínas.

A composição de desinfecção compreendendo a nanoprata obtida pelo método de acordo com a presente invenção pode ser estabilizada na biomatriz e pode ser aplicada diretamente, ou depois de processamento adicional tal como descrito anteriormente, no ambiente a ser tratado, limpo ou despoluído. Por exemplo, as partículas de nanoprata podem ser dispersas

na, ou em volta da, posição onde as bactérias tenham de ser retiradas por qualquer meio ou pela aplicação de métodos adequados. O componente nanop prata da composição é capaz de interagir com os componentes da célula das bactérias, efetivamente assim destruindo-os e reduzindo o número de células bacterianas totais a um nível admissível.

O uso de uma composição líquida contendo nanop prata tal como descrito acima pode ser para limpeza, descontaminação, desinfecção ou esterilização de uma superfície sólida ou de um volume de um gás ou um líquido. Quando a composição dita líquida de acordo com a presente invenção é usada como uma composição de desinfecção ou esterilização (por exemplo, pela dispersão em um líquido ou em um gás), ela é tipicamente aplicada em condições apropriadas, incluindo concentrações e tempo de aplicação, que a pessoa versada pode determinar prontamente pelo conhecimento padrão na técnica de desinfecção e esterilização.

Quando a composição líquida de desinfecção contendo nanop prata da presente invenção é aplicada sobre uma superfície sólida, é preferível, pelas regulamentações de segurança, empregar uma formulação diluída pronta para uso obtida misturando uma quantidade adequada de uma composição concentrada com a água e depois umidificando a citada superfície sólida com a formulação diluída obtida durante um determinado tempo até que a umidificação completa da superfície sólida seja realizada (que, como é conhecido da pessoa versada, pode depender da porosidade de superfície).

Como será entendido pelos versados na técnica, a quantidade preferida do líquido de desinfecção contendo a composição de nanop prata a ser usada variará amplamente com o tipo e a quantidade presente de microorganismos na superfície sólida ou presente no líquido ou no gás a serem tratados.

Em relação ao uso acima mencionado, das composições líquidas contendo nanop prata de acordo com a presente invenção, como um desinfetante, os seguintes métodos de aplicação são mais particularmente recomendados:

- Imersão do produto a ser tratado na composição acima citada

contendo nanoprata,

- Borrifo da composição de desinfecção sobre uma superfície sólida a ser tratada e,

5 - Incorporação da composição desinfetante (diluída ou concentrada) na água a ser tratada (particularmente água de piscina, água de processo industrial, águas residuais e similares).

Desse modo, as composições líquidas para desinfecção contendo nanoprata, de acordo com a presente invenção, são particularmente úteis para:

10 (a) Desinfecção e higiene de hospitais e áreas de laboratório, áreas industriais (tais como laticínios a base de leite, laticínios a base de queijo, casas de malte, cervejarias, instalações para a produção de água mineral, vinho, destilados, sucos de frutas e de vegetais; estufas; galinheiros e estábulos; linhas de embalagem de gêneros alimentícios, bebidas ou produtos farmacêuticos; interiores de aeroplanos e barcos) e os conteúdos das
15 ditas áreas, especialmente os equipamentos ou instrumentos dentro das ditas áreas;

(b) Esterilização de ambientes fechados assépticos, tais como incubadoras de animais prematuros ou crescimento de animais livres de
20 substâncias estranhas;

(c) Tratamento para *Legionella* em sistemas de condicionamento de ar;

(d) Desinfecção e higiene de reservatórios de armazenamento (particularmente silos) e dutos para condução de produtos líquidos ou sólidos, tais como gêneros alimentícios (açúcar, chá, café, cereais, bebidas) e
25 alimentação de animal;

(e) Desinfecção e higiene de piscinas e outros equipamentos de banhoterapia (em tal caso a composição será preferivelmente livre de tensoativos);

30 (f) Desinfecção de sistemas de produção, transporte e armazenamento de água potável (por exemplo, em cavidades ou reservatórios de armazenamento), em tal caso a composição será preferivelmente livre de

tensoativos; e

(g) Proteção de colheitas existentes ao ar livre (tais como plantações de cereais, tomates, banana, culturas hidropônicas incluindo verduras, sementes, tuberculos e similares), em virtude de suas propriedades bactericidas, fungicidas, antivirais e antiparasíticas.

A alta e seletiva atividade antimicrobiana da composição de nanoprata obtida pelo método de acordo com a presente invenção tem uma ampla faixa de aplicações domiciliares bem como industriais tais como, mas não limitadas a, desinfecção de água, tratamento do crescimento de algas na água, limpeza produto e a formulação de revestimentos antimicrobianos, por exemplo, para o uso em aplicações médicas ou no processamento de nutrientes ou outros materiais para consumo humano ou de animais (particularmente devido à ausência ou por efeitos mínimos sobre células eucarióticas ou organismos), para o uso na proteção antimicrobiana de produtos têxteis, para o uso em preparações médicas tópicas para prevenir contaminações contagiosas ou microbianas de tecidos expostos tais como, mas não limitados a, cremes, pomadas ou loções, ou para uso como catalisadores em processos químicos ou outros processos de transformação. Cada um dos usos supracitados pode ser realizado por meio de nanoprata em suspensão bem como com nanoprata incorporada em polímeros e/ou outros tipos de revestimentos.

Um terceiro aspecto da presente invenção se refere à produção de nanoprecipitados metálicos por bactérias probióticas e outras bactérias que podem ser surpreendentemente usadas como um agente algicida (por exemplo, contra *Chlorella vulgaris*, mas não limitadas a isso) em água potável, aquário ou tanque ou água de piscina, ou em outros reservatórios com água fresca ou água salgada, em polímeros e pinturas, em revestimentos de superfícies e outros materiais para proteger contra incrustações suaves (aspecto estético) ou incrustações pesadas (deterioração de materiais). Um quarto aspecto da presente invenção se refere à produção de nanoprecipitados metálicos por bactérias probióticas e outras bactérias que podem ter um efeito surpreendentemente de herbicida contra certas plantas dicotiledôneas ou

monocotiledôneas ou um efeito contra tipos diferentes de plantas inferiores, como o musgo, tanto na forma diluída em água ou como também nas formas processadas por meios mecânicos, enzimáticos ou fisicoquímicos. A escolha da planta relevante para esta finalidade não é um parâmetro crítico da presente invenção. As plantas adequadas para essa finalidade incluem, entre outras, plantas dicotiledôneas, tais como fumo (*Nicotiana tabacum*), erva de pato (*Lamna sp.*), soja (*Glycine max*), maçã, beterraba, *Arabidopsis thaliana*, alfafa, petúnia, algodão, cenoura, aipo, repolho, pepino, pimentão, canola, tomate, batata, lentilha, linho, brócolis, feijão, alface, mamona, couve-flor, espinafre, couve de bruxelas, alcachofra, ervilha, quiabo, abobrinha, couve galega, couves, chá, café e *Selaginella lepidophylla*. Eles também incluem plantas monocotiledôneas, tais como arroz *Oryza sativa*, milho, cevada, girassol (*Helianthus annuus*), trigo, aveia, painço, sorgo, amaranto, cebola, aspargo e cana de açúcar.

Os aspectos acima mencionados da presente invenção são particularmente úteis nos seguintes campos:

- Inibição do crescimento algínico em água de aquário, em sistemas de distribuição de água potável de animais e seres humanos, em sistemas de distribuição de água para horticultura, em tanques, em piscinas, em sistemas de filtração para tratamento de água de tanques ou piscinas e em tipos diferentes de sistemas de espargimento;

- Inibição de crescimento algínico em superfícies, incluindo superfícies em contato com água, tais como cascos de barco;

- Uso em pinturas, polímeros ou revestimentos para o tratamento de superfícies contra algas, e incluindo o crescimento de algas em superfícies de organismos superiores como plantas;

- Inibição de crescimento de musgo ou outras plantas não desejadas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas, por exposição de folha, tronco, flor ou sistemas de raízes à prata coloidal, por exemplo, prata coloidal produzida por bactérias probióticas e precipitado da mesma de acordo com o método de produção supracitado; e

- Inibição de crescimento de certas plantas ou ervas daninhas

sobre superfícies de revestimento ou de outra maneira expondo estas superfícies à prata coloidal, por exemplo, prata coloidal produzida por bactérias e precipitada sobre as mesmas de acordo com o método de produção supracitado.

- 5 Os seguintes exemplos são fornecidos como uma ilustração, sem qualquer intenção restritiva, de certas modalidades do método e das composições de desinfecção de acordo com a presente invenção.

Exemplo 1: Preparação de nanoprata

Uma cultura de *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901 AL
10 (ATCC 11976, LMG8900, da flora intestinal de um bebê com oito dias de idade com alimentação exclusiva de leite de peito) foi propagada em caldo MRS (comercialmente disponível pela Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) sob condições microaerófilas a 37 °C durante 15 horas. As células foram colhidas do MRS por centrifugação em 3.000 g durante 10 minutos a 15 °C e la-
15 vadas 2 vezes com água milliQ, depois novamente suspensas em água milliQ até uma densidade ótica final de 1,5 at 600 nm (OD_{600}). O hidróxido de sódio de uma solução de estoque de NaOH a 1N foi acrescentado à suspensão de célula, por exemplo, para conseguir concentrações finais de 0,05N de NaOH e 0,10N de NaOH, respectivamente.

20 Uma solução de estoque de Ag(I) com 425 mg de $AgNO_3$ e com 225 mg de NH_4Cl em 50 mL foi preparada com água milliQ. Um volume desta solução de estoque de Ag(I) foi acrescentado a dez volumes da suspensão de célula com 0,05N NaOH e 0,10N NaOH, respectivamente. Permitiu-se que estas misturas incubassem sob luz visível a 25 °C, sob as condições
25 brandas de agitação (100 rotações por minuto na batedeira) durante 30 minutos. Foi obtida uma solução final de 5,0 mM de Ag(0) (535 mg Ag(0)/L) depositada em biomassa de *Lactobacillus fermentum*, aqui referida como "nanoprata" ou "nano-Ag". As células revestidas de *Lactobacillus fermentum* foram centrifugadas e lavadas três vezes com a água milliQ para retirar resí-
30 duos do meio de crescimento e outros aditivos, centrifugada repetidamente, decantanda e ressuspendendo a composição em água milliQ fresca. A concentração final de nano-Ag foi consequentemente ajustada. A composição

então foi diluída com a água milliQ ou concentrada por centrifugação a 3.000 g e ressuspensa em água milliQ de acordo com as necessidades do usuário final.

Exemplo 2: Análise da nanop prata por XRD

5 A análise por difração de raios-x (XRD) da nanop prata da bio-
 massa com as partículas de prata obtidas no exemplo 1 e adicionalmente
 secas a 30°C, foi realizada com um Difratorômetro D5000 Siemens com partes
 óticas da Bragg-Brentano (comercialmente disponível pela Siemens, Muni-
 que, Alemanha). Os raios-x foram gerados por um tubo de raios-x de cobre
 10 com potência de 1,6 quilowatts (40 kV, 40 mA). As medições foram feitas
 entre 25 e 90 graus 2-theta com um tempo "tep" de 1,6 s e um tamanho de
 varredura de 0,02 grau. O espectro resultante (não mostrado) indica a pre-
 sença do modelo de difração de raios-x de prata metálica e óxido de sódio.
 Esse último sendo um resíduo do hidróxido de sódio usado na preparação
 15 da nanop prata.

Exemplo 3: Análise da nanop prata por EDX.

A análise por Energia Dispersiva de Raios-x (EDX) da biomassa
 seca com nanop prata, tal como obtida no exemplo 1 e também seca a 30°C
 foi realizada com um Microscópio por Varedura de Elétrons Elétrons
 20 JSM6100 com detector EDX (disponível pela JEOL USA, Inc) com uma reso-
 lução correspondente a uma energia incidente de 20,0 keV. Os resultados
 de análise são listados na Tabela 1 (tanto como % em peso como em % a-
 tômica) e claramente demonstram a presença principalmente de matéria or-
 gânica (devido ao alto teor de carbono e oxigênio) e prata, a combinação
 25 dos quais importa em aproximadamente 91 % em peso da matéria seca.

O resto do produto seco consistiu em elementos traço Ca, Mg, Si, P, S e Cl na maior parte devido a resíduos minerais da matriz biológica seca.

Tabela 1.

Elemento	% em peso	% atômica
C	55,90 ± 0,28	69,18 ± 0,16
O	26,21 ± 0,08	24,35 ± 0,15

Na	4,97 ± 0,02	3,21 ± 0,00
Mg	0,85 ± 0,06	0,52 ± 0,04
Si	0,19 ± 0,06	0,10 ± 0,03
P	1,64 ± 0,04	0,79 ± 0,02
S	0,22 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Cl	0,31 ± 0,03	0,13 ± 0,014
Ag	8,51 ± 0,20	1,17 ± 0,03
Ca	1,22 ± 0,18	0,45 ± 0,07

Exemplo 4: Atividade antimicrobiana da nanoprata em um meio de crescimento sólido de *Escherichia coli*.

100 mL de uma suspensão de prata com uma concentração de Ag de 5 mM, na forma de nanoprata depositada em biomassa de *Lactobacillus fermentum* tal como obtido no exemplo 1, foram semeados em placa sobre um meio de crescimento sólido para cultivo de *Escherichia coli* (Ágar Luria Bertani). Como um controle, 100 mL de uma solução de AgNO₃ a 5 mM em água milliQ estéril com 0,1N de NaOH foram semeados em placa no mesmo meio de crescimento. Esta colocação concordou com um teor total de 0,05 mg Ag por placa de ágar-ágar, ou 11 mg Ag por m² de área superficial total. Este experimento foi repetido com o dobro das últimas concentrações, isto é com 0,11 mg de Ag por placa de ágar-ágar ou 22 mg de Ag por m² da área superficial total.

Semeando em placa esta suspensão de prata, uma camada homogênea de Ag(I)NO₃, ou nano-Ag respectivamente, foi aplicada sobre o meio de crescimento solidificado.

Depois de pré-tratar o meio de crescimento solidificado desse modo, 100 µL de uma suspensão 2 x 10⁶ CFU/mL de *Escherichia coli* em solução fisiológica (8,5 g NaCl/L em água estéril) foram semeados nas placas de ágar-ágar pré-tratadas. As placas então foram incubadas durante 24 horas a 30°C e as colônias foram contadas. Os resultados da contagem são ilustrados pela figura 1. Em concentrações de nano-Ag de 11 mg e Ag/m² e de 22 mg de Ag/m², nenhuma célula viável de *E. coli* pode ser descoberta no meio de crescimento sólido tratado (<limite de detecção (D.L.) = 1 x 10¹

CFU/mL). Assim o tratamento de nano-Ag nestas concentrações resultou em uma redução de células de *E. coli* de 2×10^6 CFU/mL para menos de 1×10^1 CFU/mL (D.L.). Em concentrações de Ag(I)NO₃ de 11 mg de Ag/m² e 22 mg de Ag/m² houve uma significativa redução das células de *E. coli* de 2×10^6 CFU/mL para 4×10^2 CFU/mL e 1×10^2 CFU/mL, respectivamente.

Como um controle, uma suspensão de *E. coli* com uma concentração de 2×10^6 CFU/mL foi semeada em placa sobre o meio de crescimento não tratado, isto é sem Ag e para o mesmo crescimento meio tratado com 100 µL de água mQ estéril somente com *Lactobacillus fermentum* ATCC 11976, na mesma concentração que o tratamento de nano-Ag, mas sem nano-Ag. Nenhum efeito inibidor foi observado sobre a contagem total destas bactérias.

Conseqüentemente, o efeito inibidor observado para a nanoAg e Ag(I) pode ser atribuído ao tratamento de Ag e não ao procedimento de tratamento ou às cepas de *Lactobacillus* usadas neste experimento.

Exemplo 5: Atividade antimicrobiana em suspensão para diferentes bactérias patogênicas

Foi testada a sobrevivência de culturas patogênicas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* diluídas na solução fisiológica contendo concentrações diferentes (0 mg/L, 0,10 mg/L, 1,0 mg/L, 10 mg/L e 50 mg/L) da composição de nano-Ag obtida no exemplo 1. A NanoAg foi aplicada em uma solução fisiológica contendo uma cultura viva de uma das bactérias patogênicas supracitadas. A solução fisiológica incluiu 8,5 g NaCl por 1 L de água e foi preparada para ter um potencial osmótico neutro através das células bacterianas, não as mantendo assim devido ao estresse osmótico. Os tratamentos de controle foram compostos de uma cultura bacteriana em solução fisiológica na ausência de nano-Ag.

Foi preparada uma solução de estoque de 100 mg nano-Ag/L em água mQ e acrescentada a culturas bacterianas diluídas em solução fisiológica em quantidades adequadas para atingir as concentrações finais de nano-Ag mostradas na Tabela 2.

O tratamento foi repetido independentemente para cada espécie bacteriana patogênica acima mencionada, com a "cultura bacteriana" representando um caldo líquido diluído com as espécies bacterianas na fase de crescimento exponencial, diluída na solução fisiológica para uma concentração de célula final de 10^4 CFU/mL a 10^5 CFU/mL. Cada tratamento foi feito em duplicata. Todas as incubações foram realizadas em tubos de ensaio estéreis, tapados que foram incubados sob agitação a 37 °C durante 72 horas. Depois da incubação, 100 µL de cada tubo de ensaio foram semeados em placa sobre um Ágar-ágar de Soja Trypticase (TSA) o meio de crescimento sólido e as colônias foram contados. Os resultados destas contagens são mostrados na Tabela 2 para diferentes agentes patogênicos testados.

Tabela 2.

Concentração de nano-Ag (mg Ag/L)	Patôgeno (CFU/mL)			
	E.coli	S.aureus	Salmonella	Listeria
0	$1,1 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$
0,10	$4,6 \times 10^1$	1	5	$1,0 \times 10^1$
1,0	0	0	0	2
10	2	0	0	0
50	0	0	0	0

A Tabela 2 mostra que uma concentração de 1 mg/L de nanoAg tal como obtida no exemplo 1 foi suficiente para reduzir o número de células viáveis de *E. coli*, *S. aureus* e *S. typhimurium* dentro de 72 horas a uma concentração de célula <10 CFU/mL (isto é abaixo do limite de detecção). A morte significativa de células já foi observada em uma concentração de 0,10 mg/L. Em relação à *Listeria*, uma redução da concentração de células viáveis abaixo do limite de detecção foi obtida em 10 mg/L nanoAg. Assim concluimos que a nanoAg como obtida no exemplo 1, em concentrações de 1,0 mg/L ou mais baixas na suspensão líquida de células, atuou como um agente antimicrobiano forte que significativamente e efetivamente elimina as bactérias patogênicas viáveis do meio líquido.

Exemplo 6: Atividade antimicrobiana de nano-Ag em suspensão em combinação com *Artemia franciscana*.

Água do mar artificial estéril (Instant Ocean^R, disponível pela Aquarium System, EUA) foi preparada em água milliQ por autoclavação. Todos os tratamentos foram ajustados em alíquotas de 20 mL de água do mar artificial estéril em tubos Falcon de 50 mL. Cada tratamento (realizado em triplicata) foi composto de 20 *Artemia nauplii* axênica em 20 mL de água do mar artificial, complementados com uma combinação de 10⁵ CFU/mL (unidades de formação de colônia) de *Vibrio campbellii* LMG21363 e/ou nano-Ag tal como obtido no exemplo 1 em uma concentração final tal como mostrado na Tabela 3. A bactéria patogênica *V. campbellii* foi assim incubada em conjunto com o seu organismo hospedeiro *Artemia franciscana*. Os seguintes testes foram ajustados:

- *Artemia franciscana* + 10⁵ CFU/mL *Vibrio campbellii*
- 15 - *Artemia franciscana* + 10⁵ CFU/mL *Vibrio campbellii* + 100 mg nanoAg/L
- *Artemia franciscana* + 10⁵ CFU/mL *Vibrio campbellii* + 10 mg nanoAg/L
- 20 - *Artemia franciscana* + 10⁵ CFU/mL *Vibrio campbellii* + 1,0 mg nanoAg/L
- *Artemia franciscana* + 10⁵ CFU/mL *Vibrio campbellii* + 0,1 mg nanoAg/L
- *Artemia franciscana* + 0,10 mg nanoAg/L
- *Artemia franciscana* + 100 mg nanoAg/L
- 25 - *Artemia franciscana* + 10 mg nanoAg/L
- *Artemia franciscana* + 1,0 mg nanoAg/L e
- *Artemia franciscana* + 0,10 mg nanoAg/L

Depois de incubação de 48 horas, a concentração de *V. campbellii* em água do mar artificial estéril com *Artemia franciscana* foi determinada pela contagem em placa com um meio de crescimento específico para *Vibrio*. Os resultados médios do tratamento são mostrados na Tabela 3, abaixo (em que D.L. se refere ao limite de detecção).

Tabela 3.

Concentração de nano-Ag (mg Ag/L)	Sobrevivência da bactéria patogênica <i>Vibrio campbelli</i>
0	$1,0 \times 10^5$ CFU/mL
0,10	$3,0 \times 10^2$ CFU/mL
1,0	$< 10^1$ CFU/mL
10	$< 10^1$ CFU/mL
100	$< 10^1$ CFU/mL

Observou-se também que em concentrações de 0,10 mg/L e 1,0 mg/L de nanoAg, não houve nenhum efeito significativo sobre a taxa de sobrevivência (80 %) de *Artemia franciscana* em comparação com os controles não tratados. Isto indica que a nano-Ag produzida de acordo com o exemplo 1 não tem nenhum efeito tóxico ou inibidor sobre organismos superiores nestas concentrações.

Exemplo 7: Determinação do tempo de contato eficaz para atividade antimicrobiana

O objetivo desse teste foi determinar um tempo de contato adequado da composição de nanoAg do exemplo 1 com culturas bacterianas patogênicas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes* diluídas em solução fisiológica, para obter a atividade antimicrobiana eficaz em concentrações de 0,1 mg/L e 1 mg/L de Ag, respectivamente.

Estas concentrações de nanoAg foram aplicadas a culturas bacterianas em uma solução fisiológica (8,5 g NaCl em 1 L água) preparada para ter um potencial osmótico que neutro em relação às células bacterianas, assim não as matando devido ao estresse osmótico. O tratamento de controle foi composto de uma cultura bacteriana em solução fisiológica sem a composição de nano-Ag.

Uma solução de estoque de 100 mg nanoAg/L em água mQ foi preparada e acrescentada às culturas bacterianas (como mesmo significado do exemplo 5) em solução fisiológica em quantidades adequadas para for-

necer a concentração final desejada de nano-Ag.

A incubação (realizada em duplicata) foi realizada em tubos de ensaio estéreis, tapados agitados a 37 °C e as contagens de células foram então determinadas em tempos de contato diferentes (evento de amostragem). Em cada evento de amostragem, 100 µL de cada tratamento foram 5
semeados em placa para um Ágar-ágar de Soja Trypticase (TSA) o meio de crescimento sólido e as colônias foram contadas. Os resultados obtidos depois de 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas e 40 horas respectivamente são mostrados na Tabela 4 abaixo (em que ND significa não detectável, isto 10
é, abaixo do limite de detecção).

Tabela 4.

Tempo de Contato	Conc. (ppm)	Agente patogênico			
		<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Listeria</i>
15	0	1,0E+05	2,2E+02	4,5E+03	4,9E+03
		1,0E+04	1,1 E+02	6,1E+03	4,2E+03
	1	ND	ND	ND	1,0E+01
		ND	ND	ND	2,0E+01
	0,1	ND	5,0E+01	ND	3,4E+03
		ND	1,0E+02	1,0E+01	3,9E+03
16	0	2,0E+04	1,6E+02	2,7E+03	5,6E+03
		7,3E+03	1,3E+02	4,0E+03	5,1E+03
	1	ND	ND	ND	ND
		ND	6,0E+01	ND	2,0E+03
	0,1	ND	4,0E+01	ND	2,1E+03
		ND	4,0E+01	ND	2,1E+03
17	0	1,2E+04	1,5E+02	3,1E+03	5,6E+0,3
		1,0E+04	1,7E+02	3,2E+03	4,7E+03
	1	ND	ND	ND	ND
		ND	1,0E+01	ND	1,1 E+03
		ND	5,0E+01	ND	8,8E+02

Tabela 4. -continuação-

Tempo de Contato	Conc. (ppm)	Agente patogênico			
		<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Listeria</i>
18	0	1,0E+04	1,6E+02	2,2E+03	3,5E+0,3
		1,0E+04	7,0E+01	2,3E+03	2,4E+03
	1	ND	ND	ND	ND
	0,1	ND	1,0E+01	ND	9,2E+02
		ND	ND	ND	2,2E+03
		ND	ND	ND	2,2E+03
40	0	1,0E+04	1,0E+01	1,5E+03	9,0E+01
		1,9E+04	1,0E+01	1,9E+03	7,0E+01
	1	ND	ND	ND	ND
	0,1	ND	ND	ND	ND

Exemplo 8: Preparação das composições de nanop prata em proporções ponderais diferentes de prata para o peso de biomassa seca de células

Uma solução de estoque de prata (I) foi preparada em amônia líquida (28 % em volume de NH_3 em água) em uma concentração final de 425 g AgNO_3/L (= AgNO_3 a 50 mM). Uma cultura de *Lactobacillus fermentum* foi então preparada como no exemplo 1.

2,8 g (peso úmido) da pélete de célula centrifugada foi ressuspensa em 3 quantidades diferentes de água milliQ (50 mL, 100 mL e 1 L) para obter misturas reacionais referidas como A, B e C, respectivamente.

O NaOH então foi acrescentado a cada tubo de ensaio de uma solução de estoque a 1N de NaOH em água milliQ, para obter uma normalidade de 0,10N de NaOH na suspensão acima mencionada.

Conseqüentemente, a solução de estoque de prata (I) foi acrescentada como se segue:

Mistura reacional A: 0,24 mL de solução de estoque de prata (I) foram acrescentados para obter uma concentração final de 1,30 g Ag/L (ou 12 mM) Ag. Ocorreu uma reação de precipitação quase imediata (precipitado marrom-avermelhado) sobre 56 g/L de biomassa (peso molhado). Assumindo uma proporção média de peso seco da biomassa centrifugada entre 10 % e 30 %, foi obtida uma proporção em peso de prata para célula seca entre 1:4 e 1:12.

Mistura reacional B: 2,4 mL de solução de estoque de prata (I) foram acrescentados para obter uma concentração final de 5,78 g Ag/L (55 mM) Ag. Ocorreu uma reação de precipitação quase imediata (precipitado marrom-avermelhado) sobre 28 g/L de biomassa (peso molhado). Como o peso seco de biomassa centrifugada está em uma média de 10 % a 30 %, foi obtida uma proporção em peso de prata para célula seca entre 2:1 e 0,7:1. O pH durante esta reação foi de 11,6.

Mistura reacional C: 24 mL de solução de estoque de prata (I) foram acrescentados para obter uma concentração final de 5,78 g Ag/L (55 mM) Ag. Ocorreu uma reação de precipitação quase imediata sobre 2,8 g/L de biomassa (peso molhado). Como o peso seco de biomassa centrifugada está em uma média de 10 % a 30 %, foi obtida uma proporção em peso de prata para célula seca entre 20:1 e 7:1.

Permitiu-se que as misturas reacionais descansassem durante 30 minutos, depois dos quais a composição de nano-Ag formada foi colhida.

O precipitado resultante de nano-Ag foi centrifugado em conjunto com a biomassa em 3.000 g durante 10 minutos a 15°C e depois lavado duas vezes com a água milliQ para retirar qualquer amônia residual e outros componentes solúveis em água do processo de produção. O pélete de nano-Ag purificado produzido foi então analisado (exemplo 9), ou adicionalmente diluído em água milliQ para as concentrações de nanoAg adequadas aos novos testes.

Exemplo 9: Análise de XRD da nanoAg produzida em uma proporção ponderal de prata para célula de biomassa seca de 0,7:1.

A análise de XRD de uma biomassa com partículas de nanop prata produzidas com uma proporção ponderal de prata para célula de biomassa a seca de 0,7:1, de acordo com o exemplo 8, e depois seca em um forno a 100°C durante 24 horas, foi realizada como explicado no exemplo 2. Só o padrão de difração de raios-x da prata metálica pode ser detectada neste espectro XRD. Já que pode prever-se seguramente que os elementos traço cristalinos abaixo de 5 % em peso no produto seco não podem ser detectadas por XRD, pode prever-se rudemente que pelo menos 95 % da prata de-

tectada por esta análise de XRD estava no estado de Ag(0).

Exemplo 10: Pós-tratamento da nanop prata com H₂O₂.

Os péletes de nano-Ag lavados obtidos de acordo com o exemplo 1 ou o exemplo 8, foram pós-tratadas com 30 % (em volume) H₂O₂ em água. Para este efeito, os péletes foram suspensos em H₂O₂ em concentrações de até 6 g Ag/L H₂O₂ (30 %). Foram obtidos precipitados mais estáveis. Uma suspensão dos precipitados obtidos então foi adicionalmente diluída em água milliQ para as concentrações de nanoAg adequadas aos novos testes.

10 Exemplo 11: Propriedades antimicrobianas da nanoAg sem ou após o pós-tratamento com H₂O₂

As formulações de NanoAg foram preparadas tal como descrito no exemplo 8 em diferentes proporções ponderais de prata para a célula de biomassa seca de 7:1, 1:10 e 0,7:1 respectivamente (amostras aqui denominadas de A, B e C, respectivamente). Adicionalmente, as preparações de nanoAg obtidas em uma proporção ponderal de prata para célula de biomassa seca igual a 0,7:1 foram também tratadas com H₂O₂ tal como descrito no exemplo 10, produzindo assim uma quarta amostra denominada de D.

Para avaliar o efeito das proporções ponderais de prata para a célula de biomassa seca sobre a atividade antimicrobiana da nanoAg produzida, uma suspensão de célula de 1 x 10⁴ CFU/mL da *Salmonella typhimurium* foi feita em solução fisiológica estéril e dispensada em diferentes tubos de ensaio. As amostras A, B, C e D foram acrescentadas a estes tubos de ensaio até que uma concentração final de 0,05 mg/L (ou 50 ppb) de nanoAg em cada tubo de ensaio fosse obtida. Como controles, as culturas bacterianas foram incubadas com AgNO₃ em 0,05 ppm e sem qualquer prata. Os tubos de ensaio foram tapados e incubados com agitação a 37 °C, em duplicata. Depois de uma incubação de 4,5 horas, as amostras foram tomadas, feitas as diluições em série com solução fisiológica e semeadas em placa em meio TSA seguido da incubação das placas a 37 °C durante uma noite para permitir a determinação da contagem total de Salmonella. Os resultados destas contas são mostrados na figura 3 na forma de uma contagem

média de células e o desvio padrão igual a dois, independente de duplicata. Uma redução substancial da contagem de bactérias foi observada depois de uma incubação de 4,5 horas na presença de 0,05 ppm nanoAg obtido pelo método do exemplo 8. A figura 3 mostra que quanto mais elevada a proporção ponderal da prata para as células secas, menos reativa era a nanoAg resultante em relação à atividade antimicrobiana. Adicionalmente, o tratamento do produto nanoAg com H_2O_2 aumentou significativamente a sua atividade antimicrobiana.

5

Exemplo 12: determinação do tamanho da partícula de nanop prata por meio de Microscopia de Transmissão de Elétron

10

Para preparar seções finas para a análise por TEM, as péletes de bactérias foram fixadas em uma solução tampão 0,1M de cacaodilato (pH 7,4) contendo 2,5 % de glutaraldeído e 2 % de formaldeído e mantidas em 3 % de agarose de baixo ponto de fusão (da Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA). Essas amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1 %. Entre e após as etapas de fixação, as amostras foram lavadas com a água destilada. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e, finalmente, em óxido propylene anidro. Depois de implantadas no meio Epon-Spurr, os blocos do espécime foram cortados com uma unidade de corte TM60 (Reichert-Jung A.G., Viena, Austria) para obter uma face de corte de $0,5 \text{ mm}^2 \times 1 \text{ mm}^2$ a $1 \text{ mm}^2 \times 2 \text{ mm}^2$ e as seções ultrafinas no ouro até a faixa de variação de cor de interferência da prata foram cortadas usando o micrótomo de ultracorte (Reichert-Jung A.G., Viena, Austria). As seções foram trazidas em piolofórmio e grades de cobre revestidas de carbono (malha 200). Uma vez que isto foi feito, as seções finas foram coradas com acetato de uranila a 2 % e depois com citrato de chumbo para determinar a ultraestrutura das células. Os produtos químicos e as grades foram obtidos do Agar Scientific (Stansted, Reino Unido). A visualização foi realizada com um microscópio de transmissão de elétrons EM208S (da FEI, Eindhoven, Países Baixos) operando a 80 kV.

15

20

25

30

As imagens da TEM (não mostradas) foram obtidas para as partículas de nanop prata resultantes das misturas reacionais A, B e C descritas

no exemplo 8. Estas imagens confirmam que partículas de nanop prata esféricas foram obtidas na composição na forma dos precipitados sobre a superfície da célula bacteriana e na suspensão entre a biomassa.

5 - Tamanho de partícula para a nanoAg resultante da mistura reacional A (proporção 1:10): para as 35 nanopartículas medidas, o diâmetro variou de 3,3 nm a 72 nm com uma média de 14 nm, a área da superfície da partícula variou de 6,4 nm² a 2,996 nm² e desse modo a esfericidade variou de 0,14 a 0,97;

10 - Tamanho de partícula para a nanoAg resultante da mistura reacional B (proporção 1:1): para as 202 nanopartículas medidas, o diâmetro variou de 3 nm a 116 nm com uma média de 15 nm, a área da superfície da partícula variou de 6 nm² a 4,805 nm² e desse modo a esfericidade variou de 0,12 a 0,96;

15 - Tamanho de partícula para a nanoAg resultante da mistura reacional C (proporção 10:1): para as 56 nanopartículas medidas, o diâmetro variou de 3,3 nm a 56 nm com uma média de 16 nm, a área da superfície da partícula variou de 6,4 nm² a 1,841 nm² e desse modo a esfericidade variou de 0,15 a 0,95.

Exemplo 13: Preparação de nano-ouro coloidal

20 Uma solução de estoque de ouro (III) foi preparada em água milliQ, a uma concentração final de 7,5 g AuCl₃/L. Uma cultura de *Lactobacillus fermentum* foi obtida de acordo com o exemplo 1.

Um pélete de célula centrifugado com um peso molhado de 2,5 g foi acrescentada a 100 mL de água milliQ.

25 NaOH foi acrescentado de uma solução de estoque a 1N de NaOH em água milliQ, para obter uma normalidade de 0,10N NaOH na suspensão acima mencionada.

30 A esta suspensão, conseqüentemente, 10 mL da solução de estoque de ouro (III) foram acrescentados para obter uma concentração final de 75 mg Au(III)/100 mL na forma de AuCl₃-Au (Au a 3,8 mM). A precipitação do Au(0) para os 2,5 g/100 mL de biomassa (peso molhado) foi concluída dentro de 4 horas. Como o peso seco da biomassa centrifugada está em

média entre 10 % e 30 %, foi obtida uma razão ponderal de ouro para célula seca entre 1:3 e 1:10.

Permitiu-se que a reação continuasse durante as 4 horas, depois das quais as partículas o nano-ouro foram colhidas. Esse precipitado purpúreo foi centrifugado a 3.000 g durante 10 minutos a 15 °C e lavado 2 vezes com água milliQ para retirar os componentes do processo de produção solúveis em água.

Exemplo 14: Análise de XRD do nano-ouro

A análise de XRD da biomassa com partículas de ouro do exemplo 13, seca em um forno em 100°C durante 24 horas, foi realizada com um Difrátômetro Siemens D5000 com um sistema ótico Bragg-Brentano tal como explicado no exemplo 2. O espectro resultante é mostrado na figura 4 e indica a presença de picos de difração de raios-x somente de Au⁰.

Exemplo 15: Eficiência da bioprecipitação e recuperação na biomassa em diferentes razões ponderais de prata para célula de biomassa seca

Para avaliar a influência de biomassa no biorredução das nanopartículas de Ag(I) a Ag(0), foi determinada a recuperação na biomassa e na solução depois da biorredução em diferentes proporções de Ag:CDW.

As formulações de nanop prata em diferentes proporções de Ag:CDW estiveram preparadas como descrito no exemplo 8. As percentagens de recuperação de prata foram determinadas depois de 4 horas de incubação da biomassa com Ag(I) e depois por fracionamento entre a fase solúvel (na solução) e fase precipitada (na biomassa) por centrifugação a 7.000 g durante 10 minutos. Os resultados desta investigação são mostrados na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8.

Amostra (razão Ag:CDW)	mg de Ag/L na solução	mg de Ag/L na biomassa	Total recuperado
A (1:10)	76	1.295	100 %
B (1:1)	819	5.308	100 %
C Ag:CDW = 10:1	1.612	4.844	100 %

Desses resultados, fica claro que a recuperação da prata como

as partículas associadas pela biomassa foi mais elevada quando as proporções Ag:CDW foram mais baixas. Por exemplo uma proporção Ag:CDW de 1:10 fornece uma recuperação aceitável de Ag⁰ (aproximadamente 95 %) da Ag(I) em solução por meio da biorredução.

5 Exemplo 16: Propriedades algicidas de uma formulação de nanoprata sem pós-tratamento com peróxido de hidrogênio

Uma formulação nanoprata foi preparada tal como descrito no exemplo 8 em uma razão ponderal de prata para célula de biomassa seca de 1:4.

10 De modo a avaliar o efeito algicida dessa formulação, tubos de ensaio contendo 10 mL de meio BG11 (tal como descrito por Stanier et AL., em *Bacteriol. Rev.* (1971) 35: 171 a 205), foram inoculados com 0,5 mL de uma cultura BG11 líquida de *Chlorella vulgaris* ativamente crescendo e incubada a 20°C, com umidade relativa de 65 % e 1000 Lux (16 horas/dia). O
15 crescimento foi avaliado depois de 2 semanas pela medição espectrofotométrica. Concentrações diferentes da formulação nanoprata, variando de 20 mg de Ag/L a 0,01 mg de Ag/L, foram testadas pela dosagem nos tubos de ensaio. O valor da MIC é a concentração mais baixa do teste na qual foi observada a completa inibição do crescimento do organismo. Determinou-se que
20 o valor da MIC desta formulação de nanoprata contra *Chlorella vulgaris* foi de 0,125 mg de Ag/L.

REIVINDICAÇÕES

- 5 1. Método para a produção de uma composição compreendendo nanop prata coloidal ou nano-ouro coloidal, compreendendo uma etapa de incubação de bactérias probióticas com uma solução aquosa compreendendo pelo menos 4 mM de um sal de prata ou de ouro.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a dita solução aquosa compreende pelo menos 4 mM de um sal de prata e também compreende a amônia e/ou um sal de amônio, e um hidróxido de metal alcalino.
- 10 3. Método para a produção de uma composição compreendendo nanop prata coloidal, compreendendo uma etapa de contactar bactérias probióticas em uma temperatura de 5°C a 45°C com uma solução aquosa compreendendo uma mistura de um sal de prata, amônia e/ou um sal de amônio, e um hidróxido de metal alcalino.
- 15 4. Método de acordo com a reivindicação 2 ou a reivindicação 3, em que a quantidade de amônia e/ou de um sal de amônio é suficiente para formar uma quantidade substancial de $\text{Ag}(\text{NH}_3)^+$ ou do complexo $(\text{Ag}(\text{NH}_3)_2)^+$.
- 20 5. Método para a produção de uma composição compreendendo nano-ouro coloidal, compreendendo uma etapa de contactar bactérias probióticas em uma temperatura de 5°C a 45°C com uma solução aquosa compreendendo uma mistura de um sal de ouro e um hidróxido de metal alcalino na ausência da amônia ou de um sal de amônio.
- 25 6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 5, em que o dito hidróxido de metal alcalino é selecionado de hidróxido de sódio e hidróxido de potássio.
7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, em que a proporção ponderal de prata ou de ouro para o peso seco de células de bactérias está dentro de uma faixa de variação de 0,05 a 20.
- 30 8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, em que o tempo de contato ou de incubação varia de 1 segundo a 30 minutos.
9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, em que o dito sal é o nitrato de prata, o cloreto de prata ou o cloreto de ouro.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, em que a incubação é realizada em um pH dentro de uma faixa de variação de 8 a 12.

5 11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, em que as ditas bactérias probióticas são da espécie *Lactobacillus*.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, também compreendendo a etapa de remoção de pelo menos uma parte de ditas bactérias probióticas da mistura de incubação por meios mecânicos, enzimáticos ou por tratamento fisicoquímico.

10 13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, também compreendendo as etapas de: centrifugação da mistura de incubação formando uma porção sólida compreendendo a composição possuindo nanop prata coloidal ou nano-ouro coloidal e uma porção líquida, e separação da dita porção sólida da porção líquida.

15 14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, também compreendendo a etapa de tratamento de dita composição compreendendo a nanop prata coloidal ou o nano-ouro coloidal com um peróxido ou persal.

20 15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o dito peróxido é o peróxido de hidrogênio.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, em que a dita nanop prata coloidal é introduzida como um componente de um agente antimicrobiano.

25 17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, em que a dita nanop prata coloidal é introduzida como um componente de um agente de algicida.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, em que a dita nanop prata coloidal é introduzida como um componente de um agente de herbicida.

30 19. Uso de bactérias para a produção de metais coloidais ou compostos metálicos na membrana bacteriana pelo contato da dita bactéria com os ditos metais ou compostos metálicos sob um pH controlado.

20. Uso de acordo com a reivindicação 19, em que o metal do dito metal ou composto metálico é a prata.

21. Uso de acordo com a reivindicação 19, em que o metal do dito metal ou composto metálico é selecionado do grupo consistindo em ouro, zinco, mercúrio, cobre, paládio, platina, e bismuto.

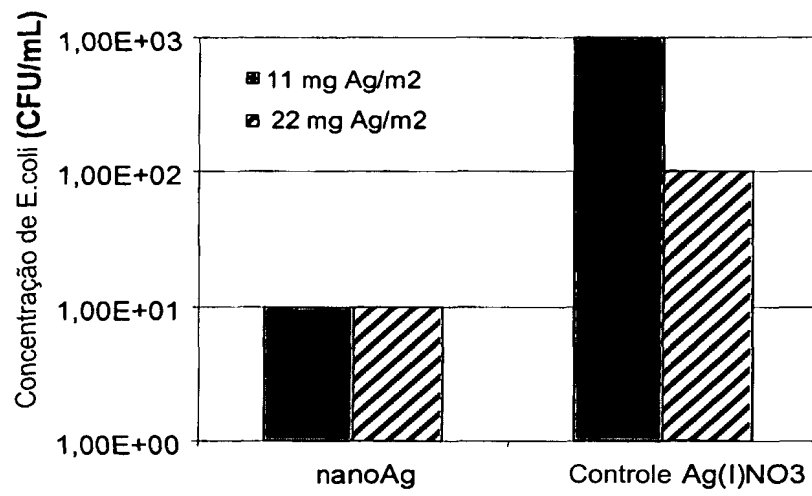


Fig 1

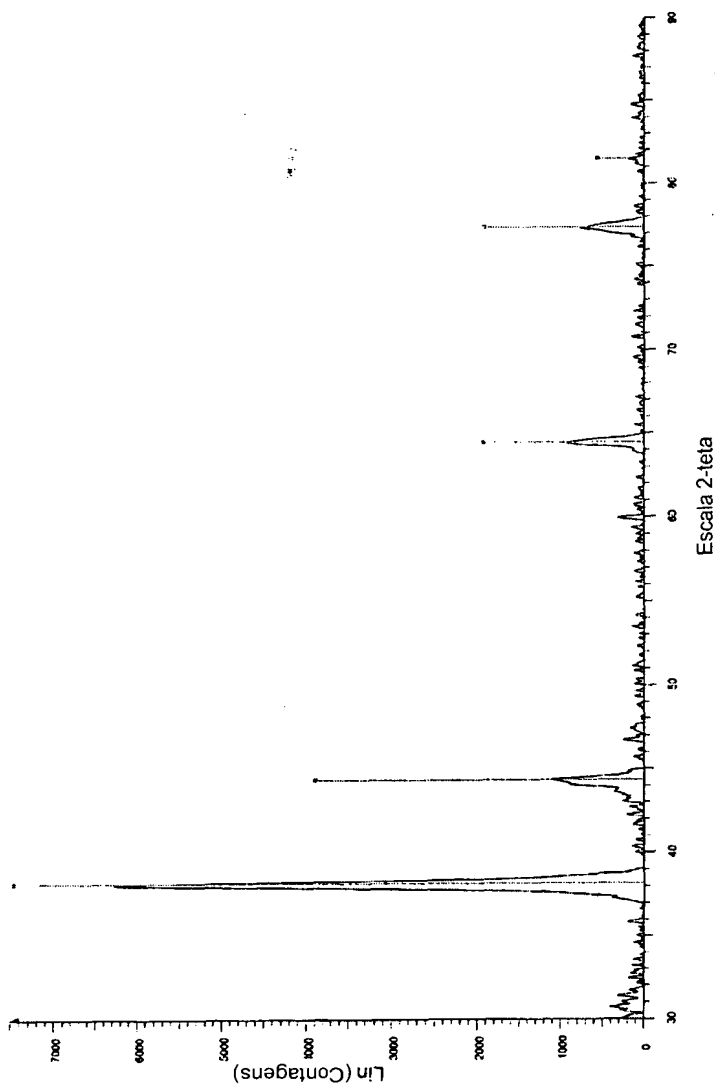


Fig 2

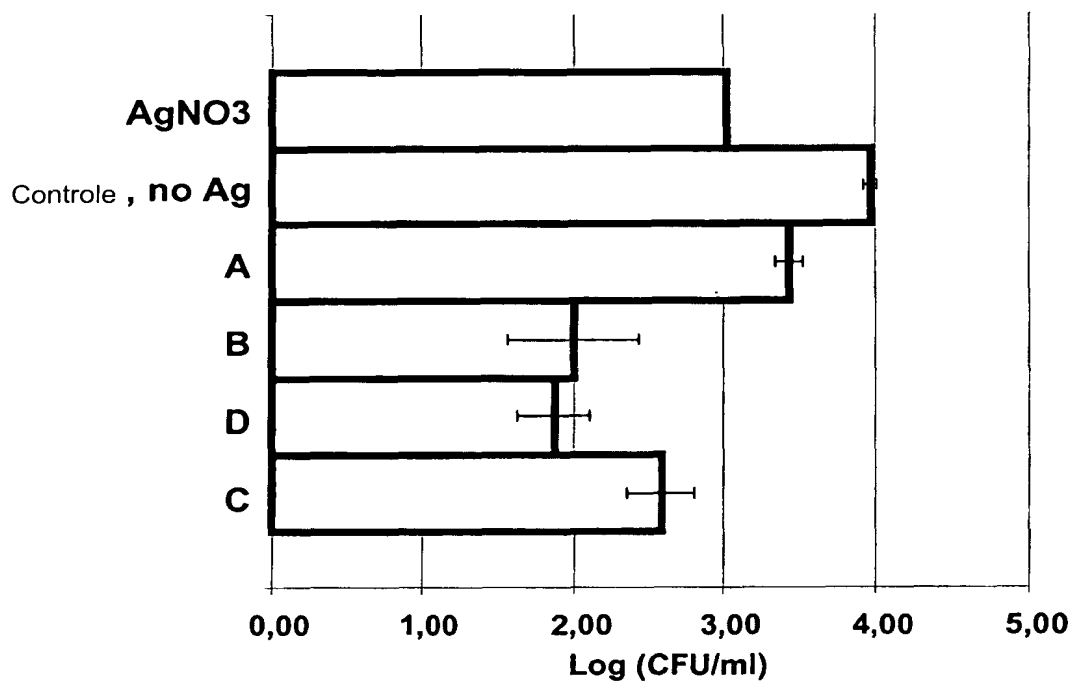


Fig 3

Au

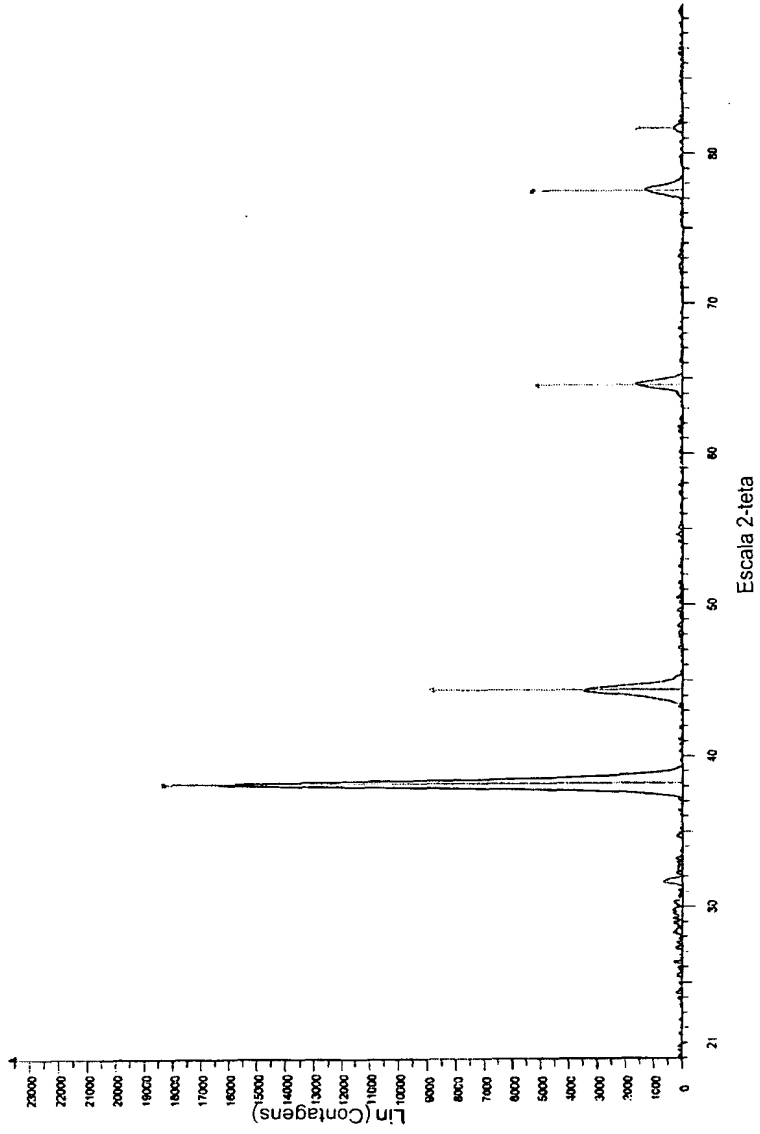


Fig 4

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS"**.

5 A presente invenção refere-se a um método para a produção de uma composição compreendendo nanopartículas coloidais de metais incluindo prata, ouro, zinco, mercúrio, cobre, paládio, platina, ou bismuto, produzidas pelo contato de um metal ou composto metálico com bactérias. Uma modalidade do método compreende uma etapa de incubação de bactérias probióticas com uma solução aquosa compreendendo pelo menos 4 mM de
10 um sal de prata ou de ouro. Uma composição resultante de nanopartículas de prata é útil como um agente antimicrobiano altamente eficiente, por exemplo quando impregnado sobre um veículo, ou como um agente algicida ou como um agente herbicida.