



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

ANTÔNIO MATEUS DA SILVA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DAS PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) INCORPORADAS EM FILMES DE
CELULOSE BACTERIANA**

Recife

2024

ANTÔNIO MATEUS DA SIVA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DAS PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) INCORPORADAS EM FILMES DE
CELULOSE BACTERIANA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do curso de Graduação em
Engenharia Química da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química.

Orientador: Prof. André Galembeck

Coorientadora: Dra. Yolice Patricia Moreno Ruiz

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Araújo, Antônio Mateus da Silva.

Avaliação da estabilidade e das propriedades antibacterianas de nanopartículas de prata (AgNPs) incorporadas em filmes de celulose bacteriana / Antônio Mateus da Silva Araújo. - Recife, 2024.

60 p. : il., tab.

Orientador(a): André Galembeck

Cooorientador(a): Yolice Patricia Moreno

Ruiz

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química - Bacharelado, 2024.

Inclui referências, apêndices.

1. Antimicrobiano. 2. Estabilidade. 3. Nanocompósitos. 4. Nanopartículas de prata. I. Galembeck, André. (Orientação). II. Ruiz, Yolice Patricia Moreno. (Coorientação). IV. Título.

660 CDD (22.ed.)

ANTÔNIO MATEUS DA SIVA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DAS PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) INCORPORADAS EM FILMES DE
CELULOSE BACTERIANA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do curso de Graduação em
Engenharia Química da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química.

Aprovado em: 23/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ANDRE GALEMBECK**
Data: 09/04/2025 17:15:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. André Galembeck (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 **SARA HORACIO DE OLIVEIRA MACIEL**
Data: 11/03/2025 18:40:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Sara Horácio de Oliveira Maciel (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO DEMOSTENES DE SOBRAL**
Data: 09/04/2025 13:22:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Antônio Demostenes de Sobral (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Josenilda e ao meu irmão Marcone por todo apoio e incentivo. A toda minha família que de alguma forma sempre acreditou no meu potencial. A Deus por sempre se fazer presente na minha vida. Ao meu irmão Marcos Antônio por estar do meu lado durante todo tempo da minha graduação.

Aos diversos amigos durante essa jornada da graduação deixou tudo mais leve, em especial a Beatriz, Alice, Vinicius, Helena, José Baracho e Sávio por serem pessoas tão especiais na minha vida.

Ao laboratório CHICO – DQF e a equipe que o compôs durante meus quase três anos na iniciação científica, a Camilla, Clara e Mônica por compartilhar suas experiências acadêmicas. A Helena que também me acompanhou na pesquisa, nas sínteses que levavam o dia inteiro para serem feitas.

Ao laboratório do LIKA (Fiocruz-UFPE) pela colaboração com os testes microbiológicos, em especial a Prof. Dra. Isabella Macario e Davi Lacerda. Ao Dpto. de Energia Nuclear da UFPE, pelo auxílio com a esterilização das amostras. Ao laboratório da Central analítica, no DQF, em especial a Ihasmin, pela ajuda e paciência na realização dos testes por ICP-OES.

A Beatriz por estar comigo em todos os momentos da minha graduação, em especial durante o tempo de pandemia, estando sempre disposta a entrar em reuniões online durante a madrugada, seja para discutir problemas da graduação como para desabafar.

A minha coorientadora de pesquisa, Yolice Moreno, por sempre estar presente e disposta a me auxiliar nas mais diversas situações da pesquisa de iniciação científica.

A UFPE, por me proporcionar o título de bacharel e pela oportunidade de participar da iniciação científica, mas também pelo apoio estudantil através da residência universitária, que me possibilitou continuar na graduação.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química, por todo conhecimento que me foi passado.

Ao meu orientador, André Galembeck, por ter me orientado não só no desenvolvimento deste trabalho, mas durante toda minha trajetória na pesquisa de iniciação científica.

“Devemos acreditar que somos talentosos para algumas coisas, e essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.”

(Marie Curie).

RESUMO

O uso da prata como agente antimicrobiano já é bem estabelecido, e com a aprimoramento da nanotecnologia, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido fonte de diversos estudos voltados para sua ação antibactericida. As AgNPs associadas a materiais usados contra feridas e queimaduras é relatada como uma alternativa promissora para ação antibactericida. Nas formas de compósitos com quitosana, hidrogéis, celulose bacteriana (CB), e muitos outros tipos de curativos e compósitos, apresenta diversas propriedades eficazes contra bactérias que causam infecções na pele. Os curativos e compósitos de CB-AgNPs também vêm sendo utilizado contra bactérias multirresistentes, pois através de mecanismos como produção de espécies reativas de oxigênio, alteração na estrutura do DNA e quebra da parede celular, promovem a morte das células bacterianas. A produção das AgNPs é uma etapa importante antes da incorporação. Dentre os métodos, a redução química da Ag^0 com NaBH_4 é bastante utilizada, uma vez que produz AgNPs esféricas. Com base nisso, buscou-se sintetizar diversas amostras de AgNPs e, para avaliar sua estabilidade e a reprodutibilidade da síntese. Caracterizações foram realizadas para determinar o diâmetro hidrodinâmico, o comprimento de absorção máximo no UV-visível e a largura a meia altura. Para avaliação da incorporação, foi determinada a concentração nas amostras e nos filmes de CB-AgNPs. Os testes de lixiviação foram realizados para determinar a quantidade de Ag liberada dos filmes. Por fim, para os testes microbiológicos, foram realizadas análises com as bactérias: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* e *S. aureus MRSA*. As análises de UV-vis mostraram que as AgNPs possuem espectros similares entre si, indicando a reprodutibilidade, apresentando resultados coerentes com diversos estudos, com comprimento de onda em torno de 400 nm com FWHM em torno de 65 nm, o que indica que o sistema é homogêneo, composto em sua maioria por nanopartículas pequenas e esféricas. Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico, observou-se a formação de possíveis aglomerados de AgNPs, mas que, dentro do sistema, há partículas com diâmetros pequenos, variando de 19 a 40 nm, corroborando com os resultados de UV-vis. Com os testes de lixiviação, foi possível determinar que as AgNPs são bem incorporadas na estrutura da CB e que fatores como tempo não é capaz de causar degradação do CB-AgNPs. Com os resultados obtidos, verificou-se que as AgNPs e os compósitos de CB-AgNPs são capazes de inibir a atividade microbiana das bactérias que causam infecções na pele, bem como de microrganismos multirresistentes.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Estabilidade; Nanocompósitos; Nanopartículas de prata;

ABSTRACT

The use of silver as an antimicrobial agent is well established. With the advancement of nanotechnology, silver nanoparticles have been the focus of various studies aimed at their bactericidal action. The AgNPs associated with materials used for wound dressings and burns are reported as promising alternatives for bactericidal action. In the form of composites with chitosan, hydrogels, bacterial cellulose, and many other types of dressings and composites it presents various effective properties against bacteria that cause skin infections. CB-AgNP dressings have also been used against multidrug-resistant bacteria, as they promote the death of bacterial cells through mechanisms such as the production of reactive oxygen species, alteration in DNA structure, and cell wall disruption. The production of AgNPs is a critical step before incorporation. Among the methods, the chemical reduction of Ag^0 with NaBH_4 is widely used, as it produces spherical AgNPs. Based on this, various AgNP samples were synthesized, and to evaluate their stability and synthesis reproducibility, characterizations were performed to determine characteristics such as hydrodynamic diameter, maximum absorption wavelength in UV-visible, and full width at half maximum. For the incorporation evaluation, the concentration in the samples and the AgNPs films was determined, and leaching tests were performed to determine the amount of Ag released from the films. Finally, for microbiological tests, analyses were carried out on the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus aureus* MRSA. UV-vis analyses showed that the AgNPs have similar spectra, indicating reproducibility, with results consistent with various studies, presenting a wavelength around 400 nm with FWHM around 65 nm. This suggests that the system is homogeneous, composed mostly of small and spherical nanoparticles. For the determination of hydrodynamic diameter, the formation of possible AgNP agglomerates was observed. Still, within the system, particles with small diameters ranging from 19 to 40 nm, corroborating the UV-vis results. With the leaching tests, it was possible to determine that AgNPs are well incorporated into the CB structure and that factors such as time and medium pH are not capable of causing significant degradation. From the results obtained, it was found that AgNPs and CB-AgNPs composites can inhibit the microbial activity of bacteria that cause skin infections, as well as multidrug-resistant microorganisms.

Keywords: Antibacterial; Stability; Nanocomposites; Silver nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismos de ação das AgNPs em células bacterianas.	18
Figura 2	Etapas de cicatrização.	19
Figura 3	Lavagem da CB e incorporação das AgNPs.	27
Figura 4	Amostras de AgNPs sintetizadas.	34
Figura 5	Espectros para as amostras de AgNPs.	35
Figura 6	Distribuição de diâmetro (intensidade) das AgNPs pela distribuição lognormal.	37
Figura 7	Distribuição de diâmetro (intensidade) das AgNPs pela distribuição MSD. Filmes de CB-AgNPs e CB Q.	38
Figura 8	Filmes de CB-AgNPs e CB Q.	41
Figura 9	Liberação de Ag dos filmes CB-AgNPs em água.	42
Figura 10	Liberação de Ag dos filmes CB-AgNPs em solução com pH controlado.	43
Figura 11	Concentração mínima inibitória em $\mu\text{g/mL}$ para AgNPs.	45
Figura 12	Concentração mínima bactericida em $\mu\text{g/mL}$ para AgNPs	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição das sínteses realizadas.	27
Tabela 2	Resultados para o comprimento de onda e FWHM para as amostras de AgNPs.	36
Tabela 3	Resultados para o diâmetro hidrodinâmico (D_H) para as AgNPs.	37
Tabela 4	Concentração de Ag nas amostras de AgNPs.	41
Tabela 5	Concentração de Ag liberada na água durante a lixiviação.	43
Tabela 6	Resultados para concentração de Ag liberada em solução com pH controlado.	45
Tabela 7	Valores para o diâmetro médio do disco de inibição.	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Filmes preparados a partir da CB.	28
----------	-----------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO ₃	Nitrato de Prata
AgNPs	Nanopartículas de Prata
CB	Celulose Bacteriana
DLS	Dinamic Light Scatering (Espalhamento de Luz Dinâmica)
DPTS	3-2-aminoetilamino-propil-trimetoxisilano
EUA	Estados Unidos da América
FWHM	Largura a Meia Altura
ICP-OES	Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
IDSA	Infectious Diseases Society of America (Sociedade Americana de Doenças Infecciosas)
HNO ₃	Ácido Nítrico
MBC/CBM	Concentração Mínima Bacteriana
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MIC/CIM	Concentração Mínima Inibitória
MHA	Ágar Mueller Hinton
MHC	Caldo Mueller Hinton
MSD	Multimodal Size Distribution
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaBH ₄	Borohidreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ROS (EOS)	Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)
UV-vis	Espectroscopia no Ultravioleta-visível
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. OBJETIVO GERAL	15
1.1.1. Objetivos específicos	15
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
2.1. PRATA COMO AGENTE ANTIMIMICROBIANO	16
2.1.1. Nanopartículas de prata (AgNPs)	17
2.1.2. Mecanismos antibacterianos das AgNPs	18
2.2. PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E QUEIMADURAS	19
2.2.1. Tipos de curativos	21
2.2.2. Curativos avançados	22
2.2.2.1. Hidrogéis ativos	22
2.2.2.2. Quitosana	22
2.2.2.3. Celulose Bacteriana	23
2.3. PRODUÇÃO DE AgNPs	23
2.4. ESTABILIDADE E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AgNPs ...	24
3. METODOLOGIA	26
3.1. SÍNTESE DE AgNPs	26
3.2. PREPARAÇÃO DE FILMES CB-AgNPs	26
3.3. CARACTERIZAÇÃO	28
3.3.1. Espectroscopia no UV-Visível (UV-vis)	28
3.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	29
3.3.3. Quantificação de prata	30
3.3.4. Testes de Lixiviação de Ag nos filmes de Celulose Bacteriana	31
3.4. TESTES MICROBIOLÓGICOS	32
3.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC/CIM) e Concentração Bacteriana Mínima (MBC/CBM)	32
3.4.2. Teste de disco de inibição	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. ESTABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE	34
4.1.1. Espectroscopia de UV-vis	35
4.1.2. Diâmetro hidrodinâmico por DLS	36
4.1.3. Concentração de Ag por ICP-OES	39
4.1.3.1. Concentração de Ag nas amostras de AgNPs	40

4.1.3.2.	Concentração de Ag nos filmes CB-AgNPs.....	40
4.1.4.	Lixiviação em água	41
4.1.5.	Lixiviação em solução com pH controlado	43
4.2.	TESTES MICROBIOLÓGICOS	45
4.2.1.	MIC e MBC para as amostras AgNPs	45
4.2.2.	Teste de disco de inibição para CB-AgNPs	47
5.	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICES	54

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2022, mais de 700 mil mortes por ano eram ocasionadas por vírus e bactérias multirresistentes (Misirli *et al.*, 2022). Entre as estratégias atuais contra as bactérias multirresistentes a antibióticos, têm-se o uso de nanopartículas metálicas (Misirli *et al.*, 2022). As nanopartículas de prata (AgNPs) se destacam devido a sua aplicação antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, como as bactérias, onde atuam através da combinação de diversos mecanismos que afetam na resistência microbiana (Roque, 2023; Silveira *et al.*, 2022).

Estudos feitos por Li e colaboradores (2023b) e Althobait e colaboradores (2023), destacaram que as AgNPs são uma alternativa para o grande aumento de infecções causadas por bactérias, especialmente as que dificultam o processo de cicatrização de doenças crônicas e queimaduras graves, tais como as consideradas pela IDSA (Sociedade Americana de doenças infecciosas traduzido do Inglês “*Infectious Diseases Society of America*”). Entre as bactérias mais perigosas e mortais se destacam: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, e as espécies do gênero *Enterobacter*.

Somado a isso, Li *et al.* (2023) descreveram que a resistência que as bactérias adquiriram aos medicamentos é um dos motivos pelos quais as AgNPs vem sendo aplicadas como um agente antimicrobiano. As AgNPs são eficientes contra bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* MRSA, resistente contra antibióticos. Além disso, foi demonstrado em estudos recentes que a capacidade de formar biofilmes bacterianos é a principal causa da resistência de microrganismos do tipo MRSA, no entanto, as nanopartículas de prata são eficazes, pois possuem uma alta capacidade de inibir que esses biofilmes se formem (Li *et al.*, 2023).

Devido as suas propriedades antimicrobianas, as AgNPs têm sido utilizadas também como uma alternativa promissora em curativos. Sabe-se que a prata em sua forma metálica e na forma de nitrato já vem sendo utilizada como uma alternativa para queimaduras e feridas (Alven *et al.*, 2024).

Um grande desafio enfrentado na cicatrização de feridas e de queimaduras está associado às infecções bacterianas. Estima-se que 75% dos pacientes com queimaduras chegam a morrer devido a este tipo de enfermidade. Segundo a OMS, de todas as infecções, mais de dois milhões são causadas por bactérias multirresistentes (Alven *et al.*, 2024). O uso das AgNPs

em curativos surge como alternativa, visto que as infecções bacterianas fazem com que outros microrganismos patógenos adquiram resistência ao tratamento convencional (Alven *et al.*, 2024). Os curativos a base de nanopartículas de prata atuam não apenas no processo de proteção da área contra ações externas, mas também promovem a cicatrização e auxiliam no processo de antissepsia (Grassi *et al.*, 2021).

As AgNPs incorporadas em filmes curativos têm a finalidade de atuar liberando íons Ag^+ , produzindo espécies reativas com oxigênio (ROS), promovendo danos na estrutura e na morfologia de bactérias (Dotto *et al.*, 2021). Estudos envolvendo o uso da prata como agente antibacteriano relataram que os curativos a base de prata adquiriram a função da eliminação e do combate direto contra infecções bacterianas, estuda-se que a prata é eficiente contra 650 patógenos (Antunes *et al.*, 2013).

As AgNPs atuam inibindo também a formação de biofilmes que permitem o crescimento de bactérias, no entanto, a liberação dos íons Ag^+ pode ser prejudicial para biomoléculas, como a proteína cisteína, ROS e o DNA, e interferem em algumas reações metabólicas. O processo de liberação de Ag^+ é um importante fator a ser controlado para que o uso desses nanomateriais em curativos seja eficaz (Martinez-Gutierrez *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2011).

Com isso posto, vale-se destacar que Chaloupka e colaboradores (2010) descreveram o funcionamento do mecanismo de como as nanopartículas de prata atuam contra as bactérias. Onde a oxidação das AgNPs gera os íons de prata e então interagem com a parede e membrana celular da bactéria, impedindo a replicação de DNA e RNA, ocasionando a morte celular.

Para sintetizar as AgNPs algumas particularidades devem ser destacadas, como a grandeza das nanopartículas é em escala nanométrica, elas são termodinamicamente instáveis (Antunes *et al.*, 2013). Sabendo disso, faz-se necessário, então, um composto que atue como estabilizador. Este produto deve possuir uma matriz polimérica que impeça a interação eletrostática que existe naturalmente entre as nanopartículas (Antunes *et al.*, 2013).

Como um dos problemas que cercam o uso da prata como curativo está relacionado com a produção de produtos nocivos, estabilizantes devem permitir também que a síntese das AgNPs seja biocompatível. Entre os biomateriais se destaca a quitosana, devido a sua grande afinidade com íons metálicos e atuação na estabilização do tamanho das AgNPs (Pereira, 2017).

Para que a redução aconteça devem ser empregados agentes redutores eficazes. O citrato de sódio e o borohidreto de sódio (NaBH_4) são agentes redutores bastantes conhecidos. Usando AgNO_3 como reagente precursor das AgNPs, e borohidreto de sódio, espera-se obter

nanopartículas com banda de absorção na faixa de 400 nm de comprimento de onda e com diâmetro entre 5 e 20 nm (Pereira, 2017).

Sabendo disso, o material a ser escolhido para que as AgNPs sejam incorporadas devem atender alguns princípios básicos tais como: melhor capacidade inibitória; prevenir a atuação de microrganismos; acelerar a cicatrização da ferida; restaurar a homeostase; e permitir que área fique úmida, assim facilitando uma melhor respiração da pele. Isso diminui tempo entre a troca de um curativo e outro, além de não se aderir às feridas. Entre os materiais destacam-se os hidrogéis, que usam matrizes poliméricas naturais para sua produção e possuem características molháveis e não adesivas (Jaiswal *et al.*, 2020).

Uma alternativa que vêm sendo estudada é o uso de celulose bacteriana (CB), que possui alta porosidade e boa biocompatibilidade, facilitando a incorporação de nanopartículas em sua rede polimérica. Também proporciona um ambiente úmido e equilibrado, resultando em uma melhor cicatrização da ferida, contudo, a CB não possui propriedades antibacterianas. Uma alternativa é a incorporação de AgNPs em filmes de celulose bacteriana (Yang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

1.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver material com propriedades antibacterianas mediante a incorporação de nanopartículas de prata em celulose bacteriana.

1.1.1. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de prata;
- Incorporar as nanopartículas em tecidos de celulose bacteriana;
- Caracterizar a morfologia, tamanho, estrutura e outras propriedades físico-químicas das nanopartículas sintetizadas;
- Estudar a reprodutibilidade da síntese de AgNPs, avaliando as características e propriedades das amostras sintetizadas;
- Investigar a ação bactericida dos tecidos biocompatíveis de celulose bacteriana tratados com as AgNPs.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. PRATA COMO AGENTE ANTIMIMICROBIANO

A prata é um metal classificado como de transição na tabela periódica, apresentando diversas propriedades biológicas e médicas já conhecidas desde a antiguidade. A prata foi muito utilizada no tratamento de queimaduras e doenças, tais como doenças venéreas, infecciosas e ulcerações, mas se destaca devido sua capacidade antibacteriana (Haidari *et al.*, 2020; Pareek *et al.*, 2022). Existem diversas formas em que se pode encontrar a prata, e boa parte dela é utilizada como agente antimicrobiano, tais como a forma metálica, a iônica, AgNO_3 e a nanométrica (AgNPs) (Haidari *et al.*, 2020; Pareek *et al.*, 2022).

No entanto, sua capacidade bactericida varia a depender da forma na qual a prata é aplicada. A forma iônica ou no estado monoatômico (Ag^+) é biologicamente ativa e tem um grande potencial antibacteriano. A forma metálica (Ag^0) possui uma taxa lenta de dissolução do Ag^+ na forma de Ag^0 , com isso, não possui aplicação como agente antimicrobiano, porque é inerte (Haidari *et al.*, 2020; Pareek *et al.*, 2022).

Apesar disso, com o avanço da nanotecnologia, muitos produtos à base de prata foram sendo feitos e aplicados nas mais diferentes áreas. O uso extensivo da prata começou a despertar alguns problemas, tais como sua deposição em rios e solos, apresentado um grande risco ao meio ambiente, influenciando então que os microrganismos desenvolvam resistência (Li *et al.*, 2024). Além disso, a prata na forma de Ag^+ apresenta risco às células e tem efeito tóxico dependendo da concentração usada, e por isso sua aplicação na medicina é restrito (Pareek *et al.*, 2022).

Nos últimos anos o uso de materiais a base de prata trouxe preocupação sobre a poluição ambiental e os efeitos contra os seres humanos (Li *et al.*, 2024; Pareek *et al.*, 2022). Mas, a forma nanométrica trouxe uma nova perspectiva para o uso da prata, e isso se deve pela relação entre área e volume das nanopartículas de prata (AgNPs). A Ag na presença de um agente de proteção, as AgNPs na forma iônica são liberadas de forma controlada, potencializando seu efeito antibacteriano a longo prazo (Pareek *et al.*, 2022).

2.1.1. Nanopartículas de prata (AgNPs)

AgNPs é o termo designado para representar um aglomerado de partículas de prata em escala nanométrica, de 1 a 100 nm. Uma partícula nessa escala apresenta uma vasta funcionalidade em relação a Ag comum. Até 2011, eram relatados cerca de 313 produtos contendo nanopartículas de prata, representando 23,73% de todos os produtos no mercado que utilizavam nanopartículas (Chen *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2013).

Diversos tipos de produtos utilizam a AgNPs em sua composição. Entre eles produtos desinfetantes, materiais para embalagem e armazenamento de alimentos, purificadores de água, e materiais em spray (Yu *et al.*, 2013). No entanto, as AgNPs são reconhecidas no mercado devido sua ampla aplicação na área médica, sendo utilizados diversos instrumentos cirúrgicos, tais como cimentos ósseos e implantes, curativos para feridas e queimaduras (Yu *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços da nanotecnologia, as AgNPs já eram usadas desde 1880, mesmo que sem conhecimento que se tratava de um material em nanoescala. É relatado também que na medicina, as AgNPs já foram utilizadas há mais de 100 anos, mas com o nome de “Collargol”. E o primeiro produto defensivo agrícola com AgNPs já era utilizado na década de 1950 nos EUA (Estados Unidos da América) (Yu *et al.*, 2013).

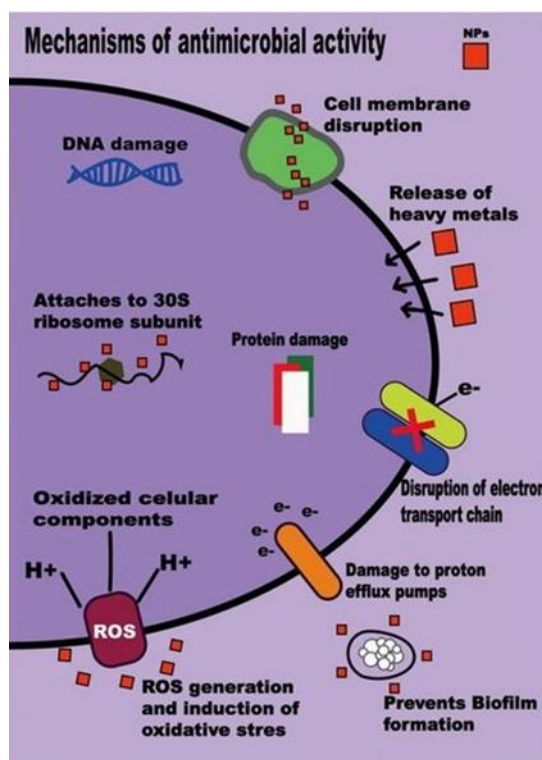
Outrora as diversas aplicações já bem estabelecidas das AgNPs, com o advento do surgimento dos antibióticos, a prata perdeu espaço como agente antibacteriano. As AgNPs foram estudadas e usada frente ao surgimento das cepas de bactérias multirresistentes, motivo de grande preocupação atualmente. Sabendo disso, as AgNPs têm sido foco de amplo estudo para entender a extensão de como atua seus mecanismos antibactericida (Yu *et al.*, 2013).

Embora já tenha sido elucidado que o efeito antibacteriano se deve ao fato de que as AgNPs são uma fonte de liberação lenta e controlada de íons Ag^+ biologicamente ativos, estas causam uma oxidação contínua nas estruturas celulares das bactérias. Por isso, a prata atua em estruturas-chaves das células de organismo bactericidas patogênicos, em que além da interação com o material proteico e enzimático de células, inibem a replicação de DNA, ocasionando estresse oxidativo (Haidari *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2013).

2.1.2. Mecanismos antibacterianos das AgNPs

Apesar de não existir só um mecanismo completo de como as AgNPs atuam contra as bactérias, existem diversas opções aceitas, dentre elas, que as AgNPs interrompem a função da parede celular, induz as espécies reativas do oxigênio (ROS) e danifica a membrana celular e a estrutura do DNA (Chen *et al.*, 2020). A Figura 1 mostra os possíveis mecanismos de ação das AgNPs em células bacterianas.

Figura 1 – Mecanismos de ação das AgNPs em células bacterianas.



Fonte: Adaptado de Lee *et al.* (2019).

Um dos mecanismos aceitos pontua que as AgNPs se aderem à membrana externa da célula bacteriana, se ligando aos grupos funcionais no peptidoglicano da parede celular, se acumulando na membrana externa, e com isso, aumenta a permeabilidade e induzindo a ruptura através de pequenas cavidades, resultando no vazamento de material celular (Bruna, *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024).

Outro mecanismo propõe que além de romper a membrana, os íons Ag^+ são liberados e entram pelas cavidades formadas, se ligando aos grupos os quais tiver afinidade – enxofre ou fósforo (presentes no DNA), alterando a estrutura e função do DNA, com isso induz o

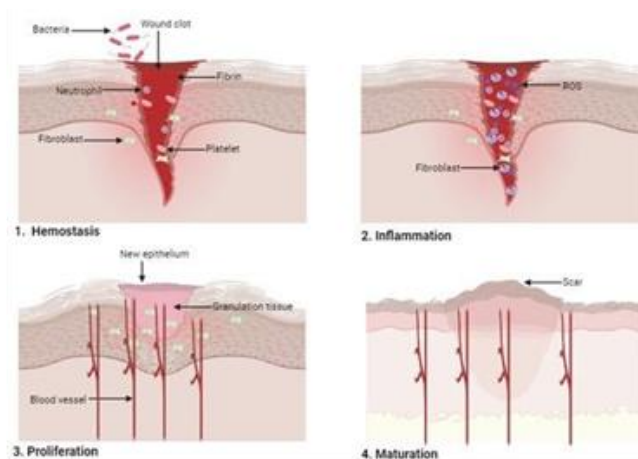
grupo O_2 a obter elétrons e produzir as ROS levando a eventual morte celular (Bruna *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024).

Outro mecanismo proposto afirma que as AgNPs liberam gradativamente os íons Ag^+ , que se ligam ao DNA da célula, em decorrência do tamanho e carga, interagem com os componentes e alteram as vias metabólicas, impedindo a replicação (Bruna *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024).

2.2. PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E QUEIMADURAS

O processo de cicatrização de feridas ocorre em uma sequência de etapas muito bem estabelecida, ocorrendo em conjunto, são definidas em quatro essas etapas: a hemostasia, inflamação, proliferação e maturação (Alven *et al.*, 2024; Haidarin *et al.*, 2020). A sequência das etapas no processo de cicatrização é ilustrada na Figura 02.

Figura 2 – Etapas de cicatrização.



Fonte: Alven *et al.* (2024).

A primeira fase, a de hemostasia ocorre posteriormente à ferida, e atua interrompendo o sangramento. A segunda fase, atuando de forma conjunta com a fase de hemostasia, age como uma barreira imunológica contra microrganismos patógenos. Na própria pele existem microrganismos que entram em contato com a ferida, causando infecções e retardando o processo de cicatrização. Na fase de proliferação há a diminuição da pele danificada e na última fase, de maturação, há a formação da cicatriz (Alven *et al.*, 2024).

Além das feridas, pacientes com lesões por queimaduras também enfrentam problemas

nos processos de cicatrização devido às infecções bacterianas. Segundo dados da OMS, Estima-se que por ano cerca 11 milhões de pessoas sofrem algum tipo de queimadura, das quais mais de 180 mil pessoas chegam a óbito. Para além da queimadura, os problemas são geralmente associados pela ineficiência do tratamento, que prejudica a qualidade de vida de pacientes com esse tipo de lesão (Rahimi *et al.*, 2020; Markiewicz-Gospodarek *et al.*, 2022).

Segundo Markiewicz-Gospodarek e colaboradores (2022), as queimaduras podem ser classificadas como: superficiais (grau I), superficiais de espessura parcial (grau II), profundas de espessura total (grau III) e queimadura de espessura total em tecidos mais profundos (grau IV – ou mista de grau II e III). As queimaduras de grau I ocorrem na epiderme, sem deixar cicatriz após a cicatrização. As de grau II ocorrem entre a epiderme e a derme e são caracterizadas pela presença de bolhas, que após a cicatrização podem deixar cicatriz, nas que deixam cicatriz é comum que haja transplante de pele. Nas de grau III e IV, a pele fica queimada e seca, com aspecto bronzeado, sendo necessário cirurgia e implante (Markiewicz-Gospodarek *et al.*, 2022).

Somado a isso, sabe-se que os principais fatores que causam as infecções bacterianas estão relacionados com a contaminação do ambiente, a falta de higiene e o mau manejo do exsudados da ferida. Logo, para diminuir o tempo de cicatrização é importante que haja um tratamento eficaz contra essas infecções que chegam a resultar em sepse e amputação (Alven *et al.*, 2024). O processo até o surgimento da infecção se inicia na proliferação de bactérias em feridas abertas, e quando essa proliferação atinge a colonização crítica, há o surgimento da infecção, definida como a invasão de células bacterianas em níveis elevados (Haidari *et al.*, 2020).

Concomitantemente, as infecções bacterianas também podem formar biofilmes, que agrava o processo de cicatrização da ferida, e conseqüentemente, surgem sintomas devido à infecção, tais como a inflamação dos tecidos, pus exsudato (Haidari *et al.*, 2020). Com isso, há a possibilidade de surgimento de infecções mais graves, tais como infecções que dificultam as vias inflamatórias e com isso as bactérias desenvolvem resistência aos mecanismos de tratamento convencionais (Alven *et al.*, 2024; Haidari *et al.*, 2020). Logo, tratamentos antibacterianos de amplo espectro (que seja favorável a reparação da lesão e danosa aos microrganismos), principalmente, que atue na fase inicial eliminando as bactérias se tornam cada vez mais necessários (Haidari *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2014).

Sabendo que as infecções são um grande fator nos processos de cicatrização de feridas e de queimaduras, muitos curativos foram desenvolvidos, tais como os curativos tradicionais,

biológicos e os sintéticos. Estudos vêm demonstrando que curativos sintéticos (e biosintéticos, como os curativos Biobrane® e Suprathel®), têm sido muito utilizados, em detrimento aos curativos biológicos (Rahmanian-Schwarz *et al.*, 2011; Rahimi *et al.*, 2020). Segundo Rahimi *et al.* (2020), curativos biológicos podem apresentar problemas por ser de origem animal, logo os biossintéticos se tornaram alternativas mais eficazes em casos de queimaduras superficial de espessura parcial (Rahimi *et al.*, 2020).

2.2.1. Tipos de curativos

De maneira geral, a forma para se ter um processo de cicatrização eficaz envolve a limpeza da ferida ou queimadura. A qual pode ser feita com auxílio de métodos cirúrgicos como a remoção do tecido comprometido ou pelo método mais comum, o uso de curativos (Markiewicz-Gospodarek *et al.*, 2022). Os curativos podem ser divididos de acordo com a finalidade, sendo a mais convencional classificação: curativos como substitutos da pele, os tradicionais, curativos bioativos, os curativos interativos e enxertos dérmicos (Alven *et al.*, 2024).

Sabendo disso, os curativos tradicionais atuam protegendo a ferida contra contaminação e estacam o sangramento, sendo as gazes, bandagens e curativos de lã, os mais comuns. Já os substitutos da pele, são derivados de estrutura de células que atuam na cura regenerativa da pele (Alven *et al.*, 2024). Outro tipo de curativo, os enxertos, são biomateriais utilizados em lesões traumáticas e na reconstrução de queimaduras e cicatrizes. E os curativos interativos atuam acelerando o processo de cicatrização e impedindo a entrada de bactérias na ferida (Alven *et al.*, 2024).

No entanto, esses tipos de curativos possuem limitações, os enxertos e substitutos da pele não tem propriedades antimicrobianas, atuando mais na proteção da ferida. Por outro lado, os tradicionais e os interativos são eficientes combatendo bactérias e outros microrganismos patogênicos. Os curativos bioativos são os mais eficazes no processo de cicatrização, sendo os hidrogéis e hidrocoloides, também conhecidos como curativos não aderentes (Alven *et al.*, 2024; Punjataewakupt *et al.*, 2022).

Os curativos bioativos atuam não só na proteção e combate de microrganismos, mas também deixando o local da ferida úmido e evitando o ressecamento do exsudato, além de atuar na liberação de componentes bioativos, como medicamentos e materiais metálicos,

como as AgNPs (Alven *et al.*, 2024; Punkataewakupt *et al.*; Aramwit, 2022).

Apesar disso, ainda assim há a necessidade de curativos avançados antimicrobianos que permitam troca gasosa, facilidade na remoção, que tenha boa absorção de exsudato, acelerem o processo de cicatrização, mantenham área da ferida úmida. E alternativas com essas características podem ser encontradas nos hidrogéis, na quitosana (e derivados da quitina) e nos filmes de celulose bacteriana (Alven *et al.*, 2024; Markiewicz-Gospodarek *et al.*, 2022; Jenkhongkarn; *et al.*, 2023).

2.2.2. Curativos avançados

2.2.2.1. Hidrogéis ativos

Os hidrogéis são compostos à base de polímeros que possuem redes de macromoléculas hidrofílicas, encontradas nas formas natural e sintética. Os hidrogéis são conhecidos por ser um curativo que pode ser aplicado em qualquer parte do corpo, além de conferir boas propriedades para o processo de cicatrização de feridas, teor de água, boa cobertura de feridas, boa flexibilidade e alta sensibilidade ao ambiente fisiológico – alguns hidrogéis podem conter componentes anestésicos e anti-inflamatório (Markiewicz-Gospodarek *et al.*, 2022). No entanto, devido à alta aderência às feridas de queimaduras, podem gerar novas lesões e retardar o processo de cicatrização (Markiewicz-Gospodarek *et al.*, 2022).

2.2.2.2. Quitosana

A quitosana é um produto derivado da N-diacilação da quitina, encontrada no exoesqueleto de crustáceos, amplamente aplicada na área biomédica por ser biodegradável, não-toxica, antimicrobiana, biocompatível, antioxidante e bioadesiva. Pode ser encontrado na forma de fibras, como compósitos com algodão, como grânulos e esponjas. Sendo muito utilizado no desenvolvimento de curativos por ser um produto catiônico, auxiliando no processo de cicatrização de feridas (Alven *et al.*, 2024; Markiewicz-Gospodarek *et al.*, 2022).

A capacidade antimicrobiana da quitosana está associada com a otimização do processo de cicatrização, atuando na primeira etapa no processo de cicatrização, a hemostasia, auxiliando na coagulação sanguínea de feridas com sangramento. Mas também atua no

processo de granulação e na organização celular, mantém estéril o exsudato e evitando a contaminação das feridas (Alven *et al.*, 2024; Markiewicz-Gospodarek *et al.*, 2022). Somado a sua capacidade antibactericida, a quitosana também apresenta propriedades fungicidas e contra vírus, sendo bastante versátil e podendo ser encontrada na forma de filmes, soluções e géis (Alven *et al.*, 2024).

2.2.2.3. Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana consiste em uma rede uniforme de fibras de celulose, comumente produzida por bactérias, em particular, a bactéria *Gluconacetobacter xylinus*. Possui alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de ser capaz de reter grande quantidade de água. A CB difere da celulose vegetal pois não possui lignina, hemicelulose e outros componentes, e é obtida com maior pureza (Jenkhongkarn *et al.*, 2023).

Dentro de todas as aplicações da CB, que vão desde o campo dos dispositivos eletrônicos às aplicações biomédicas esse produto tem sido amplamente aplicado como material para curativos (Jenkhongkarn *et al.*, 2023). Sendo capaz também de atuar como um curativo bioativo, agindo como suporte para entrega de componentes antimicrobianos. Atuando como matriz para produtos com grande capacidade antibacteriana (Jenkhongkarn *et al.*, 2023).

Além disso, a CB tem sido material de investigação de diversos estudos na procura por agente redutores da prata, no processo de obtenção de AgNPs, a fim de conferir uma melhor atividade antimicrobiana, além de boas propriedades mecânicas (Jenkhongkarn; *et al.*, 2023). Jenkhongkarn e colaboradores (2023) descreveram que um dos métodos que vem sendo estudado é o da conversão de Ag^+ em AgNPs dentro da matriz da CB (Jenkhongkarn *et al.*, 2023). Em contrapartida, alguns estudos procuram outros meios para obter matérias compósitos de CB-AgNPs com boas propriedades antibacterianas – sendo o principal objeto da pesquisa deste projeto.

2.3. PRODUÇÃO DE AgNPs

Os métodos de síntese utilizados para produzir as AgNPs são diversos e variados, mas se enquadram em dois grandes grupos: os métodos “bottom-up” e “top-down”. No primeiro tem-se os métodos de obtenção físicos, pulverização catódica, moagem de bolas, ablação a

laser, entre outros (Bruna *et al.*, 2021). Por essa via, as AgNPs são altamente estáveis, no entanto, são métodos que exigem condições extremas de temperatura, pressão e alta energia, além de ser necessário instrumentos caros (Bruna *et al.*, 2021).

Por outro lado, nos métodos top-down, tem-se as sínteses químicas e biológicas. A síntese biológica das AgNPs é notavelmente descrita como a forma mais promissora, uma vez que não gera resíduos tóxicos, e utilizam componentes de origem biológica. Além disso, por esse método, as AgNPs são estáveis, tem uma alta solubilidade e bom rendimento, mas é um processo que demanda dos componentes envolvidos alta capacidade de estabilização e redutora, além disso exige a utilização de processos complexos para a obtenção (Bruna *et al.*, 2021).

Por fim, o método químico para síntese das AgNPs, classificado como o mais simples de executar capaz de ser reproduzível em grande escala. Para essa síntese, o método de obtenção é através da redução: eletroquímica, química ou pela utilização de sol-gel. A síntese de AgNPs por síntese química garante o formato esférico das nanopartículas e necessitam e um precursor metálico e de agentes redutores e estabilizantes. Por fim, o método escolhido para sintetizar as AgNPs influencia em propriedades como tamanho e estabilidade das AgNPs, além de influenciar sua capacidade antimicrobiana (Bruna *et al.*, 2021).

2.4. ESTABILIDADE E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AgNPs

Uma das grandes características que diferem as AgNPs dos outros derivados da prata se deve a natureza nanométrica, que confere propriedades únicas, tais como grande área superficial (que fornece alta energia superficial), alta relação superfície-volume, propriedades elétricas, ópticas e catalíticas. (Yu *et al.*, 2013; Bruna *et al.*, 2021; Jenkhongkarn *et al.* 2023).

Além disso, materiais em escala nanométrica possui uma grande versatilidade do ponto de vista da propriedade físico-químicas. As AgNPs além de versáteis exibem características antimicrobianas, aspectos morfológicos, tamanho e biocompatibilidade podem ser facilmente ajustados (Haidari *et al.*, 2020).

Todas essas propriedades refletem diferentemente nas aplicações das AgNPs. A alta área superficial permite que as AgNPs interajam em mais sítios ativos, interagindo de forma mais eficaz com microrganismos, promovendo alta reatividade com os patógenos

(Haidari *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2013). Foi relatado por Chen e colaboradores (2020) que o tamanho das partículas influencia no efeito tóxico aos microrganismos, e que AgNPs com tamanho de 5 a 20 nm tem uma maior atividade antibactericida.

No entanto, para que haja essas aplicações, e as AgNPs possam integrar materiais curativos e ser aplicados em áreas afetadas com feridas ou queimaduras. As AgNPs deve ser integrada a suportes sólidos ou compósitos, aumentando sua estabilidade impedindo a oxidação rápida (Jenkhongkarn *et al.*, 2023).

Sabendo que as propriedades influenciam nas características das AgNPs e de filmes curativos compostos pelo nanomaterial, Bruna e colaboradores (2021) elucidaram essa relação, apontando que a estabilidade tem um importante papel na atividade antibacteriana das AgNPs, onde o tamanho, o revestimento (camada externa da NPs, que interage com o meio) e a carga superficial desempenham importante papel. Se as AgNPs não possuírem alta estabilidade, as partículas agregam, diminuindo a área superficial, e portanto diminuindo a capacidade antimicrobiana (Bruna *et al.*, 2021).

Ainda, Bruna *et al.* (2021), descreveram que a estabilidade das AgNPs do ponto de vista da carga superficial, medida pelo potencial Zeta, deve ser superior a 30 mV ou inferior a -30mV, e para controlar esse valor, deve-se definir na escolha da síntese e dos seus parâmetros, com isso, evita-se a formação de aglomerados.

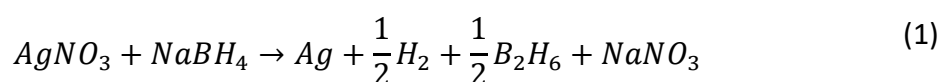
Segundo Bruna e colaboradores relataram em 2021, que o revestimento das AgNPs tem um papel fundamental, a escolha desse material influencia na capacidade antibacteriana, portanto, deve-se escolher um agente que já possua uma boa atividade contra bactérias, e que não gere toxicidade aos seres humanos. Esses compostos que podem ser utilizados são os polímeros e compostos orgânicos, como, por exemplo, a quitosana (Bruna *et al.*, 2021).

Sabendo que as AgNPs podem ser obtidas através de diferentes métodos, bem como a importância do uso matrizes poliméricas que tenham capacidades antimicrobianas no combate a microrganismo multirresistentes, a proposta do trabalho foi desenvolver um compósito de CB-AgNPs que seja eficiente contra bactérias patogênicas, inclusive as multirresistentes, e para isso, as AgNPs foram sintetizadas utilizando a quitosana como agente estabilizador. Além disso, diferente de muitos estudos onde esses compósitos são obtidos ao sintetizar as AgNPs na celulose bacteriana, elas foram incorporadas à CB após serem sintetizadas, e testes microbiológicos foram realizadas com o objetivo de determinar a eficácia contra bactérias patogênicas, que causam infecções na pele.

3. METODOLOGIA

3.1. SÍNTESE DE AgNPs

Para obtenção das nanopartículas de prata, utilizou-se o método de redução da prata com borohidreto de sódio (NaBH_4) em meio a um agente estabilizador, a quitosana (Freire *et al.*, 2015). Para isso, adicionou-se AgNO_3 0,11 M à quitosana sob agitação constante, seguida da adição do NaBH_4 0,8 M. Em seguida, a síntese permaneceu em agitação por mais 2 horas, seguida da adição de quitosana e agitação por mais seguida de 30 minutos. Por fim, foi obtido a amostra de AgNPs, um coloide de núcleos de AgNPs. A Equação 1 representa a reação de redução da prata por essa via de síntese.



Sabendo disso, buscou-se realizar diversas sínteses, para estudar a reprodutibilidade. Seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. Cada amostra receberá um código diferente, no qual o número faz referência ao número da síntese. Na Tabela 1, tem-se a descrição com os códigos da amostra.

Tabela 1 – Descrição das sínteses realizadas.

Numeração da síntese	Código
Síntese 1	Ag1
Síntese 2	Ag2
Síntese 3	Ag3
Síntese 4	Ag4
Síntese 5	Ag5

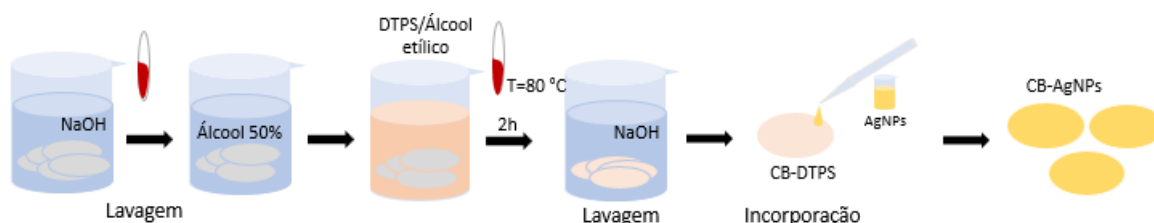
Fonte: O autor (2024).

3.2. PREPARAÇÃO DE FILMES CB-AgNPs

A primeira etapa para a incorporação consistiu na preparação e limpeza adequada da celulose bacteriana (CB), que foram obtidas comercialmente. Esta etapa consiste na limpeza com solução de NaOH em aquecimento, seguida de lavagem com álcool 50%. Após este

procedimento, colocou-se os filmes de CB em solução de DPTS (3-2-aminoetilamino-propil-trimetoxissilano) com álcool etílico, a 80 °C por 2 horas. Em seguida, os filmes de CB foram lavados com solução de NaOH, e ficaram prontos para a incorporação das AgNPs, de acordo com a metodologia adaptada de Alves (2019). Como as sínteses das AgNPs, mostradas na Tabela 1, foram preparadas com intervalo entre elas, e os testes microbiológicos exigem uma preparação que demanda tempo, a amostra Ag1, sintetizada primeiro, foi escolhida para fazer a incorporação. O esquema apresentado na Figura 3 mostra as etapas até a incorporação.

Figura 3 – Lavagem da CB e incorporação das AgNPs.



Fonte: O autor (2024).

Além do filme de CB-AgNPs, filmes controle para os testes microbiológicos também foram produzidos: filme de CB após o tratamento com DTPS (CB DTPS), e filmes de CB com quitosana incorporada (CB Q e CB DTPS Q). Após a preparação dos filmes, a etapa seguinte foi a de secagem em estufa, finalizada esta etapa, os filmes ficaram prontos para os testes seguintes, onde uma parte dos filmes seguiu para esterilização, para serem usados nos testes microbiológicos e outra parte foi utilizada para os demais testes. No Quadro 1 tem-se os filmes que foram preparados com a CB.

Quadro 1 – Filmes preparados a partir da CB.

Código do filme	Descrição
CB-AgNPs	Filmes de CB com AgNPs (Ag1) incorporado.
CB DTPS	Filme de CB após tratamento com DTPS
CB Q	Filme de CB com quitosana incorporada.
CB DTPS Q	Filme de CB DTPS com quitosana incorporada.

Fonte: O autor (2024).

3.3. CARACTERIZAÇÃO

Para realizar as caracterizações das AgNPs foram escolhidas as técnicas de Espectroscopia no ultravioleta visível UV-visível, para verificar a faixa de absorção e o comprimento de onda em que a luz é absorvida e transmitida. Para medir o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs será utilizado a técnica de espalhamento dinâmico de luz - DLS. A quantidade de Ag presente nas amostras sintetizadas bem como nos filmes de celulose bacteriana com as nanopartículas incorporadas será quantificado por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES). Além disso, serão realizados testes de lixiviação para verificar se as AgNPs foram incorporadas no filme de CB.

3.3.1. Espectroscopia no UV-Visível (UV-vis)

A técnica de UV-visível usa o princípio da lei de Lambert-Berr: “A intensidade de um feixe de luz monocromático decresce exponencialmente à medida que a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente”, que pode ser expressa pela Equação 2.

$$I = I_0 10^{-kc} \text{ ou ainda } T = e^{-a.l.C} \quad (2)$$

Onde

I é a intensidade da luz transmitida;

I_0 é a intensidade da luz incidente;

k é a constante denominada coeficiente de absorção;

c é concentração do meio absorvente;

T é a transmitância;

e é o logaritmo Natural de Euler;

a é uma constante;

l é a espessura da solução;

C é concentração da solução.

Sabendo dessa expressão, e manipulando matematicamente, deixando na forma do logaritmo na base 10, $\log_{10}$, tem-se que a expressão $-\log I/I_0$ que resta é a densidade óptica

ou absorvância (A), comisso, pode-se reescrever na foram que estabelece uma relação entre a absorvância (A) e a transmitância (T) que um feixe de luz incidente é capaz de gerar. A Equação 3, representa essa relação.

$$A = -\log_{10} T \quad (3)$$

O equipamento usado foi o espectrofotômetro, trabalhando na faixa de 400 - 1200 nm, que usa lâmpadas de deutério-halogênio, usando cubetas transparentes de poliestireno. Tendo as amostras sintetizadas, o procedimento para realizar as medidas consistiu em diluir determinados volumes das amostras com 3 mL de água destilada até que o pico do epectro atingisse o valor de absorvância próximo de 1.0 u. a. Após as análises no espectrofotômetro, os dados foram tratados no software Origin 2018, e assim os espectros de absorção foram gerados. Para obter os espectros utilizou-se a função de plotagem do software e o espectro foi ajustado de forma que a curva que o representa não tivesse resquícios dos valores referentes aos ruídos

3.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica de DLS (Dynamic light scattering) foi utilizada para determinar o diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas. Esta técnica usa o princípio da equação Stokes-Einstein, representada na Equação 4.

$$D_h = \frac{k_b T}{3\pi\eta D_t} \quad (4)$$

Onde

D_h é o diâmetro hidrodinâmico da partícula

k_b é a constante de Boltzmann

T é a temperatura termodinâmica, essa grandeza pode ser controlada

η é a viscosidade dinâmica

D_t é o coeficiente de difusão translacional

Os parâmetros são definidos no software Bic Particle Solutions para as amostras. Para as nanopartículas de prata, é definido o ângulo de 90° entre o detector e o feixe incidente. 50 µL de amostras é diluído em 2 mL de solução de KCl. A análise foi realizada em quadruplicata usando dois modelos diferentes, MSD (multimodal size distribution) e Lognormal. Neste relatório, os resultados são apresentados usando os dois modelos, obtendo a distribuição de diâmetro baseado em Intensidade, Volume e Número. Tendo esses resultados, foi avaliado qual modelo e distribuição se adequa com as amostras, apoiado com os resultados de UV-vis. Com os resultados obtidos, utilizou-se o software Origin (2018) para analisar as curvas geradas e obter os valores.

3.3.3. Quantificação de prata

Todas as amostras: sínteses de AgNPs, filmes de CB e testes de lixiviação foram analisadas em triplicata. Para a quantificação de prata nos filmes de CB, eles foram preparados da seguinte forma: os coloides das sínteses de AgNPs e os filmes secos (CB AgNPs, CB Q e CB DTPS) foram colocados em um tubo de ensaio com HNO₃ 65%, seguida da posterior digestão a 80 °C, em seguida preparou-se a amostra para a medida em um balão volumétrico (25 ml) com água destilada, metodologia adaptada de Misirli (2021).

As análises de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) foram realizadas na Central Analítica, no Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE. Para caracterização elementar de prata por ICP-OES, um espectrômetro Optima 7000 DV (Perkin Elmer, USA) como gás argônio foi usado. Esta técnica baseia-se na detecção da radiação eletromagnética emitida por átomos neutros ou íons excitados nas regiões do espectro eletromagnético visível e ultravioleta. O equipamento foi operado em configuração axial. A faixa de comprimento de onda foi de 160 a 900 nm. O sistema de introdução de amostra emprega câmara Scott e nebulizador fluxo cruzado usando gás de argônio.

3.3.4. Testes de Lixiviação de Ag nos filmes de Celulose Bacteriana

Para realizar os testes de lixiviação, duas metodologias, adaptadas de Alves (2019), foram utilizadas: (a) análise da lixiviação na água em que os filmes foram colocados pela quantificação de Ag na água através da técnica de ICP-OES. Nesse teste, os filmes foram colocados em água sob aquecimento. (b) análise de lixiviação de Ag nos filmes em uma solução com valor de pH específico previamente ajustado sem aquecimento.

3.3.4.1. Lixiviação de Ag nos filmes CB-AgNPs

Para verificar a liberação de Ag na água a partir dos filmes, em um béquer 100 mL foi preenchido com água destilada e colocado para aquecer a temperatura de 80-100 °C, colocando em seguida os filmes CB-AgNPs, segundo metodologia adaptada de Alves (2019). Após isso foi recolhida as alíquotas e preparadas soluções para quantificação de Ag pela técnica ICP-OES. A preparação foi feita com intervalos de tempo, para verificar e acompanhar a lixiviação ao longo do tempo. Se dando da seguinte forma: após o tempo de lixiviação, uma alíquota de cada amostra (1 mL) foi colocada num balão volumétrico 25 mL acrescentando 1 mL de HNO₃ 65% e completando com água destilada.

3.3.4.2. Lixiviação em solução com pH controlado

Para o teste de lixiviação de Ag os filmes CB-AgNPs foram colocados em soluções de pH de 2,0 a 12,0, calibradas previamente. Tendo feito isso, retiraram-se alíquotas de 1mL da água em tempos determinados para o preparo da amostra e quantificação de Ag por ICP-OES, seguindo a mesma metodologia para preparação do teste de lixiviação em água.

3.4. TESTES MICROBIOLÓGICOS

Para submeter os filmes de CB-AgNPs e as amostras sintetizadas de AgNPs, antes se fez necessário submeter a um processo de esterilização, neste caso, raios gama. As amostras sintetizadas foram previamente filtradas em filtros estéreis 0,20 µm e, juntamente com os filmes CB-AgNPs, CB Q, CB DTPS Q e CB DTPS foram colocados em embalagem específica e selados. Em seguida, a etapa de esterilização foi realizada no Departamento de Energia Nuclear - DEN da UFPE. Após desse processo, as amostras foram encaminhadas para o LIKA/UFPE, onde os testes microbiológicos foram conduzidos. Os testes antibacterianos consistiram na determinação da concentração inibitória mínima (MIC/CIM), concentração bactericida mínima (MBC/CBM) (para as amostras de AgNPs) e testes de disco de inibição (para os filmes CB-AgNPs). Os testes foram conduzidos para bactérias gram-positivas e gram-negativas, para verificar a capacidade inibitória nos dois tipos de bactérias. Foram testadas para: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) (bactérias Gram-negativas) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Staphylococcus aureus* MRSA (*S. aureus* MRSA) (bactérias Gram-positivas).

3.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC/CIM) e Concentração Bacteriana Mínima (MBC/CBM)

Para determinar o MIC e MBC das amostras de AgNPs o método de microdiluições foi utilizado. Inicialmente, o caldo Mueller Hinton (MHC) foi adicionado na placa de microdiluição de 96 poços, seguida da adição da AgNPs (amostra Ag1) pelo método de diluição seriada, onde a amostra diluída foi acrescentada nos primeiros poços da placa, e em seguida a partir dos primeiros poços, os outros seguintes foram sendo preenchidos, diluindo pela metade do anterior. Em seguida, as suspensões bacterianas foram ajustadas para a densidade de 0,5 da escala de McFarland e então foram depositadas nos poços, obtendo uma concentração de 10^5 UFC/poço. Seguiu-se então para incubação na estufa a 35 °C por 24 h. Passado essa etapa, foi analisado em que poço as AgNPs foi capaz de inibir mais de 90% do crescimento bacteriano. Com isso, a concentração inibitória mínima, ou seja, a menor concentração do agente antimicrobiano (neste caso, as AgNPs) foi determinada, seguindo a

metodologia adaptada de Li *et al.* (2023).

Para determinar a concentração bactericida mínima, uma pequena alíquota dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano e inoculada em placas contendo ágar Mueller Hinton (MHA), seguindo então para etapa de incubação por 35° C por 24h. Após isso, verificou-se se em placas não apresentaram crescimento bacteriano, com isso determinou-se a concentração mínima bactericida, ou seja, a mínima concentração de agente antimicrobiano que foi necessário para matar determinada bactéria patogênica, seguindo a metodologia adaptada de Li *et al.* (2023).

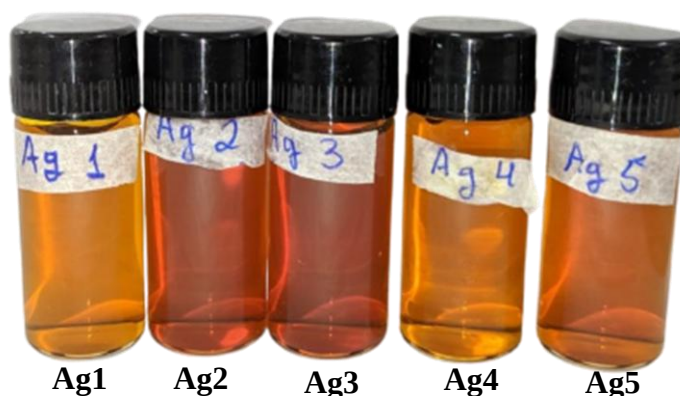
3.4.2. Teste de disco de inibição

Para o teste de disco de inibição os filmes foram colocados em placas contendo meio de cultura MHA. Em seguida, as suspensões bacterianas foram ajustadas para a densidade de 0,5 da escala de McFarland e inoculadas nas placas contendo o meio de cultura MHA, seguida da incubação a 35° C por 24h em estufa. Após isso, foi medido o diâmetro médio de inibição formado pelos filmes (representado pelo local em que não houver crescimento bacteriano), segundo a metodologia adaptada de Li *et al.* (2023).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cinco amostras de AgNPs foram sintetizadas e são mostradas na Figura 4. Nota-se que, em relação a coloração, três grupos de cores pôde ser observado, o primeiro composto pelas amostras Ag1 e Ag4, com coloração levemente laranja-claro, o segundo grupo composto pelas amostras Ag2 e Ag3, com coloração avermelhada, e por fim, o amostra Ag5, com uma coloração mais laranja-escuro.

Figura 4 – Amostras de AgNPs sintetizadas.



Fonte: O autor (2024).

Segundo Almeida *et al.* (2015), uma solução de AgNPs sem aglomerados deve apresentar uma coloração amarelo-clara, as amostras Ag1 e Ag4 apresentaram cor mais próxima da descrita, já para as amostras Ag1, Ag3 e Ag5, a coloração mais escura, pode indicar a formação aglomerados com maiores diâmetros.

Com as amostras sintetizadas, seguiu-se para a caracterização e a avaliação da reprodutibilidade do método usado para obter as AgNPs. Uma vez que tenha sido elucidado as propriedades, uma amostra será escolhida para dar seguimento aos testes antibacterianos.

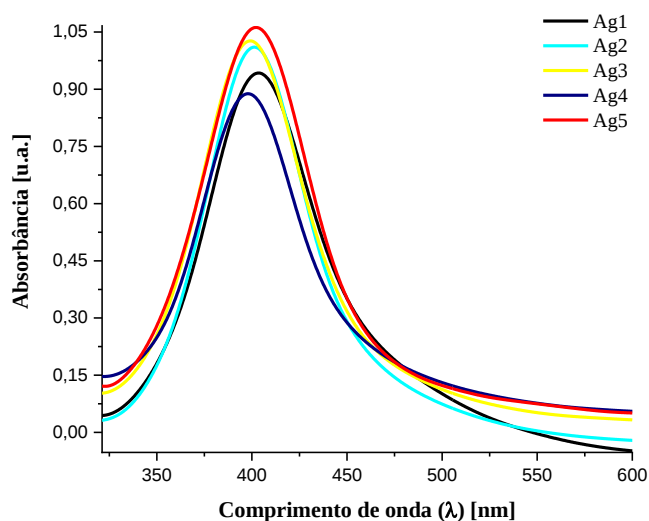
4.1. ESTABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Para avaliar a estabilidade e reprodutibilidade, caracterizações foram feitas: para determinar o comprimento de onda e FWHM nos espectro de UV-vis; o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs por DLS e a concentração de Ag nas amostras.

4.1.1. Espectroscopia de UV-vis

Os espectros gerados para as amostras de AgNPs são relatados na Figura 5.

Figura 5 – Espectros para as amostras de AgNPs.



Fonte: O autor (2024).

Com os espectros gerados, os valores de comprimento de onda na máxima absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) foram obtidos, juntamente com os valores para FWHM, ambos resultados estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados para o comprimento de onda e FWHM para as amostras de AgNPs.

Amostra	Comprimento de onda [$\lambda_{m\acute{a}x}$] (nm)	FWHM (nm)
Ag1	403,58	77,03 $\pm$ 0,52
Ag2	401,46	61,63 $\pm$ 0,37
Ag3	399,08	63,31 $\pm$ 0,34
Ag4	398,03	60,59 $\pm$ 0,40
Ag5	401,46	64,34 $\pm$ 0,25

Fonte: O autor (2024).

Com os espectros mostrados na Figura 4, nota-se que as amostras Ag2, Ag3 e Ag5 apresentaram picos de absorção maiores em relação às amostras Ag1 e Ag4. Já com os resultados da Tabela 2, nota-se que o valor de $\lambda_{m\acute{a}x}$ para as amostras Ag2 e Ag5 foi de 401,46

nm e apenas para amostra Ag1 esse valor se distancia dos demais resultados, apresentando um valor de 403,58 nm.

Antunes *et al.*, (2013) descreveram que para AgNPs utilizando essa rota de síntese, o valor teórico para o comprimento de onda deveria ser de 400 nm; com os resultados obtidos calculou-se um o erro relativo abaixo de 1% para todas as amostras, onde a amostra Ag3 apresentou o menor erro, calculado em 0,23%.

Observou-se que de acordo com os espectros da Figura 5 e os dados da Tabela 2, os resultados de FWHM demonstraram que apenas para a amostra Ag1 o valor diferiu dos demais, apresentando um valor de 77,03 nm. Solomon *et al.* (2007) relataram que, para AgNPs, o $\lambda_{m\acute{a}x}$ varia de acordo com o diâmetro das nanopartículas, descreveram ainda que para nanopartículas com diâmetro na faixa de 10-15 nm, o $\lambda_{m\acute{a}x}$ deve-se encontrar na faixa de 395-405 nm.

Ainda , Antunes *et al.* (2013) relataram que, para AgNPs esféricas com diâmetro de até 40 nm, o $\lambda_{m\acute{a}x}$ deveria ser de 400 nm. E segundo Nascimento (2012), quanto maior o valor do da FWHM, maior é distribuição de tamanho e mais “alargada” são as curvas que representam os espectros. Com isso, notou-se que todas as amostras apresentaram valores dentro da faixa de 395-405, com pequenos valores de FWHM, (indicado por “espectros mais estreitos”); Com isso, pode-se afirmar que as AgNPs sintetizadas se apresentam como uma suspensão monodispersa, que segundo Bechtold (2011), é caracterizada por estrita faixa de distribuição de tamanho.

4.1.2. Diâmetro hidrodinâmico por DLS

De acordo com o trabalho de Bhattacharjee (2016), os resultados devem seguir o modelo de intensidade. Com a distribuição lognormal foi possível obter os valores para os picos das curvas, já pela distribuição multimodal, observou-se a formação de mais de um pico, e dois grupos foram separados: um composto por nanopartículas de até 100 nm e outro com nanopartículas variando de 100 a 300 nm. Além disso, outro parâmetro importante a ser analisado junto com os valores de diâmetro, é o PDI (índice de polidispersidade). Os resultados para ambas as distribuições são mostrados na Tabela 3. A Figura 6 tem-se as curvas para as

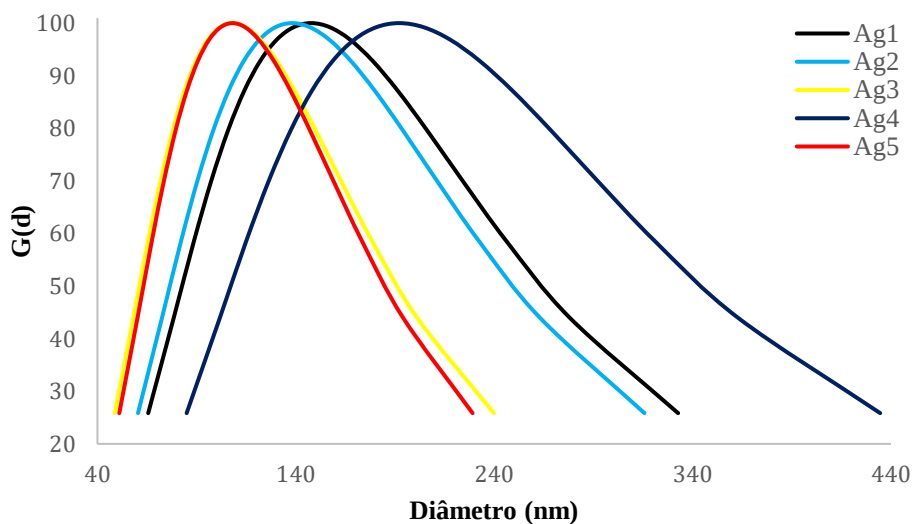
amostras de AgNPs para distribuição lognormal e na Figura 7 tem-se as curvas para a distribuição MSD. No apêndice 4.1.2 tem-se as Figuras para a distribuição MSD de cada amostra.

Tabela 3 – Resultados para o diâmetro hidrodinâmico (D_H) para as AgNPs.

Amostra	Diâmetro médio Lognormal (nm)			Diâmetro médio MSD						PDI		
	Intensidade			Intensidade (d ≤ 100 nm)		Intensidade (100 nm < d < 300 nm)						
	Ag1	126,50	±	2,38	19,21	±	11,17	143,92	±	31,26	0,27	±
Ag2	103,25	±	0,50	63,57	±	31,28	113,42	±	13,44	0,23	±	0,01
Ag3	108,00	±	1,63	40,47	±	33,65	153,97	±	43,13	0,26	±	0,01
Ag4	192,25	±	5,19	41,96	±	37,49	253,96	±	42,77	0,28	±	0,02
Ag5	108,09	±	2,28	22,93	±	19,54	132,33	±	51,61	0,23	±	0,01

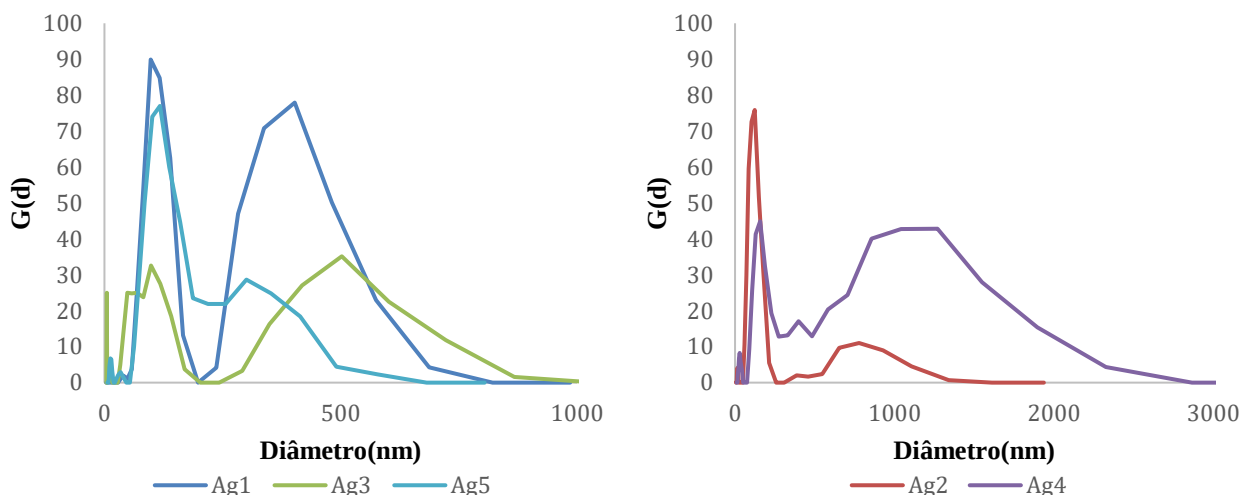
Fonte: O autor (2024).

Figura 6 – Distribuição de diâmetro (intensidade) das AgNPs pela distribuição lognormal.



Fonte: O autor (2024).

Figura 7 – Distribuição de diâmetro (intensidade) das AgNPs pela distribuição MSD.



Fonte: O autor (2024).

Com os resultados da Tabela 3, nota-se que para a distribuição lognormal Ag2, Ag3 e Ag5, apresentaram valores de diâmetro hidrodinâmico próximos, na faixa de 103-108 nm, indicando a reprodutibilidade da síntese, enquanto para as amostras Ag1e Ag4 os valores para o diâmetro hidrodinâmico se distanciaram das demais, apresentando D_H , respectivamente, de 126 nm e 192,25 nm. Todos esses valores se distanciam dos valores indicados para as faixas de absorção no UV-vis, onde para os resultados obtidos de $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 400 nm, o diâmetro deveria estar na faixa de até 40 nm (Antunes *et al.*, 2013).

No entanto, o trabalho publicado por Bhattacharjee (2016) relata que o D_H mede o diâmetro de nanopartículas solvatadas e dispersas, e em geral, se distanciam dos valores apresentados por técnicas como MET (os valores relatados para o diâmetro médio, em geral, se baseia nessa técnica – para partículas na escala nanométrica) que necessitam das amostras secas e se baseiam na quantidade de elétrons que “atingem” as nanopartículas e são transmitidos. Logo, uma possível razão para os valores de D_H se encontrarem distantes do valor do diâmetro médio, pode ser a solvatação. Além disso, com as curvas mostradas na Figura 5, é possível notar que as amostras Ag1 e Ag2 possuem uma distribuição similar, assim como as amostras Ag 3 e Ag5, e apenas a amostra Ag4 apresenta uma curva distinta das outras. Essas similaridades, juntamente com os valores apresentados na Tabela 3, indicam uma boa reprodutibilidade do método de síntese.

Ademais, avaliando através dos resultados obtidos para distribuição MSD nota-se que os valores apresentados na Tabela 3 fornece mais resultados sobre a distribuição de tamanho das AgNPs, onde, a princípio, nota-se que para essa distribuição há valores abaixo de 100 nm, exceto para amostra Ag2, todas as outras apresentaram diâmetro hidrodinâmico de cerca de 40 nm, sendo assim mais coerentes com os que é proposto por Antunes (2013).

Mas para essa distribuição, também há valores maiores, na faixa de 100-300 nm, sendo as amostras Ag1, Ag3 e Ag5, com valores mais próximos, apresentando uma variação de 132-154 nm, e assim como para a distribuição lognormal, a amostra Ag4 se distanciou das demais, apresentando um valor de diâmetro hidrodinâmico de 254 nm. Logo, nas duas distribuições, valores entre 100 e 250 nm foram obtidos, sendo um forte indicativo de aglomeração das AgNPs.

Ainda, avaliando os gráficos da Figura 7, observou-se que as amostras Ag1, Ag3 e Ag5, apresentaram valores de D_H acima de 300 nm, e as amostras Ag2 e Ag4, valores de D_H acima 1000 nm, mas esses foram desconsiderados na análise, uma vez que, valores tão altos para o D_H podem ser originados de resquícios dos componentes da síntese.

Para os resultados obtidos para o PDI, notou-se que os valores foram similares, com as amostras Ag2 e Ag5 apresentado o mesmo valor, de 0,23, e a amostra Ag4 apresentado o maior valor, de 0,28. Ainda, segundo Garcia *et al.* (2021) e Lopes (2017), quanto menor o valor do PDI, mais monodisperso e homogêneas serão as nanopartículas. Logo, nota-se com os resultados que as AgNPs sintetizadas possuem baixa polidispersidade, sendo um forte indicativo que o sistema é homogêneo e monodisperso.

4.1.3. Concentração de Ag por ICP-OES

Para determinar a concentração de Ag nas amostras utilizou-se a técnica de A Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES). Foram feitas análises para determinar as concentrações nas soluções, nos filmes de CB-AgNPs e nos testes de lixiviação.

4.1.3.1. Concentração de Ag nas amostras de AgNPs

Sabendo que na rota de síntese utilizada, as AgNPs produzidas possuem uma concentração teórica de 600 mg/L, através da análise de ICP-OES, as concentrações reais nas amostras foram determinadas e apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração de Ag nas amostras de AgNPs.

Amostra	Concentração Ag (mg/L)		
Ag1	646,17	±	3,35
Ag2	615,70	±	13,65
Ag3	585,07	±	27,02
Ag4	593,23	±	25,69
Ag5	624,07	±	19,99

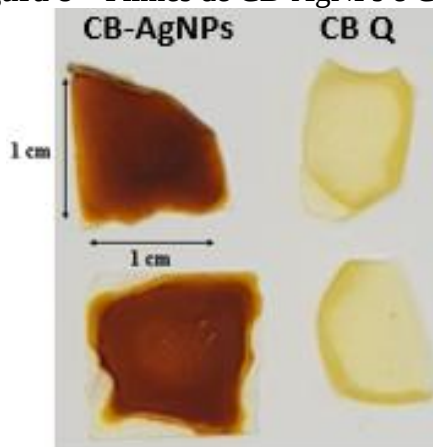
Fonte: O autor (2024).

Com os resultados da Tabela 4 pode-se avaliar para as amostras Ag1 e Ag5 o valor da concentração se distanciou das demais, com uma concentração de 646 e 624 ppm de Ag, respectivamente, apresentando um erro de 8% e 4%, respectivamente referente ao valor da concentração teórica. Verificou-se ainda que as amostras Ag2, Ag3 e Ag4 apresentaram valores de concentração mais próximos do valor da concentração teórica, com 616, 585 e 593 ppm de Ag, respectivamente, apresentando um erro entre 1-3%.

4.1.3.2. Concentração de Ag nos filmes CB-AgNPs

A amostra Ag1 foi utilizada para fazer a incorporação nos filmes de CB e assim foram conduzidos os próximos testes. Tendo feito o tratamento inicial dos filmes de CB (comercial), a amostra Ag1 foi incorporada aos filmes. A Figura 8 mostra alguns dos filmes de celulose bacteriana com as AgNPs incorporadas (CB-AgNPs) produzidos, juntamente com os filmes de CB com quitosana 1% incorporadas (CB Q).

Figura 8 – Filmes de CB-AgNPs e CB-Q.



Fonte: O autor (2024).

Para o filme CB-AgNPs, o valor médio da concentração obtido foi de 178,67 mg/L de Ag no filme de CB-AgNPs.

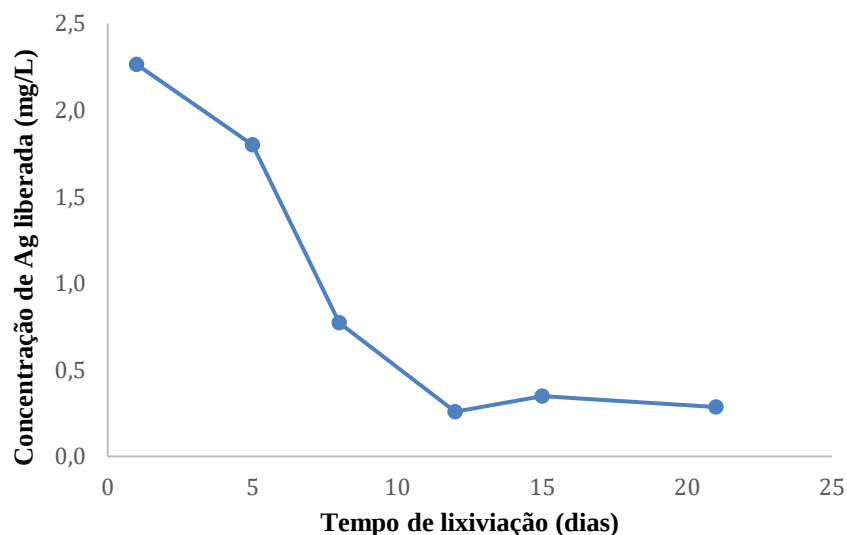
4.1.4. Lixiviação em água

Para os testes de lixiviação dos filmes de CB-AgNPs em água alíquotas foram coletadas e preparadas para análises em ICP-OES para quantificar a concentração de Ag liberada com o tempo. Após feita a análise, os resultados para a concentração foram corrigidos de modo a representar o valor real da concentração de Ag liberada. Os resultados obtidos para alíquotas coletadas no mesmo dia não mostraram diferenças significativas, logo, os resultados foram representados em função dos dias de liberação. Na Tabela 5 tem-se os resultados para a concentração de Ag liberada em função dos dias, e na Figura 9, tem-se a curva para o teste. No apêndice 4.1.4 tem-se a Tabela com todos os valores de concentração obtidos em função das horas, bem como o gráfico da variação da concentração de Ag liberada em função das horas.

Tabela 5 – Concentração de Ag liberada na água durante a lixiviação.

Tempo de lixiviação (dias)	Concentração de Ag liberada (mg/L)
1	2,264 ± 0,508
5	1,799 ± 0,320
8	0,771 ± 0,030
12	0,258 ± 0,042
15	0,348 ± 0,052
21	0,285 ± 0,061
70	0,213 ± 3,690

Fonte: O autor (2024).

Figura 9 – Liberação de Ag dos filmes CB-AgNPs em água.

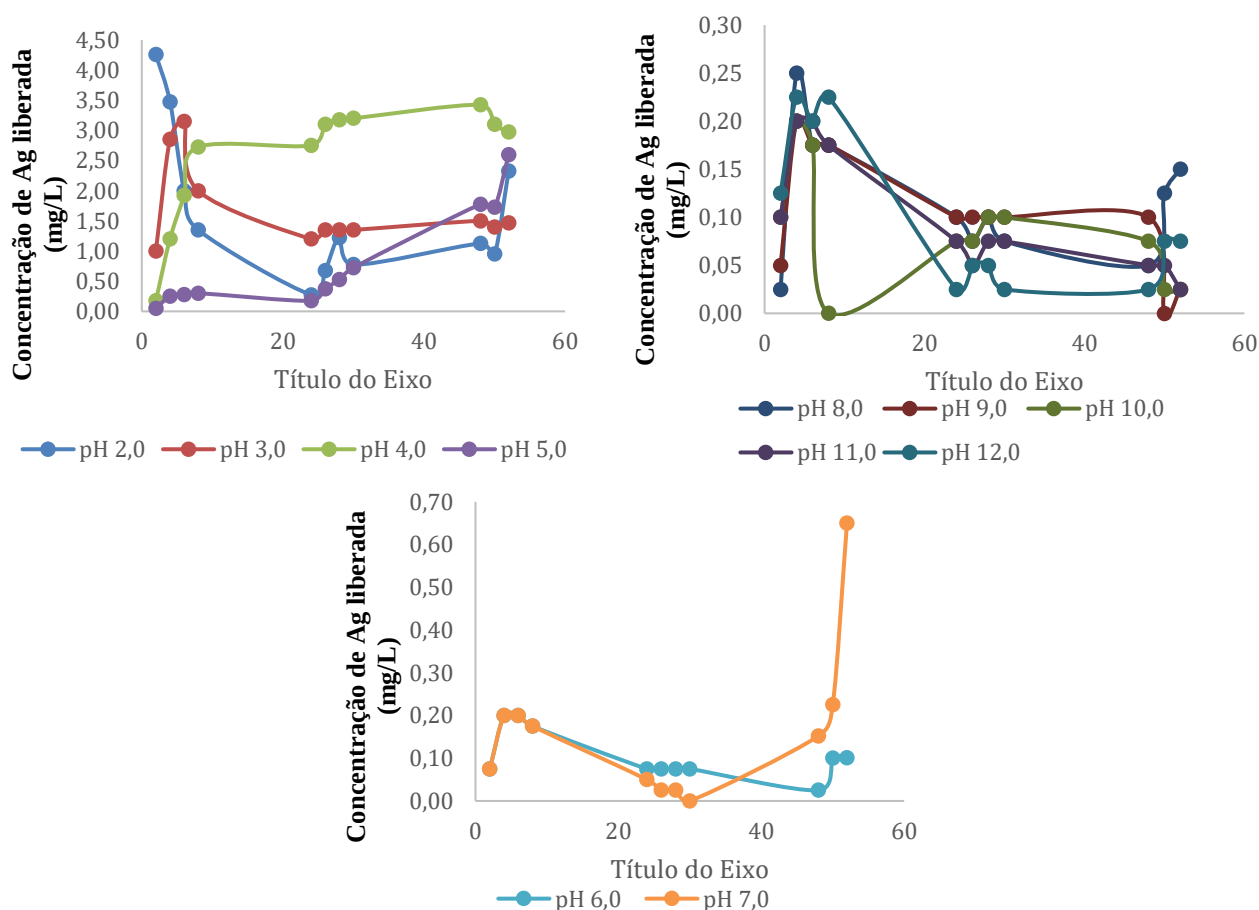
Fonte: O autor (2024).

Com os resultados da Tabela 5 e Figura 9, observou-se que a medida em que o filme CB-AgNPs ficou exposto a lixiviação, menor foi a liberação de Ag na água, indicando que com o tempo a degradação é menor. Além disso, notou-se que os valores para concentração de Ag liberada variaram entre 0,2-2,3 mg/L, indicando que as AgNPs foram bem incorporadas, visto que a concentração de Ag no filme foi de cerca de 178 mg/L, e que a liberação foi mínima das AgNPs dos filmes.

4.1.5. Lixiviação em solução com pH controlado

De forma similar ao teste de lixiviação em água, também foi estudado o efeito do pH nos filmes de CB-AgNPs. Os filmes expostos as soluções de pH controlada, variando de 2 a 12, e com o tempo alíquotas foram retiradas e preparadas para quantificar a Ag liberada na solução. No apêndice 4.1.5 tem-se os dados completos da concentração de Ag liberadas nas soluções, juntamente com os gráficos que ilustram a liberação. Na Figura 10 tem-se os gráficos para a variação da concentração de Ag liberada nas soluções. E de modo a sintetizar, os resultados mais significativos, como a concentração de Ag liberado no 1º dia exposto, no último dia e o maior valor de concentração são demonstrados na Tabela 6.

Figura 10 – Liberação de Ag dos filmes CB-AgNPs em solução com pH controlado.



Fonte: O autor (2024).

Tabela 6 – Resultados para concentração de Ag liberada em solução com pH controlado.

Maior concentração de Ag liberado	Menor concentração de Ag Liberado	Concentração de Ag no último dia	pH da solução
4,257 ± 0,002	0,275 ± 0,000	0,900 ± 0,001	2
3,150 ± 0,001	1,000 ± 0,002	1,175 ± 0,001	3
3,425 ± 0,001	0,175 ± 0,001	2,500 ± 0,000	4
3,000 ± 0,000	0,050 ± 0,000	3,000 ± 0,000	5
2,025 ± 0,000	0,025 ± 0,001	2,025 ± 0,000	6
3,425 ± 0,000	0,000 ± 0,000	3,425 ± 0,000	7
2,600 ± 0,000	0,025 ± 0,000	2,600 ± 0,000	8
1,050 ± 0,000	0,000 ± 0,000	1,050 ± 0,000	9
0,200 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,075 ± 0,000	10
0,200 ± 0,000	0,025 ± 0,000	0,075 ± 0,000	11
0,225 ± 0,000	0,025 ± 0,000	0,100 ± 0,000	12

Fonte: O autor (2024).

Analisando a Figura 10 e os resultados apresentados na Tabela 6, notou-se primeiramente que os valores da concentração de Ag liberada nas soluções com o tempo é baixo em relação a concentração de Ag nos filmes. Ainda, verificou-se que para a faixa de pH de 2,0 a 5,0, a liberação de Ag é maior, com a maior concentração de Ag liberada em solução com pH 2,0, apresentando um valor de 4,2 mg/L.. Avaliando com o tempo de exposição, para as soluções ácidas, a liberação tende a ser maior quando há o contato direto, no primeiro dia em que os filmes são colocados em contato com as soluções, exceto para a solução com pH 2,0, que nas primeiras horas já apresentou uma queda na liberação, mas assim como as outras soluções, com o tempo, a liberação de Ag retorna a aumentar.

Na faixa de pH neutro, soluções com pH 6,0 e 7,0, notou-se que inicialmente a liberação de Ag foi pequena, mas, especificamente, na solução de pH 7,0, com tempo de exposição maior, a liberação de Ag retornou a aumentar. Com a Tabela 6 observou-se também que para a faixa de pH de 5,0-8,0 a maior concentração liberada ocorreu na exposição máxima. Para soluções com pH básico notou-se que a liberação de Ag apresentou maiores valores nas horas iniciais do contato dos filmes com as soluções, mas que com o tempo de exposição a liberação voltou a diminuir.

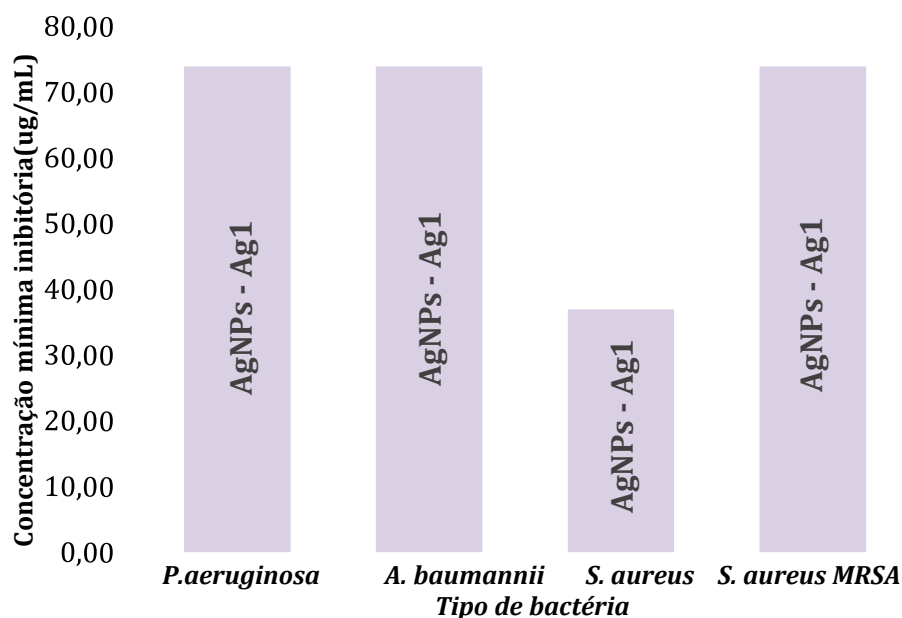
Para a solução com pH 10,0, um ponto destoou da curva e dos outros perfis de liberação, onde a liberação atingiu o valor de 0 ppm, logo após uma taxa de liberação de Ag mais alta, pode-se então afirmar que houve algum erro, na coleta da alíquota, ou mesmo na preparação da solução para análise no ICP-OES. Por fim, com os testes realizados para liberação de Ag em soluções com pH controlado demonstraram que as AgNPs foram bem incorporadas aos filmes de celulose bacteriana, e mesmo a liberação sendo mais alta em soluções com pH menores que 5,0, todos os valores para a liberação apontaram que a liberação de Ag é mínima.

4.2. TESTES MICROBIOLÓGICOS

4.2.1. MIC e MBC para as amostras AgNPs

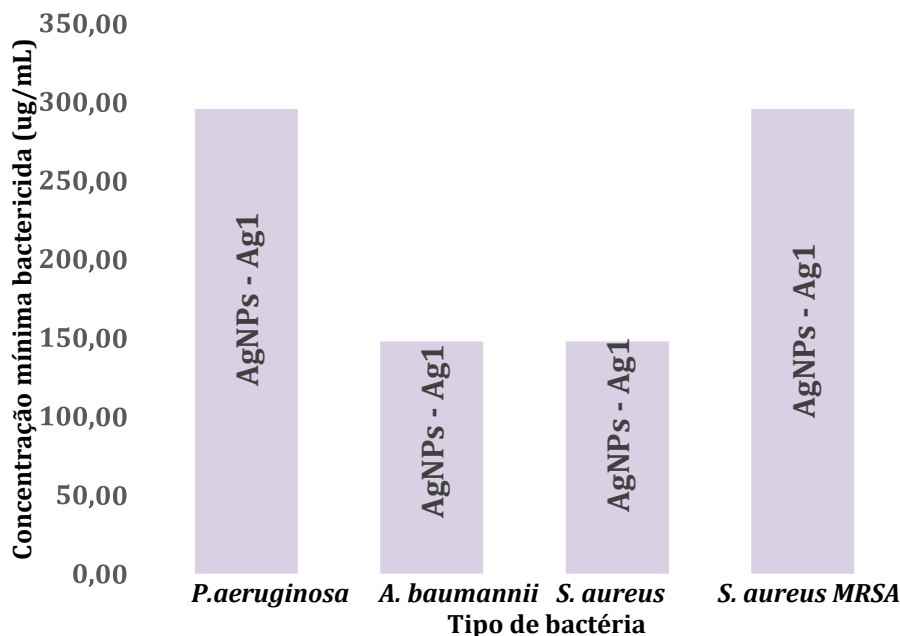
Os resultados para MIC e MBC foram apresentados na Figura 11 e 12, respectivamente.

Figura 11 – Concentração mínima inibitória em ug/mL para AgNPs.



Fonte: O autor (2024).

Figura 12 – Concentração mínima bactericida em ug/mL para AgNPs.



Fonte: O autor (2024).

Através da Figura 11 notou-se que não houve variação no valor da MIC das AgNPs para inibição para as duas bactérias Gram-negativas. A concentração de AgNPs foi maior para esses grupos de bactérias, uma vez que esses microrganismos são mais resistentes que as bactérias Gram-positivas. Por fim, observou-se uma diferença entre as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus MRSA*. Na segunda espécie, o valor da MIC foi consideravelmente maior, corroborando com os dados da literatura como uma espécie mais resistente (Li *et al.*, 2023).

Já na Figura 12, os valores mostraram que o MBC é maior em relação ao MIC, indicando que para matar as células bacterianas foi necessária uma maior concentração de AgNPs. Observou-se que para a AgNPs este valor de MBC variou dependendo do grupo da bactéria, apresentando valores maiores para as bactérias *Staphylococcus aureus MRSA* (Gram-positiva) e a *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa).

4.2.2. Teste de disco de inibição para CB-AgNPs

Para os testes do disco de inibição foi utilizada a amostra CB-AgNPs (Ag1), juntamente com os filmes controle (CB DTSP, CB Q e CB DTS Q), as bactérias testadas foram as mesmas utilizadas nos testes de MIC e MBC. Os resultados para os diâmetros médios foram representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores para o diâmetro médio do disco de inibição.

Bactérias	CB AgNPs	CB DTSP (Controle)
<i>P. aeruginosa</i>	11 mm	0 mm
<i>A. baumannii</i>	11 mm	0 mm
<i>S. aureus</i>	19 mm	0 mm
<i>S. aureus MRSA</i>	15 mm	0 mm

Fonte: O autor (2024).

Pelos resultados da Tabela 7 notou-se que os filmes de CB-AgNPs foram capazes de inibir a atividade bactericida. Observou-se principalmente que os filmes de CB isolados (CB controle) não foram capazes de inibir os grupos de bactérias testados, ou seja, a celulose não possuiu capacidade inibitória, e apenas após adicionar as AgNPs que a inibição aconteceu. Foi perceptível que a inibição foi maior em bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus MRSA*), se comparado as bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*), corroborando com as análises realizadas anteriormente. No teste do disco, as bactérias as gram-negativas apresentaram os valores do diâmetro de inibição de 11 mm, e para as gram-positivas o maior valor foi de 19 mm, para a *S. aureus*,

Por fim, a partir dos três testes, MIC e MBC para as amostras de AgNPs, e do teste do disco de inibição para os filmes de CB-AgNPs, pode-se ver que tanto as nanopartículas de prata, como os filmes de celulose bacteriana incorporados com estas partículas foram capazes de inibir a atividade de diversos tipos de bactérias, sejam Gram-positivas ou Gram-negativas.

5. CONCLUSÃO

Através da determinação das propriedades das AgNPs foi possível concluir que as AgNPs sintetizadas foram estáveis. Pelos espectros de UV-vis foi possível observar que todas as amostras apresentaram espectros similares, com comprimentos de onda máximo variando entre 398 e 403 nm e largura a meia altura variando entre 60-77 nm, além disso, as AgNPs apresentaram diâmetro hidrodinâmico variando entre diversas faixas de tamanho, indicando que as nanopartículas se aglomeraram, mas que as AgNPs também apresentaram diâmetros menores que 40 nm, pelo distribuição multimodal. Com isso, pode-se concluir que as AgNPs sintetizadas foram homogêneas e monodispersas, e os resultados obtidos corroboraram com diversos estudos realizados.

Para os filmes de CB-AgNPs, foi visto que as AgNPs foram bem incorporadas, e que através dos testes de lixiviação, pode-se observar que a liberação de Ag dos filmes para os testes em água foi mínima, mesmo após 1680 horas de exposição, a liberação máxima de Ag foi de 2,7 mg/L em filmes que tem uma concentração de Ag de cerca de 178 mg/L. Nos testes em soluções com pH controlado foi visto que a liberação também foi mínima, e que foi maior em soluções com pH abaixo de 5,0, onde o valor máximo de liberação foi de 4,2 mg/L. Com isso, pode-se concluir que, independentemente do pH, as AgNPs permaneceram incorporadas a matriz da CB.

Com os testes microbiológicos foi visto que as AgNPs foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, apresentando valores de MIC entre 35 e 75 ug/mL e MBC entre 150 e 300 ug/mL. Além disso, os testes de disco de inibição apresentaram diâmetro entre 11 e 19 mm, mostrando que os filmes de CB-AgNPs foram eficientes, impedindo que as bactérias se proliferem na região do filme. Sendo assim, tanto as AgNPs como os filmes CB-AgNPs foram eficazes, inibindo bactérias que causam infecções bacterianas, Gram-positivas, *S. aureus* e *S. aureus MRSA* e Gram-negativas, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

Sabendo disso, pode-se então verificar a importância desse estudo na ampliação das aplicações biomédicas dos nanomateriais metálicos, destacando principalmente, a capacidade das AgNPs na inibição de bactérias multirresistentes, que são um grave problema dentro dos centros de saúde e aos pacientes com lesões traumáticas e queimaduras.

Por fim, com a realização deste trabalho, foi possível colocar em prática diversos conceitos aprendidos durante a graduação em engenharia química e através de pesquisa científica, consolidando a importância do engenheiro químico também na área dos nanomateriais, na otimização de sínteses e processos em escala laboratorial.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. C. B.; PALÁCIO, S. M.; FERREIRA, L. K.; DEON, M. T. M.; CAMPOS, E. A.; KERBER, K. C. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata. **XXXVII ENEMP**, v. 18, 2015.

ALTHOBAITI, F.; ALI, O. A. A.; KAMAL, I.; ALFAIFI, M. Y.; SHATI, A. A.; FAYAD, E.; ELBEHAIRI, S. E. I.; ELSHAARAWY, R. F. M.; EL-FATTAH, W.A. New Ionic Liquid Microemulsion-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles for Skin Bacterial Infection Treatments. **Antibiotics**. v. 12, n. 2, p. 247, 2023.

ALVEN, S.; ADERIBIGBE, B. A. Chitosan-Based Scaffolds Incorporated with Silver Nanoparticles for the Treatment of Infected Wounds. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 3, p. 327, 2024.

ALVES, Aline de Andrade. **CELULOSE BACTERIANA MICROCRISTALINA MODIFICADA: DE CURATIVOS A FILTROS BACTERIANOS**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências dos Materiais) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

ANTUNES, F. S.; DAL'ACQUA, N.; BERGMAN, C.; GIOVANELA, M. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**. v. 9, p. 20-26, 2013.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential–what they are and what they are not?. **Journal of controlled release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BECHTOLD, Micheline. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata e aplicação como agente biocida em tinta poliuretânica hidrossolúvel**. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, SC: UFSC, 2011.

BRUNA, T.; MALDONADO-BRAVO, F.; JARA, P.; CARO, N. Silver nanoparticles and their antibacterial applications. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 13, p. 7202, 2021.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications, **Trends in Biotechnology**. 2010. v. 28, ed. 11.

CHEN, Qi-Yuan; XIAO, S. L.; SHI, S. Q.; CAI, L. P. A One-pot synthesis and characterization of antibacterial silver nanoparticle–cellulose film. **Polymers**, v. 12, n. 2, p. 440, 2020.

DA FONSECA, G. A. M. D., COELHO, V. I., OLIVEIRA NETO, F. dos S., FAVERO, G. M., MARIA, D. A., FRIGO, L. Potencial inibitório de nanopartículas de prata e quitosana no crescimento bacteriano. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 171-182, 2022.

DOTTO, D. SCATOLINI, M.; PUGINI, S.; VERCİK, L.; VERCİK, A.; RIGO, E. Uma nova cobertura de feridas antibacteriana e biocompatível feita de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata de síntese verde. **Materials Research Express**, v. 8, n. 11, 2021.

FREIRE, P. L. L.; STAMFORD, T. C. M.; ALBUQUERQUE, A. J. R.; SAMPAIO, F. C.; CAVALCANTE, H. M. M., MACEDO, R. O.; GALEMBECK, A.; FLORES, M. A. P.; ROSENBLATT, A. Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. **International journal of antimicrobial agents**, v. 45, n. 2, p. 183-187, 2015.

GARCIA, D. G.; SANTOS, K. O.; FREITAS, K. F. D.; CARDOSO, M. J. B.; FOOK, M. V. L. Síntese de Nanopartículas de Prata pela Técnica de Eletrodeposição para Desenvolvimento de Biossensores. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 31130-31145, 2021.

HAIDARI, H.; GARG, S.; VASILEV, K.; KOPECKI, Z.; COWIN, A. J. Silver-based wound dressings: Current issues and future developments for treating bacterial infections. **Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association**, v. 28, n. 4, p. 173-180, 2020.

JAISWAL, L.; RHIM, Jong-Wham; HAHM, Dae-Hyun. Lignin-mediated green synthesis of AgNPs in carrageenan matrix for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, 2020, p. 859-869.

JENKHONGKARN, R.; PHISALAPHONG, M. Effect of reduction methods on the properties of composite films of bacterial cellulose-silver nanoparticles. **Polymers**, v. 15, n. 14, p. 2996, 2023.

LEE, Nan-Yao; KO, Wen-Chien; HSUEH, Po-Ren. Nanoparticles in the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 452171, 2019.

LI, H.; XU, H. Mechanisms of bacterial resistance to environmental silver and antimicrobial strategies for silver: A review. **Environmental Research**, p. 118313, 2024.

LI, H.; YOU, Q.; FENG, X.; ZHENG, C.; ZENG, X.; XU, H. Effective treatment of *Staphylococcus aureus* infection with silver nanoparticles and silver ions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 80, p. 104165, 2023.

LI, Z.; WANG, L.; CHEN, S.; FENG, C.; CJEN, S.; YIN, N.; YANG, J.; WANG, H.; XU, Y. **Síntese facilmente ecológica de nanopartículas de prata em celulose bacteriana**. *Celulose* 22, p. 373–383, 2015.

LOPES, J. R. **Síntese de nanopartículas de prata (NPsAg) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017, p. 115.

MARKIEWICZ-GOSPODAREK, A.; KOZIOL, M.; TOBIAZ, M.; BAJ, J.; RADZIKOWSKA-BUCHNER, E.; PRZEKORA, A. Burn wound healing: clinical complications, medical care, treatment, and dressing types: the current state of knowledge for clinical practice. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 3, p. 1338, 2022.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F.; BOEGLI, L.; AGOSTINHO, A.; SÁNCHEZ, E. M.; BACH, H.; RUIZ, F.; JAMES, G. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. **Biofouling**, 29:6, 651-660, 2013.

MISIRLI, G. M. **Produção e controle sanitário de nanopartículas de prata (prata coloidal)**. 2021. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

MISIRLI, G. M.; PATRICIO, B. F. de C.; ABRANTES, S. de M. P. Nanopartículas de Prata para uso Bactericida: Fatores Extrínsecos e Intrínsecos para Aumento da Estabilidade. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 5, 2022.

NASCIMENTO, Joyce Kelly Melo. **Membranas de quitosana-graft-acrilato de sódio incorporadas com nanopartículas de prata para o desenvolvimento de curativos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química). – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

PAREEK, V.; GUPTA, R.; DEVINEAU, S.; SIVASANKARAN, S. K.; BHARGAVA, A.; KHAN, M. A.; SRIKUMAR, S.; FANNING, S.; PANWAR, J. Does silver in different forms affect bacterial susceptibility and resistance? A mechanistic perspective. **ACS Applied Biomaterials**, v. 5, n. 2, p. 801-817, 2022.

PARK, M. V. D. Z.; NEIGH, A. M.; VERMEULEN, J. P.; DE LA FONTEYNE, L. J.; VERHAREN, H. W.; BRIEDÉ, J. J.; VAN LOVEREN, H.; DE JONG, W. H. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810-9817, 2011.

PEREIRA, Anna K. S. **Síntese de nanopartículas de prata suportadas em microesferas e filmes de quitosana: estudo da atividade antibacteriana e aplicação na liberação controlada de ibuprofeno**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Tecnológica do Tocantins, Gurupi, 2017.

PUNJATAEWAKUPT, A.; ARAMWIT, P. Wound dressing adherence: a review. **Journal of Wound Care**, v. 31, n. 5, p. 406-423, 2022.

SILVEIRA, R.; ANGIOLETTO, E.; ARCARO, S.; GOMES, T. Nanopartículas de prata: síntese, atividade antibacteriana e comparativo com um desinfetante comum. **Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração**, v. 19, 2022.

RAHIMI, F.; REZAYATMAND, R. Use of a biosynthetic wound dressing to treat burns: a systematic review. **Journal of Wound Care**, v. 29, n. Sup12, p. S16-S22, 2020.

RAHMANIAN-SCHWARZ, A.; BEIDERWIEDEN, A.; WILLKOMM, L. M.; AMR, A.; SCHALLER, H. E.; LOTTER, O. A Clinical Evaluation of Biobrane® and Suprathel® in acute burns and reconstructive surgery. **Burns**, v. 37, n. 8, p. 1343-1348, 2011.

ROQUE, G. S. C. **Estudo da ação antitumoral de nanopartículas de prata biogênicas**. 2023. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

SOLOMON, S.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAN, A.; RUTKOWSKY, S.; BORITZ, C. Synthesis and study of silver nanoparticles. **EUA: Journal of Chemical Education**. v. 84, 2007, n. 2 . p. 322.

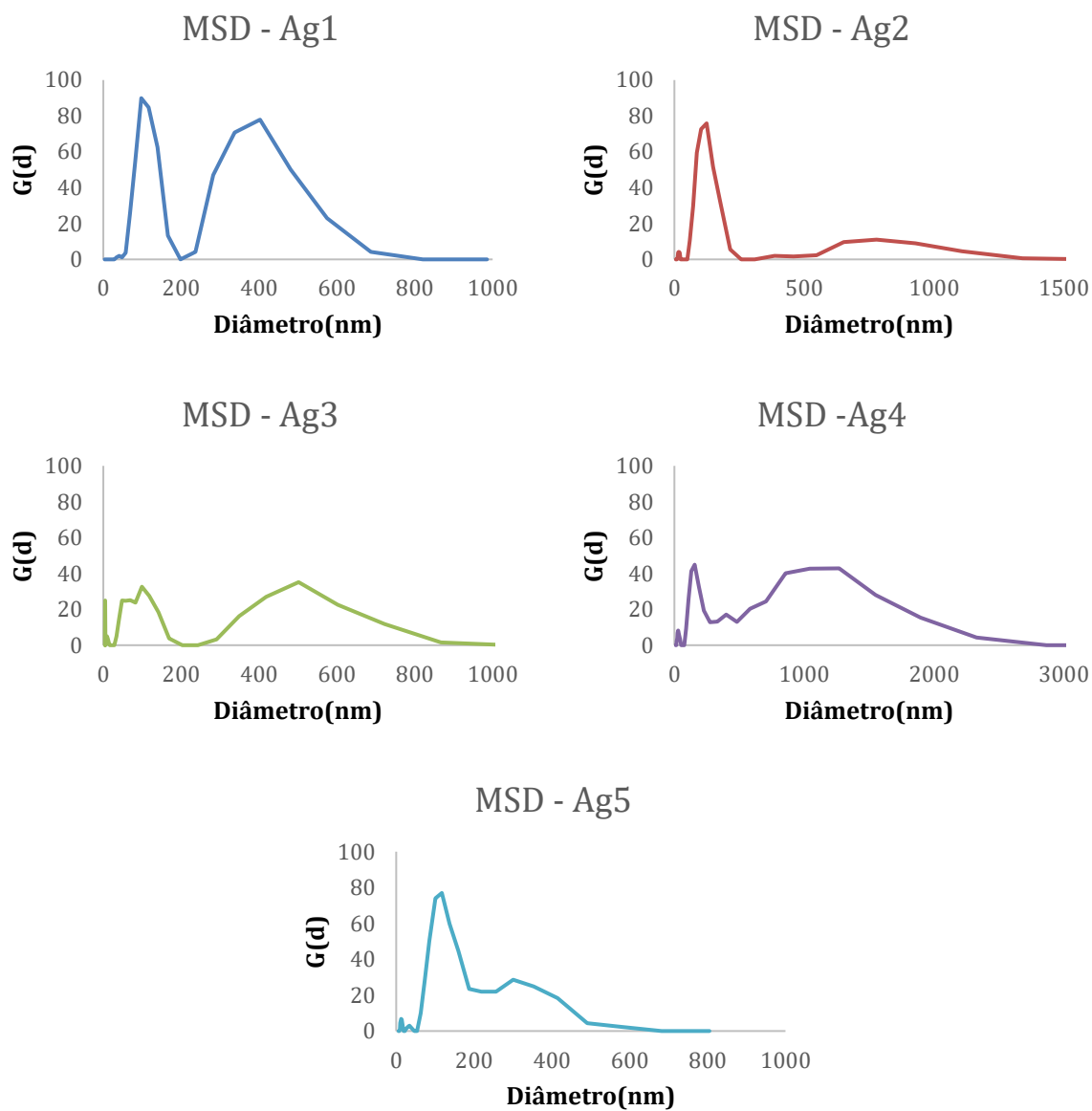
SOUSA, A.; RAMALHO, A.; FERNANDES, E.; FREITAS, M. Nanopartículas de prata. **Revista de Ciência Elementar**, v. 10, n. 3, 2022.

YANG, G.; XIE, J.; DENG, Y.; BIAN, Y.; HONG, F. Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose/AgNPs composite: A “green” route for antibacterial application, **Carbohydrate Polymers**, v. 87, Ed. 4, 2012, p. 2482-2487.

YU, Su-juan; YIN, Yong-guang; LIU, Jing-fu. Silver nanoparticles in the environment. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, n. 1, p. 78-92, 2013.

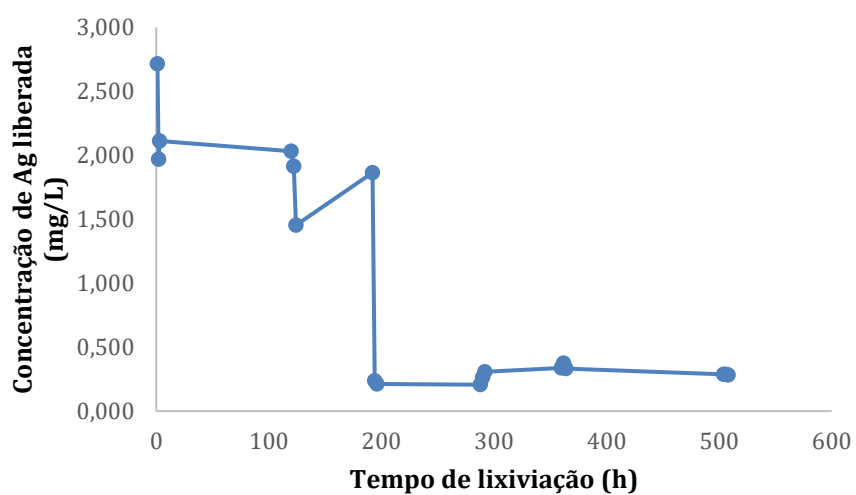
APÊNDICES

Apêndice 4.1.3 – Figuras para distribuição MSD do diâmetro das amostras de AgNPs.



Apêndice 4.1.4 – Variação da concentração de Ag liberada em água através do tempo, em horas.

Tempo de lixiviação (h)	Concentração de Ag liberada (mg/L)
1	2,713 ± 1,377
2	1,969 ± 0,038
3	2,112 ± 0,110
120	2,031 ± 0,047
122	1,913 ± 0,066
124	1,453 ± 0,845
192	1,863 ± 0,025
194	0,238 ± 0,032
196	0,213 ± 0,032
288	0,206 ± 0,038
290	0,263 ± 0,052
292	0,306 ± 0,038
360	0,338 ± 0,032
362	0,375 ± 0,074
364	0,331 ± 0,052
504	0,288 ± 0,048
506	0,288 ± 0,052
508	0,281 ± 0,083
1680	0,213 ± 3,690



Apêndice 4.1.5 - Concentração de Ag liberada dos filmes CB-AgNPs em soluções de pH controlado.

Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada			pH
2	4,257	±	0,002	2
4	3,475	±	0,000	
6	2,000	±	0,001	
8	1,350	±	0,000	
24	0,275	±	0,000	
26	0,675	±	0,000	
28	1,225	±	0,001	
30	0,775	±	0,000	
48	1,125	±	0,000	
50	0,950	±	0,000	
52	2,325	±	0,000	
840	0,900	±	0,001	
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada			pH
2	1,000	±	0,002	3
4	2,850	±	0,000	
6	3,150	±	0,001	
8	2,000	±	0,001	
24	1,200	±	0,000	
26	1,350	±	0,001	
28	1,350	±	0,000	
30	1,350	±	0,000	
48	1,500	±	0,001	
50	1,400	±	0,000	
52	1,465	±	0,000	
840	1,175	±	0,001	
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada			pH
2	0,175	±	0,001	4
4	1,200	±	0,001	
6	1,925	±	0,001	
8	2,725	±	0,001	
24	2,750	±	0,000	
26	3,100	±	0,001	
28	3,175	±	0,001	
30	3,200	±	0,002	
48	3,425	±	0,001	
50	3,100	±	0,002	
52	2,975	±	0,000	
840	2,500	±	0,000	
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada			pH
2	0,050	±	0,000	5

4	0,250	±	0,001	6
6	0,278	±	0,001	
8	0,302	±	0,001	
24	0,175	±	0,001	
26	0,375	±	0,000	
28	0,525	±	0,000	
30	0,725	±	0,001	
48	1,775	±	0,000	
50	1,725	±	0,000	
52	2,600	±	0,001	
840	3,000	±	0,000	
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada		pH	
2	0,075	±	0,000	7
4	0,200	±	0,001	
6	0,200	±	0,000	
8	0,175	±	0,000	
24	0,075	±	0,001	
26	0,075	±	0,000	
28	0,075	±	0,001	
30	0,075	±	0,001	
48	0,025	±	0,001	
50	0,100	±	0,001	
52	0,101	±	0,001	
840	2,025	±	0,000	
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada		pH	8
2	0,075	±	0,000	
4	0,200	±	0,000	
6	0,200	±	0,000	
8	0,175	±	0,000	
24	0,050	±	0,000	
26	0,025	±	0,000	
28	0,025	±	0,000	
30	0,000	±	0,000	
48	0,152	±	0,000	
50	0,225	±	0,000	
52	0,650	±	0,000	
840	3,425	±	0,000	
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada		pH	
2	0,025	±	0,000	
4	0,250	±	0,000	
6	0,175	±	0,000	
8	0,175	±	0,000	
24	0,100	±	0,000	

26	0,075	±	0,000	9
28	0,100	±	0,000	
30	0,075	±	0,000	
48	0,050	±	0,000	
50	0,125	±	0,001	
52	0,150	±	0,000	
840	2,600	±	0,000	
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada		pH	
2	0,050	±	0,000	
4	0,200	±	0,000	
6	0,175	±	0,000	10
8	0,175	±	0,000	
24	0,100	±	0,000	
26	0,100	±	0,000	
28	0,100	±	0,000	
30	0,100	±	0,000	
48	0,100	±	0,000	
50	0,000	±	0,000	
52	0,025	±	0,001	
840	1,050	±	0,000	
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada		pH	11
2	0,100	±	0,000	
4	0,200	±	0,000	
6	0,175	±	0,000	
8	0,000	±	0,000	
24	0,075	±	0,000	
26	0,075	±	0,000	
28	0,100	±	0,000	
30	0,100	±	0,000	
48	0,075	±	0,000	
50	0,025	±	0,000	
52	0,025	±	0,000	
840	0,075	±	0,000	
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada		pH	
2	0,100	±	0,000	
4	0,200	±	0,000	
6	0,200	±	0,000	
8	0,175	±	0,000	
24	0,075	±	0,000	
26	0,050	±	0,000	
28	0,075	±	0,000	
30	0,075	±	0,000	
48	0,050	±	0,000	

50	0,050	±	0,000
52	0,025	±	0,000
840	0,075	±	0,000
Tempo de lixiviação	Concentração de Ag liberada		pH
2	0,125	±	0,000
4	0,225	±	0,000
6	0,200	±	0,000
8	0,225	±	0,000
24	0,025	±	0,000
26	0,050	±	0,000
28	0,050	±	0,000
30	0,025	±	0,000
48	0,025	±	0,000
50	0,075	±	0,000
52	0,075	±	0,000
840	0,100	±	0,000

12

