

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

GABRIEL OALES KAMINSKI LARSEN

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
INCORPORADAS EM NANOCELULOSE BACTERIANA PARA
UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA

2023

GABRIEL OALES KAMINSKI LARSEN

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
INCORPORADAS EM NANOCELULOSE BACTERIANA PARA UTILIZAÇÃO
COMO AGENTE ANTIMICROBIANO**

**Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Incorporated in
Bacterial Nanocellulosis for Use as an Antimicrobial Agent**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química – Área de Concentração: Química Inorgânica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcela Mohallem Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto.

CURITIBA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



GABRIEL OALES KAMINSKI LARSEN

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
INCORPORADAS EMNANOCELULOSE BACTERIANA PARA UTILIZAÇÃO COMO
AGENTE ANTIMICROBIANO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Química Inorgânica.

Data de aprovação: 28 de Fevereiro de 2023

Dra. Marcela Mohallem Oliveira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Eryza Guimaraes De Castro, Doutorado - Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro)

Dra. Maria Giovana Binder Pagnoncelli, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dedico este trabalho à minha família e a todos os professores que me lapidaram no decorrer da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo amor, paciência, apoio e conselhos durante toda minha vida, serei eternamente grato por tudo que vocês fizeram e fazem por mim.

Agradeço a todos os meus amigos que direta ou indiretamente me apoiaram e aconselharam em momentos de incerteza.

Agradeço a minha professora orientadora Dr^a. Marcela Mohallem Oliveira, pelo tempo dedicado a mim, e por todos os ensinamentos transmitidos de forma excepcional.

Agradeço ao professor coorientador Dr. Gustavo Henrique Couto pela confiança, pelos ensinamentos transmitidos e pelos incentivos de sair da zona de conforto e se arriscar, incentivos que contribuíram para meu aprimoramento e confiança profissional.

A todos os meus professores que transmitiram seus conhecimentos da forma mais nobre possível e tornaram possível eu chegar nesta etapa da minha vida.

A todos os colaboradores e instituições acadêmicas pela cooperação para realização desta pesquisa.

Agradeço ao PPGQ-UTFPR pela concessão da bolsa de pesquisa, que foi deveras importante, para me incentivar como cientista.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que mais essa etapa da minha vida pudesse ser concluída com êxito.

Espero que seu coração nunca mude.
Porque ele é raridade. Porque ele é cheio
de beleza e motivos para ser admirado.
Porque ele é um lembrete de que o
mundo pode ser um lugar bom.
(FERNANDES, Victor, 2021, p. 162)

RESUMO

Os microrganismos são essenciais para a vida na terra e sendo assim as suas ações benéficas e maléficas foram estudadas ao longo dos anos, logo, técnicas e substâncias foram desenvolvidas para controlá-los; contudo, sua resistência e adaptabilidade se tornaram um problema crescente de saúde pública, que exige ações a fim de prevenir danos futuros. Pensando nisso com o advento da nanociência, descobriu-se que a combinação de materiais em escala nanométrica, nos permite explorar e criar nanocompósitos com propriedades únicas. Sendo assim, esse trabalho procurou desenvolver nanocompósitos compostos por nanocelulose bacteriana provenientes da bactéria *Komagataeibacter hansenii* com incorporação de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano para controlar microrganismos nocivos e proporcionar uma ação desinfetante. A nanocelulose bacteriana com nanopartículas de prata pode ser usadas para inibir a ação microbiana e reduzir a contaminação em áreas biologicamente expostas, minimizando riscos à saúde humana, mitigando assim o problema de contaminação cruzada dentre outros. Os nanocompósitos foram produzidos com a impregnação de nanopartículas de prata previamente sintetizadas, ou ainda com a impregnação de cátions prata em nanocelulose bacteriana (úmida e seca), e foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura e transmissão e os teste biológicos foram feitos com quatro cepas: *S. aureus* (Gram-positiva), *E. coli* (Gram-negativa), *P. aeruginosa* (Gram-negativa) e *E. faecalis* (Gram-positiva). As membranas apresentaram morfologia e estruturas diferentes das comumente vistas na literatura, com imagens como se fossem escamas. As membranas secas, tanto produzidas *In situ* ou *Ex situ*, apresentaram baixa ação biocida, assim como as amostras feitas em tolueno, já as membranas úmidas e com maior concentração de prata apresentaram melhor resultado em relação a ação antimicrobiana, bem como, também maior teor de nanopartículas de prata (independente da concentração), incorporadas e/ou aderidas nas mesmas, quando comparadas as amostras secas, sendo as úmidas demonstrando melhor resposta, ainda mais contra a bactéria *P. aeruginosa*, contudo, ambas podem ser utilizadas em diversas aplicações, principalmente para proteção de alimentos.

Palavras-chave: Nanocompósitos. Nanocelulose. Nanopartículas de prata. Bactericida.

ABSTRACT

Microorganisms are essential for life on earth and therefore their beneficial and harmful actions have been studied over the years, so techniques and substances have been developed to control them; however, its resistance and adaptability have become a growing public health problem, which requires actions to prevent future damage. Thinking about it with the advent of nanoscience, it was discovered that the combination of materials at the nanometric scale allows us to explore and create nanocomposites with unique properties. Therefore, this work sought to develop nanocomposites composed of bacterial nanocellulose from the bacteria *Komagataeibacter hansenii* with the incorporation of silver nanoparticles as an antimicrobial agent to control harmful microorganisms and provide a disinfectant action. Bacterial nanocellulose with silver nanoparticles can be used to inhibit microbial action and reduce contamination in biologically exposed areas, minimizing risks to human health, thus mitigating the problem of cross contamination, among others. The nanocomposites were produced by impregnating previously synthesized silver nanoparticles, or by impregnating silver cations in bacterial nanocellulose (wet and dry), and were characterized by scanning and transmission electron microscopy and biological tests were performed with four strains : *S. aureus* (Gram-positive), *E. coli* (Gram-negative), *P. aeruginosa* (Gram-negative) and *E. faecalis* (Gram-positive). The membranes presented morphology and structures different from those commonly seen in the literature, with images as if they were scales. The dry membranes, both produced *In situ* or *Ex situ*, showed low biocidal action, as well as the samples made in toluene, while the wet membranes and with a higher concentration of silver showed better results in relation to antimicrobial action, as well as a higher content. of silver nanoparticles (regardless of concentration), incorporated and/or adhered to them, when compared to dry samples, the wet ones showing better response, even more against the *P. aeruginosa* bacteria, however, both can be used in several applications, Mainly for food protection.

Keywords: Nanocomposites. Nanocellulose. Silver nanoparticles. Bactericidal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Escala comparativa de tamanho de alguns nanomateriais com outros materiais..... 19
- Figura 2** - A) Relação da absorção plasmon resultante da interação de radiação eletromagnética com o tamanho e formato das NPs de ouro. B) Ilustração do efeito plasmon de superfície localizado de uma nanopartícula metálica..... 22
- Figura 3** - Representação do aumento da superfície de contato, conforme se diminui o tamanho do material, porém com a mesma quantidade de material..... 23
- Figura 4** - A) Íons metálicos em matriz polimérica como precursor da NPs; B) Monômero entre NPs para a criação do nanocompósito; C) Monômero e precursor para a formação do nanocompósito; e D) Mistura de uma matriz polimérica juntamente com NPs..... 24
- Figura 5** - Estrutura molecular da NCB (esquerda). NCB produzida para aplicação em engenharia de tecidos (direita)..... 26
- Figura 6** - A) Microplacas de cultivo das NCB com poços de fundo chato. B) Membranas (parte esbranquiçada na superfície do meio de cultura) formadas após 5 dias de incubação a 28° C em ambiente estático..... 35
- Figura 7** - A) Fotografia da NCB seca. B) Fotografia da NCB úmida..... 35
- Figura 8** - Fotografia de membrana de NCBS-E, onde é possível notar a coloração vermelho acastanhado da prata..... 37
- Figura 9** - Espectros UV-Vis das amostras. A) Gráfico da amostra NCBS-B. B) Gráfico da amostra NCBS-E. A) Gráfico da amostra NCBS-IA..... 38
- Figura 10** - A) Imagens de MET de NCB incorporada com NPs-Ag. B) Imagens de MET das fibrilas de NCB..... 39
- Figura 11** - A) Imagem de MET em escala de 500 nm de NCBS-B. B) Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-B..... 40
- Figura 12** - A) Imagem de MET de outra parte da NCB em escala de 500 nm de NCBS-B. B) Imagem de MET de outra parte da NCB em escala de 200 nm de NCBS-B..... 40
- Figura 13** - A) Imagem de MET em escala de 2 µm de NCBS-E. B) Imagem de MET em escala de 50 nm de NCBS-E..... 41
- Figura 14** - Imagem de MET em escala de 500 nm de NCB produzidas a partir de iodo incorporadas com NPs-Ag..... 42
- Figura 15** - Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-E (setas indicam NPs-Ag)..... 43
- Figura 16** - Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBU-E..... 43

Figura 17 - A) Imagem de MET em escala de 500 nm de NCBU-E. B) Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBU-E.....	44
Figura 18 - Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB-IB.....	44
Figura 19 - Imagem de MET em escala de 200 nm de outra área da NCBS-IB.....	45
Figura 20 - Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB, com mais detalhes escuros de possível alojamento de NPs-Ag.....	45
Figura 21 - Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB, onde na seta em vermelho observamos NPs-Ag.....	46
Figura 22 - Imagem em campo escuro de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB, onde na seta em vermelho observamos ponto luminoso que indica NPs-Ag cristalina.....	46
Figura 23 - Imagem de MET em escala de 0,5 μ m de NCBS-IB, onde na seta em vermelho observamos possíveis NPs-Ag.....	47
Figura 24 - A) Imagem de MET de NCBS-IB, onde na seta em vermelho observamos a presença de NPs-Ag. B) Imagem em campo escuro de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB, onde observamos pontos luminosos que indicam NPs-Ag cristalina.....	47
Figura 25 - Imagem de MET de NCBS-IB, onde observa-se as NPs de prata.....	48
Figura 26 - Imagem de MET de NCBS-IA, onde observa-se as NPs-Ag nas regiões mais escuras.....	48
Figura 27 - Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IA, onde observamos pontos escuros que indicam NPs-Ag.....	49
Figura 28 - Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IA, onde nas setas em vermelho observamos possíveis NPs-Ag.....	49
Figura 29 - A) Imagem de MEV em escala de 10 μ m de NCBU-B. B) Imagem de MEV em escala de 10 μ m de NCBS-B.....	50
Figura 30 - Imagem de MEV de NCBU-B. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBU-B (direita).....	51
Figura 31 - Imagem de MEV de NCBS-B. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBS-B (direita).....	51
Figura 32 - A) Imagem de MEV em escala de 10 μ m de NCBU-E. B) Imagem de MEV em escala de 100 μ m de NCBS-E.....	52
Figura 33 - Imagem de MEV em escala de 2 μ m de NCBS-E.....	53
Figura 34 - Imagem de MEV em escala de 40 μ m de NCBU-E. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBU-E (direita).....	53

Figura 35 - Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBS-E. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBS-E (direita).....	54
Figura 36 - A) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBU-IA. B) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBS-IA.....	55
Figura 37 - Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBU-IA. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBU-IA (direita).....	55
Figura 38 - Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBS-IA. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBS-IA (direita).....	56
Figura 39 - A) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBU-IB. B) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBS-IB.....	56
Figura 40 - Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBU-IB. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBU-IB (direta).....	57
Figura 41 - Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBS-IB. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBS-IB (direita).....	57
Figura 42 - Imagens do teste de ação antimicrobiana contra bactéria <i>E. coli</i> com luz retroiluminada nas placas. A) Placa de Petri com NCB úmidas. B) Placa de Petri com NCB seca. C) Placa de Petri com controle negativo (B e BU) e controle positivo (DA. Clo).....	60
Figura 43 - Imagens do teste de ação antimicrobiana contra bactéria <i>S. aureus</i> com luz retroiluminada nas placas. A) Placa de Petri com NCB úmidas. B) Placa de Petri com NCB seca. C) Placa de Petri com controle negativo (B e BU) e controle positivo (DA. Clo).....	61
Figura 44 - Imagens do teste de ação antimicrobiana contra bactéria <i>E. faecalis</i> com luz retroiluminada nas placas. A) Placa de Petri com NCB úmidas. B) Placa de Petri com NCB seca. C) Placa de Petri com controle negativo (B e BU) e controle positivo (DA. Gen).....	63
Figura 45 - Imagens do teste de ação antimicrobiana contra bactéria <i>P. aeruginosa</i> com luz retroiluminada nas placas. A) Placa de Petri com NCB úmidas. B) Placa de Petri com NCB seca. C) Placa de Petri com controle negativo (B e BU) e controle positivo (DA. Gen).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sigla das amostras produzidas e suas respectivas concentrações de NPs-Ag.....	31
Tabela 2 - Sigla nos quadrantes com suas respectivas concentrações de NPs-Ag.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS SÍMBOLOS E ACRÔNIMOS

Ag ⁺	Cátion prata
ATCC	American Type Culture Collection
BTOA	Brometo de tetraoctilamônio
Clo	Cloranfenicol
cm	Centímetros
COVID-19	Coronavírus disease (2019)
DA	Disco com antibiótico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
DT	Dodecanotiol
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
g	Gramas
Gen	Gentamicina
h	Horas
HBV	Vírus da hepatite B
HS	Hestrin e Schramm
L	Litro
M	Molar
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHA	Mueller Hinton ágar
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
mol	mol
NCB	Nanocelulose bacteriana
nm	Nanômetros
NPs	Nanopartículas
NPs-Ag	Nanopartículas de prata

NPs-met	Nanopartículas metálicas
PA	Para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
TGA	Análise termogravimétrica
Tol	Tolueno
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
° C	Graus Celsius
μ	Micro
μL	Microlitro
%	Porcentagem
%(v/v)	Porcentagem, volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 NANOMATERIAIS	18
2.2 NANOPARTÍCULAS DE METÁLICAS	21
2.3 NANOCELULOSE	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 PREPARO E CULTIVO DO MICROORGANISMO PARA OBTENÇÃO DE NCB	29
4.1.1 Secagem das membranas de NCB	30
4.2 SÍNTESE E INCORPORAÇÃO DAS NPS-AG NA NCB.	30
4.2.1 Síntese das NPs-Ag <i>Ex situ</i>	31
4.2.2 Síntese e redução de NPs-Ag <i>In situ</i>	32
4.2.3 Incorporação de NPs-Ag previamente sintetizadas nas membranas de NCB	32
4.3 CULTIVO E TESTE MICROBIOLÓGICO	33
4.4 CARACTERIZAÇÕES	34
4.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	34
4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
4.4.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS	37
5.2 IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO - MET	39
5.3 IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV COM ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS)	50
5.4 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	50
5.4.1 Teste com a bactéria <i>E. coli</i>	34
5.4.2 Teste com a bactéria <i>S. aureus</i>	34
5.4.3 Teste com a bactéria <i>E. faecalis</i>	34
5.4.4 Teste com a bactéria <i>P. aeruginosa</i>	34
6 CONCLUSÕES	68
7 TRABALHOS FUTUROS	68
8 REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos desempenham um papel crucial na manutenção da vida na terra, sendo componentes fundamentais para a existência de vários tipos de vida no nosso planeta. Ao longo dos anos, a ciência tem descoberto cada vez mais sobre a diversidade de microrganismos e suas ações, tanto benéficas quanto maléficas, para os seres vivos. Como resultado, foram desenvolvidas técnicas e substâncias para controlar o desenvolvimento e ações dos microrganismos. No entanto, com o tempo, os microrganismos podem desenvolver resistência às substâncias utilizadas para controlá-los e/ou inibi-los, pois, assim como a ciência evolui, outros seres vivos também o fazem (COSTA, 2019; SANTOS, 2004).

Segundo Santos (2004), a resistência e adaptabilidade dos microrganismos tornou-se um dos maiores “problemas de saúde pública do mundo”, e a cada dia tornam-se ainda mais preocupantes, tendo que ser enfrentada o quanto antes, para se evitar danos maiores no futuro. A resistência dos microrganismos frente a substâncias e a fármacos provêm do uso desenfreado e inadequado de antibióticos que fazem com que se adaptem ao meio e assim se tornem “imunes” à princípios ativos específicos desenvolvidos para inibi-los.

Um meio para mitigar os efeitos maléficos dos microrganismos aos seres humanos, é a utilização de agentes antimicrobianos, impregnados em diferentes materiais do nosso cotidiano, uma vez que tal alternativa se mostra como uma forma, muito efetiva na redução das cargas microbianas (SILVA et al., 2021; SCHNEIDER et al., 2020).

Os nanomateriais e, mais especificamente, as nanopartículas metálicas (NPs-met), constituem uma alternativa interessante para utilização em materiais com ação antimicrobiana, uma vez que são materiais que nos permitem explorar novas propriedades ou melhorar as propriedades já existentes em macro escala, em função das modificações das suas propriedades por causa do tamanho reduzido. Especificamente as NPs-met, que são partículas de metais em escala nanométrica, apresentam propriedades singulares nesta escala, e podem, quando combinadas a outros materiais, gerar o que chamamos de nanocompósitos (BAIG; KAMMAKAKAM; FALATH, 2021; MODY et al., 2010; OLIVEIRA, 2005).

Para a criação de um nanocompósito com ação antimicrobiana temos as nanopartículas de prata (NPs-Ag), que estão sendo amplamente exploradas em

diversas áreas, devido, entre outros fatores, a sua ação antimicrobiana, promovida e intensificada pela sua maior superfície de contato (devido a nanoescala) resultando em um ótimo agente bactericida e virucida em diversos trabalhos, além de que a escolha das NPs-Ag além claro do seu principal atrativo que é a ação biocida, também tem atrelada seu “baixo” custo quando comparados a outras NPs-met com também ação biocida, e que muitos das vezes não contam com um histórico de estudos tão aprofundado quanto as NPs-Ag, que desde muito tempo já vem sendo explorado pela sociedade no decorrer dos anos (BOTELHO et al., 2020).

Um dos pontos positivos das NPs-Ag está nas mesmas poderem ser impregnadas em matrizes poliméricas e formarem nanocompósitos, que são materiais que estão em constante exploração, e um exemplo interessante de matriz para impregnação das NPs-Ag é a nanocelulose bacteriana (NCB), que é amplamente explorada em diferentes campos devido à sua também versatilidade. Seu estudo está sendo intensificado para aplicação em sensores, aerogéis, floculantes, medicamentos, entre outros. A nanocelulose tem se mostrando ser um material promissor para o avanço tecnológico (GUIMARÃES et al., 2018).

A NCB tem múltiplas propriedades que a tornam uma escolha atraente para ser explorada em diferentes setores. Ela possui uma elevada capacidade de adsorção e uma alta cristalinidade (cerca de 80% maior do que a celulose obtida de madeira), entre outras características. Devido a estas propriedades, a NCB é uma opção viável para o desenvolvimento de nanocompósitos (CURVELLO et al., 2019; PIELAK, 2019).

As singularidades físico-químicas presentes em nanomateriais e nanocompósitos têm sido exploradas por vários setores, como por exemplo a indústria farmacêutica, pois podem oferecer uma maior biodisponibilidade para certos medicamentos, o que resulta em uma eficiência terapêutica mais elevada para o tratamento de doenças (TAVAKOL et al., 2021).

A necessidade de materiais com propriedades antibacterianas tem aumentado devido à capacidade de alguns microrganismos de sobreviverem por semanas ou meses em superfícies inanimadas, sendo assim, a NCB um dos materiais que vem sendo explorado neste sentido, e que pode ser combinado com outros materiais, como NPs-Ag, para ser usado como material de desinfecção passiva, ampliando seu efeito. Isto significa que ele pode ser utilizado para reduzir

a presença e a ação de microrganismos em superfícies (NORRRAHIM et al., 2021).

Vale mencionar aqui ainda que, levando-se também em conta nosso recente cenário epidemiológico, esse trabalho foi pensando para ir de encontro com o desenvolvimento de materiais com aplicação no controle de microrganismos nocivos, e tem como objetivo desenvolver nanocompósitos compostos por NCB incorporadas com NPs-Ag para possíveis aplicações e desenvolvimento de novas tecnologias visando a inibição da ação microbiana e consequente diminuição na contaminação nas diversas áreas biologicamente expostas que podem oferecer algum risco a saúde humana. Sendo assim, fica claro a importância do desenvolvimento de novos materiais que possam ser utilizados para este fim, demonstrando assim que o presente trabalho tem alta relevância na área de controle de contaminação por agentes biológicos como bactérias e vírus.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

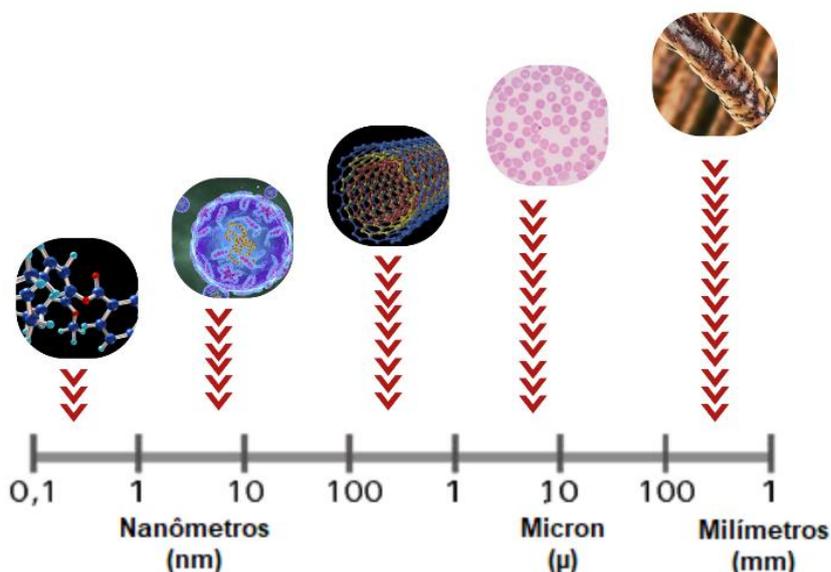
2.1 NANOMATERIAIS

É denominada de nanomateriais a classe de materiais que se encontram em tamanho entre 0,1 à 100 nm e que acabam por permitir desenvolver/explorar novas propriedades ou ampliar as propriedades já existentes na macro escala. Os nanomateriais vem sendo explorados há anos pela humanidade, contudo, em muitos casos sem o conhecimento da escala nano, pois, 4.500 anos atrás os humanos já exploravam as propriedades de nanofibras de amianto a fim de aumentarem a resistência de peças cerâmicas, bem como, os egípcios já utilizavam nanopartículas de sulfeto de chumbo II (PbS) em tinturas para cabelo, demonstrando desde muito tempo a versatilidade de aplicação dos nanomateriais (BAIG; KAMMAKAKAM; FALATH, 2021).

A área denominada de nanotecnologia, que engloba os nanomateriais, segundo Regis et al. (2021), foi inicialmente discutida por Richard P. Feynman em 1959, entretanto, de fato explorada mais profundamente por Kim Eric Drexler em meados de 1980, resultando na expansão das pesquisas nesta área, o que ampliou ainda mais os horizontes de elementos e materiais que já tinham sido muito exploradas/pesquisados, resultando em informações bem fundamentadas sobre eles, desde então, vem-se explorando cada vez mais as propriedades que os nanomateriais apresentam, uma vez que essa nova classe de materiais pode resultar em propriedades únicas, muita das vezes não encontradas em materiais em tamanhos convencionais. Como o próprio nome já sugere, os nanomateriais encontram-se em uma escala extremamente pequena, como pode ser visto na comparação de tamanhos na Figura 1, sendo assim, os nanomateriais são então, materiais desenvolvidos a fim de otimizarem e/ou trazerem novas funções ainda não conhecidas ou funcionalizadas nos materiais cujas propriedades são tradicionalmente conhecidas (OLIVEIRA, 2005). Vale mencionar ainda que, além da alteração de propriedades quando comparadas com aquelas da escala macro, os nanomateriais permitem ainda a sua modulação, uma vez que o que resulta em novas propriedades é justamente o controle do seu tamanho. Assim,

tamanhos diferentes na escala nano resultam em propriedades distintas, ampliando sua importância.

Figura 1. Escala comparativa de tamanho de alguns nanomateriais com outros materiais.



Fonte: Adaptado de ZANONI, 2015.

Conforme Baig, Kammakakam e Falath (2021), a criação e avanço dos estudos na área de nanotecnologia não só possibilitou a criação de novos materiais, mas também a de muitos instrumentos de exploração química como por exemplo o microscópio de tunelamento com varredura que possibilita a obtenção de imagens de átomos e moléculas, possibilitando explorar ainda mais campos com informações até então não conhecidos em várias áreas, equipamento esse que levou à criação de diversos outros, hoje essenciais para o desenvolvimento de pesquisas em todas as áreas.

Com o avanço das pesquisas na nanociência, descobriu-se que as mudanças nas propriedades dos nanomateriais em comparação aos materiais de tamanho convencionais, estão intimamente ligadas ao que é chamado de tamanho crítico, que nada mais é que a diminuição de uma das dimensões de um material de tamanho convencional para escala nanométrica, capaz de mudar assim alguma(s) propriedade(s) no material. Por outro lado, não apenas a mudança no tamanho implica em mudanças nas propriedades, mas também o formato em que se encontra esse material, bem como, o meio que o circunda (ZARBIN, 2007).

As propriedades singulares encontradas nos nanomateriais, principalmente no âmbito físico-químico, vem sendo exploradas por diversas áreas, dentre elas a indústria farmacêutica, devido promoverem uma maior biodisponibilidade de determinados fármacos aumentando a eficácia terapêutica dos mesmos no que diz respeito ao tratamento de determinadas doenças (TAVAKOL et al., 2021); logo, a nanotecnologia vem sendo amplamente usada nesta área para o desenvolvimentos de biosensores, entrega de fármacos e genes dentre outros, mostrando assim a versatilidade de exploração e aplicabilidade que a nanoescala traz para diversos materiais, aplicabilidade esta que não é vista em sua macroescala (ALVARENGA et al., 2022).

Dentro dos nanomateriais, uma classe chamada de nanocompósitos foi inicialmente criada por volta de 1982 à 1983 por Kormarneni e colaboradores, para designar materiais criado com alto grau de heterogeneidade, contudo, na natureza tal classe é vastamente encontrada desde o seu mais simples material como em conchas, dentes dentre outras, à sistemas mais complexos a nível celular, como o armazenamento de Si, Ca, Al dentre outros, para processos biofísicos em seres vivos como as plantas por exemplo (KOMARNENI, 1992).

Por definição temos que os nanocompósitos são materiais que apresentam propriedades sinérgicas entre seus componentes e como já mencionado também apresentam ao menos uma das fases do compósito em escala nanométrica de tamanho, podendo ser formados pela combinação de materiais do tipo inorgânicos-inorgânicos, orgânicos-orgânicos e inorgânicos-orgânicos (OLIVEIRA, 2005). A combinação entre dois materiais, sendo um inorgânico e outro orgânico, resulta nos também conhecidos como materiais híbridos (inorgânicos-orgânicos), sendo que na grande maioria das vezes o material orgânico é uma matriz polimérica no qual está incorporado o nanomaterial inorgânico. Os nanocompósitos híbridos começaram a ser estudados em meados da década de 80 nos laboratórios de pesquisa da Toyota, que estudavam propriedades mecânicas de nanocompósitos de poliamida e argila para melhoria de suas propriedades mecânicas visando aplicações tecnológicas (polipropileno e montmorilonita organofílica) (PAIVA et al., 2006).

Um fator importante para ser considerado no momento da criação e/ou aprimoramento de um nanocompósito são as interações entre seus constituintes, tais como, polaridade, que podem implicar nas suas possíveis aplicações, pois

dependendo se a matriz e/ou hospedeiro são polares ou apolares pode-se esperar resultados diferentes conforme a aplicabilidade. A polaridade da matriz hospedeira, conforme escolha de síntese do nanocompósito, pode interferir no nível de incorporação e/ou adsorção do (nano)material hóspede, isso por conta dos grupos funcionais formadores do nanocompósito (LOUREIRO, 2022).

Sendo assim, outra principal vantagem dos nanocompósitos em relação aos materiais tradicionais é a grande área de superfície que eles apresentam. Esta grande área de superfície permite que os nanocompósitos sejam mais eficientes na absorção de energia, transporte de calor, dissipação de vibrações dentre outras propriedades o que aumenta ainda mais a gama de aplicação, principalmente quando se trata na criação de materiais com aplicação como agente bactericida (THOSTENSON; LI; CHOU, 2004). Sendo assim, as NPs-met constituem uma fase importante na construção de nanocompósitos que resultem em propriedades mais eficientes, moduláveis, e com propriedades intrínsecas das diferentes NPs-met, tais como, a característica biocida de algumas NPs-met.

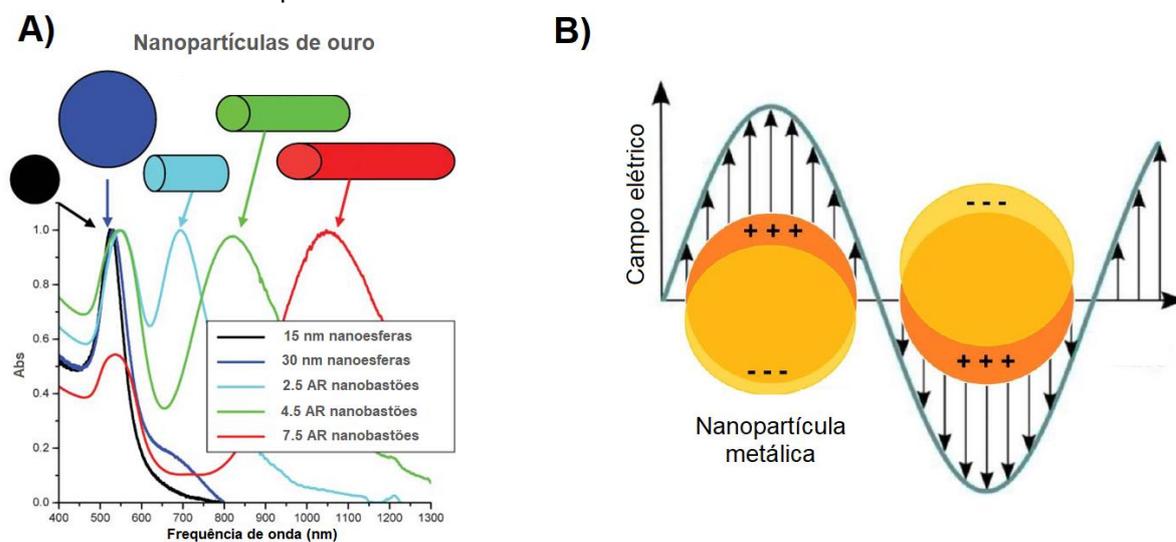
2.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Um dos materiais mais explorados na área da nanociência são NPs-met, devido a sua alta gama de aplicações em potencial, sendo que nanopartículas (NPs) de metais nobres como o ouro e a prata, desde muito tempo (época dos romanos) já eram utilizadas para tingir vidros dentre outras aplicações, o que até hoje desperta o interesse nos pesquisadores de várias áreas (MODY et al., 2010).

No caso de alguns metais, como ouro, prata e cobre, a escala reduzida de tamanho resulta em alterações nas suas propriedades ópticas, ou seja, conforme o tamanho das mesmas é alterado, ocorre um fenômeno chamado de ressonância plasmônica, que altera sua cor tanto em dispersão quanto no estado sólido, e é um fenômeno que ocorre devido a interação de radiação eletromagnética com os elétrons de superfície da partícula (banda de valência do metal), e uma representação desse fenômeno está ilustrado na Figura 2-A (EUSTIS e EL-SAYED, 2005). Sendo assim, quando se trata de NPs-met temos que levar em consideração para explicação do fenômeno de ressonância plasmônica, ela sendo um “núcleo” que contém elétrons se movendo livremente, o

que chamamos de “mar de Fermi”, quando uma luz é incidida nessas NPs, os elétrons de condução são conduzidos para a superfície da mesma, fazendo com que ele se torne um dipolo elétrico, pois como esses elétrons que estão confinados dentro das NPs estão carregados negativamente o outro lado ficará carregado positivamente (Figura 2-B), isso gera um campo eletromagnético que interage com a luz (GARCIA, 2011; MODY et al., 2010).

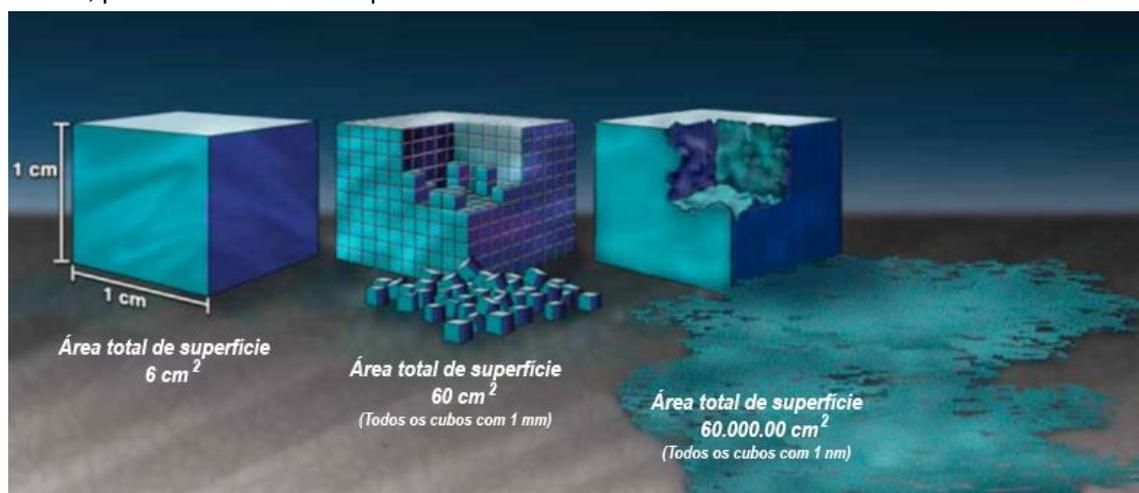
Figura 2. A) Relação da absorção plasmon resultante da interação de radiação eletromagnética com o tamanho e formato das NPs de ouro. B) Ilustração do efeito plasmon de superfície localizado de uma nanopartícula metálica.



Fonte: A) Adaptado de EUSTIS e EL-SAYED, 2005. B) Adaptado de HAMMOND et al., 2014.

As NPs-met, também estão sendo amplamente exploradas em diversas áreas, devido, entre outros fatores, a sua ação antimicrobiana, promovida e intensificada pela sua maior superfície de contato (devido a nanoescala) se mostrando assim, como ótimos agentes bactericidas e virucidas (BOTELHO et al., 2020). Um belo exemplo, são as propriedades características das NPs-Ag que são relacionadas principalmente por dois fatores importantes, sendo eles, os altos valores da sua área superficial, como já dito anteriormente, e o efeito de confinamento quântico. A relação de área superficial das NPs-Ag é um dos fatores impactantes quando falamos de nanomateriais, pois, com a mesma quantidade de material é possível ter um aumento considerável em relação a superfície de contato de materiais em tamanho convencional, conforme mostra a Figura 3, e esse aumento acarreta em mudanças significativas na reatividade desses materiais, sendo que, no caso das NPs-Ag quando em escala nanométrica há uma intensificação na ação bactericida (BALLOTTIN, 2014).

Figura 3. Representação do aumento da superfície de contato, conforme se diminui o tamanho do material, porém com a mesma quantidade de material.



Fonte: Adaptado de MARTINS e TRINDADE, 2012.

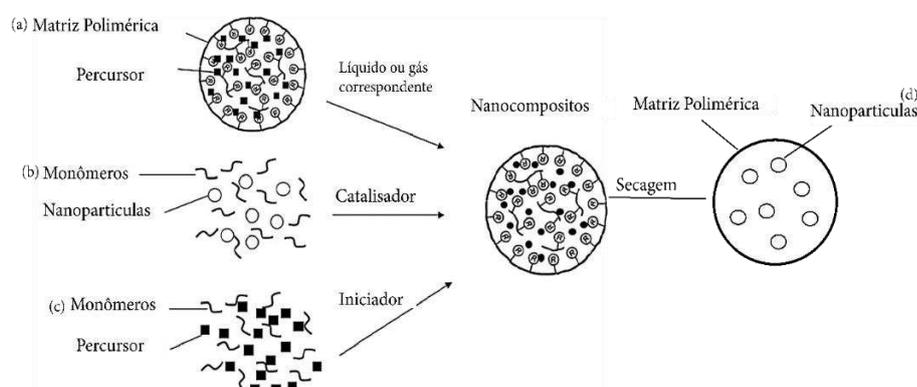
O efeito de confinamento quântico é um dos responsáveis pelas propriedades singulares encontradas em alguns nanomateriais, pois, em função do tamanho extremamente reduzido, os elétrons ficam confinados a uma região com tamanho da ordem do comprimento de onda de Broglie que é de poucos nanômetros. Isso causa uma quantização da energia em valores discretos, e não mais contínuos como encontrados nos sólidos, afetando todas as suas propriedades. Assim, com a modificação tanto de seu tamanho quanto de sua forma, e abaixo do tamanho crítico, a banda de plasmon de superfície, é alterada, sendo que, quanto maior a partícula, maior é o comprimento de onda da absorção plasmon, e menor é o grau de confinamento (NOGUEIRA et al., 2012).

Segundo Matsuda (2020), que incorporou NPs-Ag em nanocelulose vegetal, a fim de avaliar sua capacidade antimicrobiana, as rotas e meios de incorporação devem ser levados em consideração, quando se leva em conta a capacidade biocida do nanocompósito a ser produzido, pois, como demonstrado pela pesquisadora o modo de *sputtering* (pulverização catódica), se mostrou mais eficaz no que diz respeito a ação antimicrobiana quando comparados a outros meios de incorporação das NPs-Ag.

Diversos são os meios encontrados na literatura para obtenção de NPs-Ag, sendo que uma dificuldade encontrada está na sua estabilização, que tem grande impacto em possíveis aplicações. Já em relação à ação antimicrobiana das NPs-Ag, sabe-se que está ligada à sua reatividade com grupos tiol, aminoácidos e “grupos funcionais de enzimas”. Tanto a escolha dos componentes

formadores do nanocompósito quanto a rota sintética escolhida podem alterar a sua morfologia e assim a interação entre os materiais formadores e conseqüentemente suas propriedades. Para os nanocompósitos poliméricos formados juntamente com NPs-met existem quatro rotas principais de síntese. Na Figura 4 estão esquematizadas as rotas sintética para a síntese de tais nanocompósitos. A primeira rota (4-A) é aquela onde um precursor, como por exemplo um sal metálico, está disperso na matriz polimérica e ao passar um gás ou líquido contendo um agente redutor, resultam em NPs em contato com o polímero. No segundo caso (4-B) o inverso é visto, NPs estão em um meio reacional previamente ligadas ao monômero e podem, juntamente com a presença de um iniciador ou catalisador (que inicie a reação de polimerização), formar o nanocompósito desejado (ZHAO et al., 2011). A terceira rota (4-C), também conhecida como *one pot*, é aquela onde ocorre uma polimerização dos monômeros simultaneamente com a formação das NPs a partir do seu precursor, em rota única de síntese onde os materiais são formados concomitantemente e por fim a rota (4-D), onde ambos já estão previamente formados e são combinados entre si. Como exemplo a reação que ocorre com a redução do sal metálico para sua forma metálica e simultaneamente a oxidação do monômero, formando o polímero, em reações de obtenção de nanocompósitos formados por NPs-met e polímeros condutores (OLIVEIRA et al., 2018; ZHAO et al., 2011; OLIVEIRA e ZARBIN, 2008).

Figura 4. A) Íons metálicos em matriz polimérica como precursor da NPs; B) Monômero entre NPs para a criação do nanocompósito; C) Monômero e precursor para a formação do nanocompósito; e D) Mistura de uma matriz polimérica juntamente com NPs.



Fonte: Adaptado de ZHAO, 2011.

Conforme Tavakol et al. (2021), a maior superfície de contato dos nanomateriais, concede sobretudo às NPs-met, como as de zinco, ferro e prata, ação viricida eficazes para diversas doenças virais existentes inclusive a COVID-19; a característica do efeito plasmon encontrado nas NPs-met pode ser explorado como agente teranóstico e assim ser aplicados em tratamentos e diagnósticos. Ainda segundo Ruparelia et al. (2008), diversos são os trabalhos científicos que enaltecem os efeitos antimicrobianos das NPs-Ag, não apenas isoladas, mas também quando presentes em nanocompósitos, demonstrando sinergia entre componentes de diferentes origens.

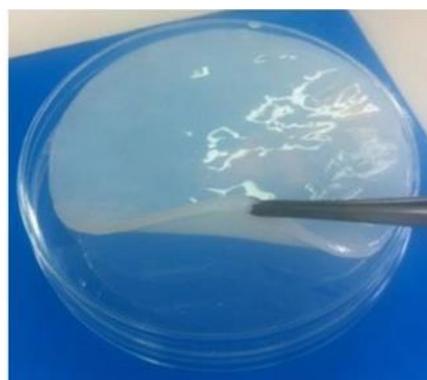
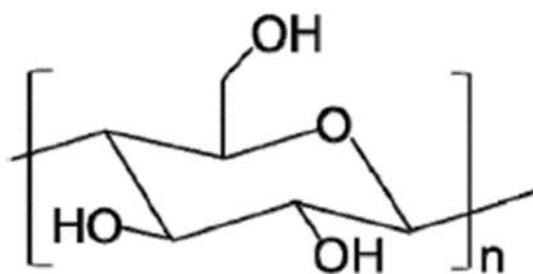
2.3 NANOCELULOSE

A nanocelulose é um nanomaterial composto por micelas coloidais estruturadas em rede, que foi descrita pela primeira vez em 1951 por Bengt Rånby, e tem como origem a celulose, um polímero de glucose tendo fórmula molecular $[C_6H_{10}O_5]_n$, o polímero natural de maior abundância na terra sendo encontrado principalmente na parede celular de plantas, mas que também pode ser sintetizada e encontrada por algumas espécies de algas e de bactérias. Esta última forma, também denominada NCB por apresentar as fibrilas de celulose numa escala nanométrica (diâmetro variando entre 25-86 nm e comprimento variando na escala de alguns micrometros). Uma particularidade da NCB é seu alto grau de pureza. Ao contrário da celulose vegetal, a NCB não apresenta envolvendo a celulose compostos como a lignina, a hemicelulose, pectina, extrativos e outros; o que as confere maior biocompatibilidade quando aplicadas no desenvolvimento de materiais para área médica, óptica ou novos materiais ou compósitos (CURVELLO et al., 2019). Vale mencionar ainda que a NCB apresenta diversas propriedades que podem ser amplamente exploradas em diversas áreas, devido a sua elevada capacidade de adsorção, alta cristalinidade (aproximadamente 80% maior que celulose extraída da madeira) entre outras propriedades que a torna muito viável para o desenvolvimento de nanocompósitos (CURVELLO et al., 2019; PIELAK, 2019).

A NCB se apresenta naturalmente como um filme translúcido gelatinoso que é produzida e secretado ao meio circundante por poucos grupos de bactérias

Gram-negativas, sendo que as que apresentam maior produtividade são as do gênero das *Komagataeibacter* (antiga *Gluconacetobacter*). Na natureza tal filme está relacionado a proteção contra condições desfavoráveis, tais como proteção contra radiação ultravioleta (UV) (evitando assim mutações), dessecação (devido à grande capacidade de retenção água, > 98%), ou outros fatores. É constituída por microfibrilas distribuídas de formas aleatórias, lhe atribuindo regiões amorfas (90%). A NCB são quimicamente compostas por cadeias (1 → 4)-D-anidroglicopironose, ligadas através de ligações glicosídicas sendo sua geometria ditada pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. Na Figura 5 (esquerda) podemos observar sua estrutura molecular e na Figura 5 (direita) podemos ver o produto final na forma de filme, formando um hidrogel. Alguns fatores influenciam a sua produção e morfologia, tais como, meio de cultivo empregados para multiplicação da bactéria, e o tipo de microrganismo (PIELAK, 2019; PICHETH et al., 2017).

Figura 5. Estrutura molecular da NCB (esquerda). NCB produzida para aplicação em engenharia de tecidos (direita).



Fonte: PICHETH et al., 2017 (Esquerda); FISCHER et al., 2017 (Direita).

A NCB, assim como as NPs-Ag também se mostra com um potencial de uso na indústria, como embalagens para alimentos, reduzindo custos e impactos ambientais devido à sua alta biocompatibilidade (ALBUQUERQUE, 2019). Outra empregabilidade da NCB que vem sendo explorada é a de atribuir melhoras nas propriedades mecânicas de outros materiais, como pode ser vista na pesquisa realizada por Soeiro et al. (2021), que produziram uma blenda de NCB e fibroína, resultou na melhoraria das propriedades mecânicas da fibroína, que é uma proteína produzida por aranhas, bicho-da-seda dentre outros, que apresenta ótima biocompatibilidade, que é um aspecto deveras importante para a área da saúde e de engenharia de tecidos, mas que entretanto, não apresenta

propriedades mecânicas atraentes para sua utilização isolada. O biomaterial produzido pelos pesquisadores apresentou propriedades mecânicas e químicas aprimoradas, além de que não utilizaram em sua síntese, reagentes e materiais nocivos ao meio ambiente, tornando-se assim um material interessante para ser explorado nas áreas alimentícias e médica.

A utilização da NCB vem sendo estudada também como liberador controlado de fármacos, como no trabalho de Jorge et al. (2020), que propuseram como forma de transporte transdérmico de insulina, a mesma impregnada em NCB como forma alternativa de tratamento à *Diabetes mellitus*, tendo em vista que a pele é o maior órgão do corpo humano e, sendo assim, evitando a degradação gastrointestinal do fármaco; neste trabalho, os testes de propriedades físico-químicas e mecânicas realizados na matriz de NCB com insulina, as amostras se mostram estáveis para aplicação dermal, o que corrobora com a versatilidade das aplicações da NCB em diversas áreas.

Visto que existem microrganismos que em superfícies inanimadas resistem semanas e até meses, vem-se aumentando a procura por materiais como a NCB, para serem empregadas junto a outros materiais com propriedades antibacterianas como as NPs-Ag, de forma a serem utilizados como material com desinfecção passiva, ou seja, materiais que diminuam a carga e a ação de microrganismos em superfícies. Tal aplicação da NCB incorporada com NPs-Ag pode ser usada como revestimento de áreas ou isolamento, como por exemplo, em campo cirúrgico estéril (NORRRAHIM et al., 2021).

Visto isso, torna-se claro que o desenvolvimento de nanocompósitos baseados em NCB e NPs-Ag, como o que foi desenvolvido neste trabalho, vem de encontro com a necessidade de novos materiais que auxiliem e previnam a desinfecção de superfícies.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho estão centrados na obtenção e na caracterização de nanocompósitos constituídos de NCB incorporados com NPs-Ag, visando possíveis aplicações como material com propriedade antimicrobiana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar NCB produzida a partir da bactéria *Komagataeibacter hansenii*;
- Sintetizar e estabilizar as NPs-Ag dispersas em tolueno;
- Realizar a incorporação das NPs-Ag previamente sintetizadas nas NCB, na forma de filme úmido e seco;
- Realizar a impregnação da NCB (filme úmido e seco) com cátions Ag^+ seguido posteriormente da redução de tais cátions no interior dos poros da NCB;
- Comparar as ação dos nanocompósitos onde as NPs foram sintetizadas nos poros, sendo estabilizadas pela NCB, com a atividade das amostras produzidas com as NPs-Ag previamente sintetizadas e posteriormente incorporadas;
- Realizar a caracterização de todas as amostras obtidas com auxílio de técnicas instrumentais como, espectroscopia eletrônica de absorção na região ultravioleta-visível (UV-Vis), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Analisar a atividade antimicrobiana do nanocompósito gerado contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas.

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARO E CULTIVO DO MICROORGANISMO PARA OBTENÇÃO DE NCB

Inicialmente, foram feitas a assepsia com água, sabão e posteriormente álcool etílico 70% de todas as vidrarias e utensílios utilizados para o preparo da NCB. Para a produção da NCB foi utilizado a espécie *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, uma bactéria da família das *Acetobacteraceae*, uma espécie de bactéria ácido acética, organismo modelo para a biossíntese da celulose bacteriana.

A metodologia utilizada para o cultivo foi conforme descrito por Mikkelsen et al. (2009), no qual, a cepa foi cultivada em meio de cultura Hestrin e Schramm (meio HS) com modificação na fonte de carbono, da usual glucose para glicerol, seguindo as seguintes composição: 2% de glicerol ($C_3H_8O_3$) (Himedia), 0,5 % de peptona bacteriológica (Inlab), 0,5% de extrato de levedura (Himedia), 0,27% de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) (Himedia) e 0,115% de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) (Dinâmica) com pH ajustado com ácido acético (CH_3COOH) (Sigma-Aldrich) para 5,5. Após total homogeneização o meio de cultivo foi autoclavado, durante 20 min à $120^\circ C$, a fim de eliminar qualquer contaminação no mesmo. O volume produzido foi proporcional à quantidade que seria utilizada nas placas de cultivo para se evitar desperdícios.

Foram adicionados então, 5% do inóculo líquido de *K. hansenii* crescido em meio HS sob agitação (150 rpm) por 24 h (%v/v) previamente obtido a partir de colônias isoladas em placa de Petri contendo meio HS ágar (meio HS adicionado com $15 g \cdot L^{-1}$ de ágar bacteriológico). Levando em consideração o volume a ser produzido, 5 mL do meio HS inoculado foram distribuídos com o auxílio de uma micropipeta em placas de cultivo de células de 12 poços (fundo chato). Posteriormente, as placas foram colocadas em estufa à $28^\circ C$ por 7 dias sob cultivo estático. Após esse período, as membranas de NCB foram retiradas das placas de cultivo e mergulhadas em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) (Neon) 0,1 M, e mantidas a uma temperatura de $80^\circ C$ sob agitação magnética em béquer durante 90 min para a remoção completa dos microrganismos e compostos do meio de cultivo aderidos às membranas.

Em seguida, as membranas foram lavadas repetidamente com água deionizada para retirada do NaOH residual, até pH neutro e armazenadas em frascos fechados com álcool etílico 70% e sob refrigeração à 4° C para posterior uso.

4.1.1 Secagem das membranas de NCB

Para o processo de secagem das membranas de NCB já previamente preparada conforme subitem 4.1, foi utilizado uma prensa secadora de gel à vácuo com aquecimento (Bio-Rad 543 Gel Dryer) acoplado a uma bomba de vácuo (Primatec).

As membranas purificadas úmidas foram colocadas no meio de dois papéis filtro (21x30 cm), posteriormente a bomba de vácuo foi ligada a -30 mmHg de pressão, o vácuo no Gel Dryer foi devidamente criado, em seguida a temperatura e tempo de aquecimento do Gel Dryer foi ajustado respectivamente para 80° C e 50 min de aquecimento, e configurado para aquecimento linear.

Após decorrido 30 min de aquecimento, o controle de secagem das NCB foi feita visualmente até aparente secagem completa, após retirada a umidade das membranas, as mesmas foram retiradas do secador de gel e armazenadas em placa de Petri devidamente higienizada.

4.2 SÍNTESE E INCORPORAÇÃO DAS NPS-AG NA NCB.

Realizou-se a assepsia com água, sabão e posteriormente acetona (Alphatec) (PA) de todas as vidrarias e utensílios utilizados para o preparo das NPs-Ag, para se evitar qualquer tipo de contaminante que pudesse inibir e/ou reduzir a síntese das NPs-Ag.

No Tabela 1 temos a relação de amostras produzidas com suas devidas concentrações de NPs-Ag, sendo elas: NCB branco sem adição de NPs-Ag, úmida (NCBU-B) e seca (NCBS-B), NCB com NPs-Ag incorporadas *In situ* úmida (NCBU-IA/NCBU-IB) e seca (NCBS-IA/NCBS-IB) e NCB com NPs-Ag incorporadas *Ex situ* úmida (NCBU-E) e seca (NCBS-E).

Tabela 1. Sigla das amostras produzidas e suas respectivas concentrações de NPs-Ag.

Amostras		Concentração de NPs-Ag
Úmida	Seca	
NCBU-B	NCBS-B	0 mol · L ⁻¹
NCBU-IA	NCBS-IA	1 mol · L ⁻¹
NCBU-IB	NCBS-IB	1x10 ⁻¹ mol · L ⁻¹
NCBU-E	NCBS-E	4,04x10 ¹² mol · L ⁻¹ de NPs-Ag em 10 mL de Tolueno

Fonte: O autor, 2023.

4.2.1 Síntese das NPs-Ag *Ex situ*

Foram sintetizadas NPs-Ag passivadas com dodecanotiol (DT), com base na metodologia descrita em Oliveira (2005), no qual todas as soluções utilizadas foram preparadas previamente à sua utilização.

Em um balão de fundo redondo contendo 3,75 mL de uma solução aquosa de nitrato de prata (AgNO₃) 2,99x10⁻² mol · L⁻¹ (contendo 1,12x10⁻⁴ mol de AgNO₃), foi lentamente adicionado (gota a gota, 30 gotas por min) a 10 mL de uma solução em tolueno de brometo de tetraoctilamônio (BTOA) N(C₈H₁₇)₄Br 5,0x10⁻² mol · L⁻¹ (5,0x10⁻⁴ mol de BTOA), e a mistura foi mantida em agitação por 10 min. Ainda sob agitação vigorosa, 25,2 µL de DT (1,05x10⁻⁴ mol) foi adicionado ao meio reacional (razão molar DT/Ag⁺ próxima a 1:1), seguido da adição gota a gota (30 gotas por min) de 3,15 mL de uma solução aquosa 3,97x10⁻¹ mol · L⁻¹ de borohidreto de sódio (NaBH₄) (1,25x10⁻³ mol de NaBH₄). A mistura foi deixada sob agitação magnética por 3 h, e posteriormente a fase orgânica foi separada. A essa fase orgânica contendo as NPs, foi adicionado 40 mL de etanol, e a mistura foi levada ao freezer (-18° C) por 1 h para a precipitação das NPs. As NPs foram então separadas por centrifugação (3000 rpm por 10 min) lavadas diversas vezes com etanol (para a eliminação do excesso de BTOA e DT), redissolvidas em 10 mL de tolueno e acondicionadas em frasco âmbar, até sua utilização.

4.2.2 Síntese e redução de NPs-Ag *In situ*

Foi preparado duas soluções de AgNO_3 (Alphatec) uma com concentração à $1 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, e para tal, foi pesado 0,8494 g de AgNO_3 sólido, e outra a $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e para tal, foi pesado 8,4940 g em seguida, as soluções foram homogeneizadas, e colocadas as membranas de NCB úmidas e secas, e mantidas submersas por 3 h, com meio estático.

Após decorrido as 3 h em solução de AgNO_3 , as membranas foram retirada do béquer e lavada três vezes consecutivas com água deionizada corrente, a fim de retirar o excesso de solução aderida na membrana.

Posteriormente, foram preparadas duas soluções de 100 mL do agente redutor NaBH_4 em duas concentrações diferentes uma a $2 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, preparada pesando-se 0,7566 g de NaBH_4 e outra a $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pesando-se 7,5660 g de NaBH_4 e adicionado água deionizada, e homogeneizado, em seguida, as membranas (úmidas e secas) foram novamente colocadas submersa na solução de NaBH_4 por 1 h, em meio estático.

Após decorrido a 1 h em solução do agente redutor as membranas foram lavada três vezes consecutivas com água deionizada corrente, a fim de retirar o excesso de solução aderida na membrana, e devidamente armazenadas em frascos de vidro com 5 mL de etanol 70%.

4.2.3 Incorporação de NPs-Ag previamente sintetizadas nas membranas de NCB

Inicialmente, em um Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 10 mL de tolueno, e posteriormente adicionado 0,1 mL da dispersão de NPs-Ag preparada no subitem 4.2.1, após, homogeneizou-se a dispersão, gerando assim uma dispersão de concentração estimada de 4×10^{12} NPs-Ag em 10 mL de tolueno. Em seguida, foram colocadas as membranas (úmidas e secas) e submetidas a agitação por 3 h em um *shaker* (Novatecnica – NT715).

4.3 CULTIVO E TESTE MICROBIOLÓGICO

Todos os materiais utilizados para os testes microbiológicos (com exceção dos microrganismos) foram autoclavados e/ou deixados em capela de fluxo laminar com incidência de luz ultravioleta por 15 min, para evitar qualquer contaminação e assim interferências nos testes.

Para o cultivo dos microrganismos foram utilizados meio de cultivo Mueller Hinton Ágar (meio MHA) (TM MEDIA), preparados conforme orientações da embalagem (38 g em 1 L de água deionizada) e posteriormente autoclavado.

Após a autoclavagem, resfriou-se o meio de cultivo até aproximadamente 20° C e em quatro placas de Petri de 90x15 mm foram despejados 40 mL de meio MHA; as placas de Petri foram previamente divididas igualmente em quatro quadrantes e marcadas com suas amostras correspondentes, ou seja, NCB branco úmida e seca (NCBU-B e NCBS-B) sem adição de NPs-Ag, NCB com NPs-Ag incorporadas *Ex situ* úmida e seca à 1 mol · L⁻¹ e à 1x10⁻¹ mol · L⁻¹ (NCBU-E/NCBS-E), NCB com NPs-Ag incorporadas *In situ* úmida e seca à 1 mol · L⁻¹ e à 1x10⁻¹ mol · L⁻¹ (NCBU-IA/IB e NCBS-IA/IB) e Discos com Antibiótico (DA), controle inibitório para as respectivas bactérias testadas (sendo cloranfenicol para *S. aureus* e *E. coli* e gentamicina para *P. aeruginosa* e *E. faecalis*). Em seguida as placas foram colocadas para secagem na capela de fluxo laminar com incidência de luz ultravioleta por 15 min.

Para o cultivo foram utilizadas quatro cepas de bactérias liofilizadas de marca Laborclin sendo elas: *S. aureus* (Gram-positiva), *E. coli* (Gram-negativa), *P. aeruginosa* (Gram-negativa) e *E. faecalis* (Gram-positiva). Para a reativação das bactérias cada uma delas foram passadas na sua respectiva placa de Petri com o auxílio de um *swab* estéril.

Em seguida, as membranas com NPs-Ag foram distribuídas nas placas de Petri com as bactérias em seus devidos quadrantes correspondente a sua incorporação. As placas então foram encubadas em estufa de cultivo microbiológico com temperatura constante de 28° C por 10 dias. Após decorrido os 10 dias, foram analisadas se houve ação antimicrobiana por parte das membranas.

4.4 CARACTERIZAÇÕES

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises de MET foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão da JEOL modelo JEM 1200, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná. Todas as amostras analisadas foram preparadas simultaneamente; para as análises, as amostras foram trituradas e dispersas em solvente para deposição nas grades de microscopia e então posicionadas no equipamento.

4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura da Zeiss, modelo EVO MA 15, localizado no Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Centro. Todas as amostras analisadas foram preparadas simultaneamente, com um corte da amostra, recém preparada colada ao porta amostras e metalizadas com ouro.

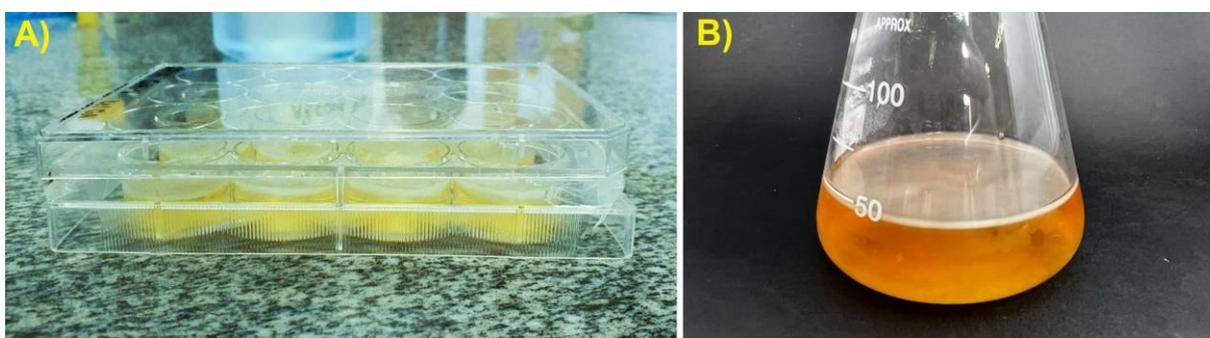
4.4.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As análises de UV-Vis foram realizadas em um Espectrômetro Ultravioleta-Visível da PerkinElmer, modelo Lambda 1050, com esfera integradora acoplada, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Todas as amostras analisadas foram preparadas simultaneamente, com um tamanho aproximado de corte da amostra de 3x1 cm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As NCB foram cultivadas conforme subitem 4.1 em microplacas (Figura 6-A), onde as mesmas permaneceram em meio estáticos à 28° C por 7 dias, no qual, gerou como mecanismo de defesa contra os raios ultravioleta e facilitador de obtenção de oxigênio a membrana de NCB na interface líquido/ar, conforme podemos observar na Figura 6-B.

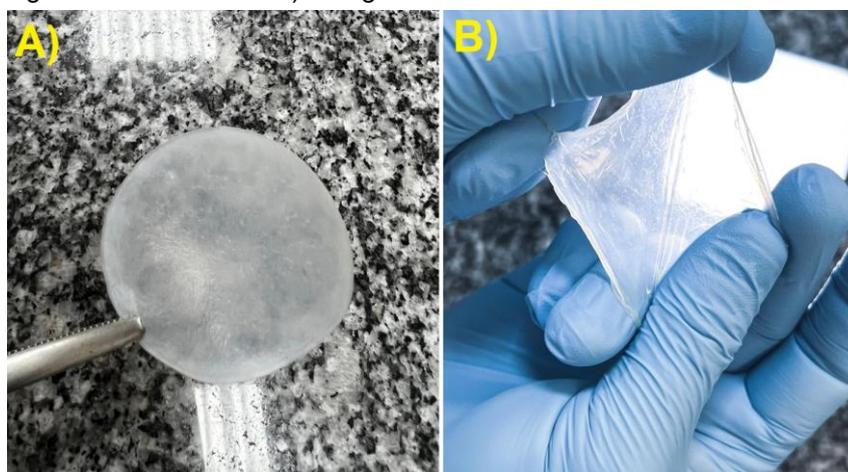
Figura 6. A) Microplacas de cultivo das NCB com poços de fundo chato. B) Membranas (parte esbranquiçada na superfície do meio de cultura) formadas após 5 dias de incubação a 28° C em ambiente estático.



Fonte: O autor, 2023.

Na figura 7-A está presente uma imagem fotográfica do filme de NCB seco, mostrando sua aparência semelhante à de uma papel manteiga quando seca em prensa secadora, conforme metodologia descrita no subitem 4.1.1, e na Figura 7-B temos uma fotografia da NCB úmida, e recém preparada, em ambas das imagens as mesmas se encontram em seu estado puro sem nenhuma incorporação de NPs-Ag.

Figura 7. A) Fotografia da NCB seca. B) Fotografia da NCB úmida.



Fonte: O autor, 2023.

Uma das características visuais notadas durante a produção da NCB, e que explica muito das vezes a morfologia encontrada nas análises, e conforme será citado mais a frente, é a sua espessura (Figura 6-B), que pode ser mais ou menos espessa conforme o tempo em que ela permanece no meio de cultura, pois quanto mais tempo maior é a espessura da membrana produzida. Este fator de controle é extremamente importante para produzir materiais que, em função das suas diferentes espessuras, permitem sua aplicação em diversos campos.

A produção da NCB pela bactéria conforme cita Mikkelsen et al. (2009), é complexa, porém pode ser resumidamente explicada, como sendo o mecanismo de defesa da bactéria contra a radiação ultravioleta, além da membrana produzida auxiliá-la ainda na obtenção de oxigênio; sendo que todo esse processo conta com a atividade de inúmeras enzimas e proteínas catalíticas para ocorrer. Assim, é comum que alguns subprodutos da obtenção estejam presentes na membrana produzida, porém em baixíssima quantidade, resultando em NCB com maior controle na composição do que as de fonte vegetal.

No trabalho de Claro e Magalhães (2017), no qual os autores produziram NCB impregnadas com NPs-Ag para aplicação na proteção de alimentos, as NPs-Ag foram sintetizadas através de reagente de Tollen, por meio de formação de complexo, com posterior impregnação das NPs-met feitos por imersão da NCB em banho sob aquecimento. Os autores relatam que o aumento das concentrações médias das NPs-Ag na NCB foram diretamente proporcionais ao aumento da concentração de óxido de prata na sua produção. Sendo assim, esse resultado pode ser explorado para melhor adequar a obtenção do produto final para um equilíbrio entre efeito desinfetante e economia na produção, uma vez que o nitrato de prata é um insumo de alto valor, o que faz com que ajustes da concentração do precursor e do agente redutor seja uma alternativa para otimizar a impregnação de NPs-Ag na membrana.

Neste trabalho obtivemos nanocompósitos produzidos em dois solventes diferentes, água e tolueno, solventes com polaridades também diferentes (polar e apolar, respectivamente), além de que utilizamos da incorporação com as NCB úmidas e a seca que é um processo feito logo após sua purificação, a utilização de diferentes características, concentrações e meios de incorporação das NPs-Ag nos possibilita ter noção da viabilidade e aplicabilidade para cada uma das amostras produzidas. Como veremos no decorrer das discussões e análises, a

simples alteração na característica da NCB de úmida para seca implica na modificação da quantidade de NPs-Ag incorporadas, o que possibilita explorar diferentes aplicabilidades conforme cada amostra for preparada.

5.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

O espectros de UV-Vis foram realizados em um espectrômetro ultravioleta-visível da PerkinElmer, modelo Lambda 1050, com esfera integradora acoplada, aparato esse onde a NCB foi disposta esticada verticalmente na janela do aparato, e feixes de luz foram incididos na amostras e os dados coletados.

Na Figura 8 estão presentes fotografias das amostras produzidas com NPs-Ag inseridas, mostrando a mudança de coloração que a NCB passa após o processo. Esse é o primeiro indício da obtenção dessas NPs, como proposto, uma vez que a coloração acastanhada é característica das NPs-Ag. Vale aqui mencionar que aparentemente as NPs foram impregnadas em baixa concentração, uma vez que a membrana manteve-se translúcida após o tempo utilizado para a impregnação, lembrando que a intensidade da coloração é diretamente proporcional à concentração impregnada. Ainda assim, apesar da baixa quantidade, sabemos que as NPs foram impregnadas, em função da coloração acastanhada como pode ser visto na figura.

Figura 8. Fotografia de membrana de NCBS-E, onde é possível notar a coloração vermelho acastanhado da prata.

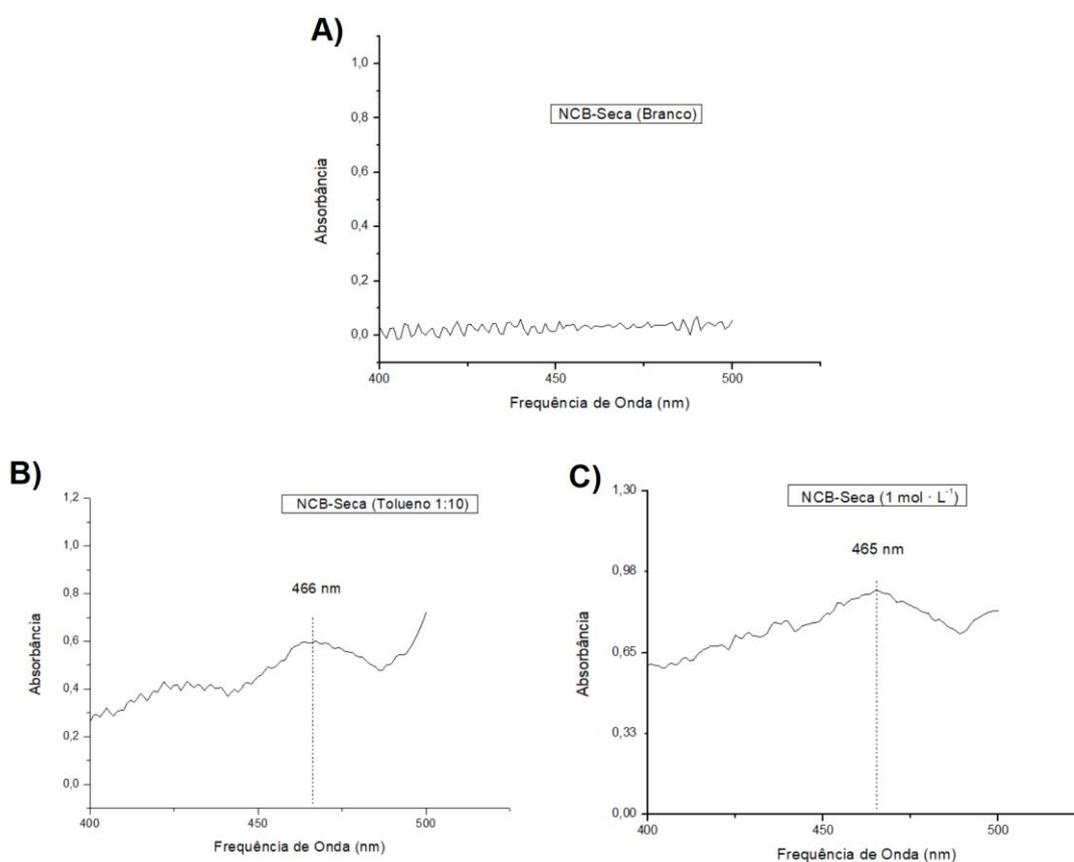


Fonte: O autor, 2022.

Na Figura 9 estão presentes os espectros UV-Vis de algumas das amostras produzidas no decorrer do trabalho. Nota-se a baixa qualidade dos sinais em

função da baixa intensidade e ainda em função da presença de ruídos, lembrando que aqui as linhas foram tratadas matematicamente para melhor visualização. Ainda que os sinais tenham baixa qualidade, uma vez que as amostras são espessas e um tanto opacas para a técnica, vemos sinais centrados por volta de 460 nm, ausentes na amostra de NCB pura, sendo um indício da presença das NPs-Ag tanto para amostras impregnadas com as NPs-Ag previamente sintetizadas quanto para aquelas cuja impregnação foi feita com o cátion Ag^+ com posterior redução.

Figura 9. Espectros UV-Vis das amostras. A) Gráfico da amostra NCBS-B. B) Gráfico da amostra NCBS-E. C) Gráfico da amostra NCBS-IA.



Fonte: O autor, 2022.

Os espectros UV-Vis indicam, como proposto nesse trabalho, a formação das NPs-Ag na NCB, porém, medidas utilizando-se o acessório de reflectância serão importantes para que os dados possam ser tratados matematicamente, chegando em valores de máximo de absorção e de largura à meia altura da banda plasmon, o que pode, juntamente com as imagens de MET mostradas em seguida nesse

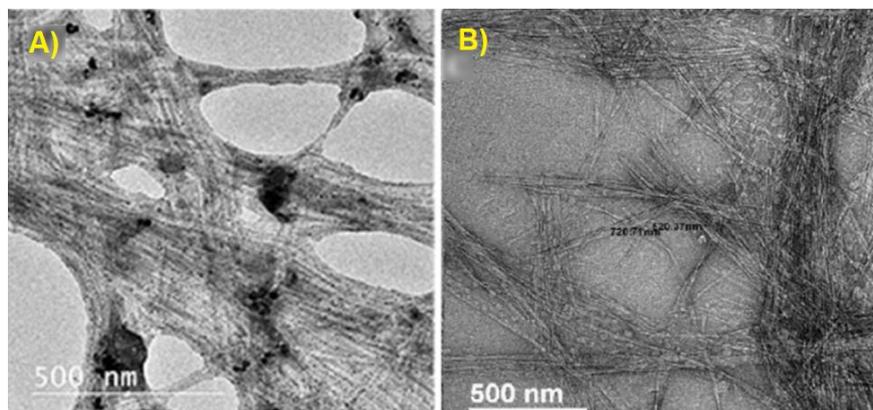
texto, serem devidamente associadas com o tamanho médio e com a distribuição de tamanhos das NPs em cada caso.

5.2 IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO - MET

O preparo de amostras para análise de MET é de fundamental importância, uma vez que o feixe de elétrons precisa atravessar a amostra para que as imagens sejam obtidas. As análises na NCB sem incorporação de NPs-Ag foram realizadas para efeito de comparação com aquelas produzidas via diferentes formas de incorporação de NPs-Ag, de modo a verificar se houve ou não incorporação das mesmas nas membranas, sua homogeneidade e averiguar sua estruturação, bem como, seu comportamento em diferentes solventes (água e tolueno) utilizados no meio de incorporação. Todas as análises por MET foram feitas apenas nas membranas previamente secas.

As imagens de MET das membranas de NCB branco apresentaram resultados interessantes em relação a morfologia, e um tanto quando diferentes quando comparadas às encontradas na literatura, conforme podemos verificar como efeito comparativo na Figura 10-A e B presentes na literatura, onde o emaranhado de fibrilas é bem visível e característico das NCB de *Komagataeibacter hansenii*, o que já não é notado nas imagens obtidas das amostras sintetizadas (Figura 11-A e B), no qual, observamos uma morfologia parecida com “escamas” como se as mesmas estivessem sobrepostas de uma forma compacta e não espaçada conforme visto em outros trabalhos com NCB.

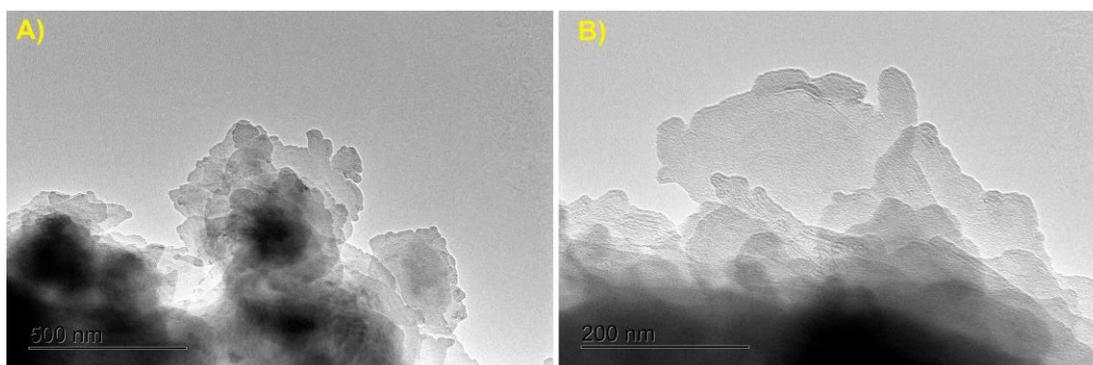
Figura 10. A) Imagens de MET de NCB incorporada com NPs-Ag. B) Imagens de MET das fibrilas de NCB.



Fonte: A) Adaptado de SHAHEEN et al., 2021; B) Adaptado de GUPTE et al., 2021.

Tais espaços entre as fibrilhas, são importantes para que as NPs-Ag ou seus precursores se alojem no espaço nanométrico, e assim as NPs-Ag cresçam com tamanho controlado e sejam incorporadas na matriz de NCB. Entretanto, como as imagens de MET são resultantes de uma projeção bidimensional da estrutura da amostra, isto não restringe a possibilidade de incorporação das NPs na NCB aqui utilizada, uma vez que ainda com a aparência compacta, podemos ter espaços vazios no decorrer do empacotamento das escamas. Vale mencionar aqui que, a obtenção da estrutura tipo “escamas” pode ser resultado tanto do meio de cultura utilizado para o crescimento da NCB quanto de outros fatores como a temperatura ambiente e ainda com a preparação das amostras para MET.

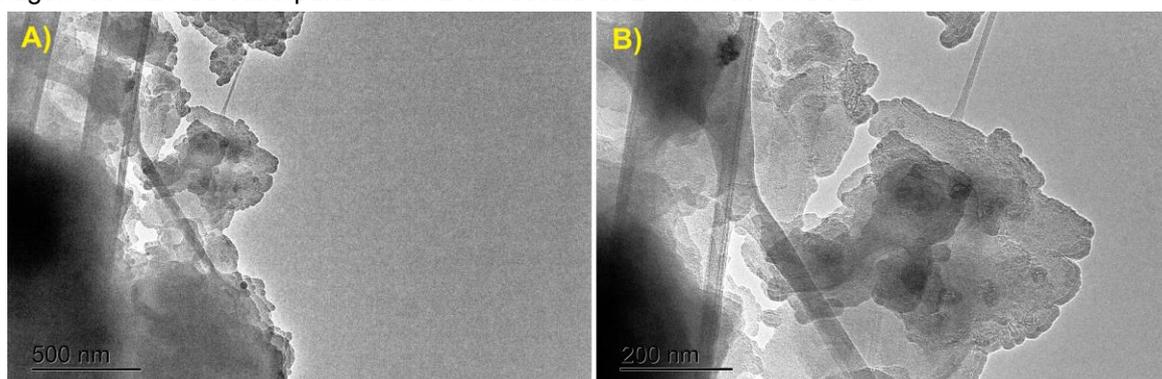
Figura 11. A) Imagem de MET em escala de 500 nm de NCBS-B. B) Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-B.



Fonte: O autor, 2022.

Mesmo com a aparência compacta, como notamos nas regiões mais escuras, de maior contraste, da Figura 12-A, podemos notar a microestrutura da NCB. Na Figura 12-B, com maior magnificação mostrando assim detalhes de uma borda da NCB, temos a interação entre as “escamas” onde nota-se a presença de vazios que podem servir de ancoramento para as NPs, como proposto.

Figura 12. A) Imagem de MET de outra parte da NCB em escala de 500 nm de NCBS-B. B) Imagem de MET de outra parte da NCB em escala de 200 nm de NCBS-B.

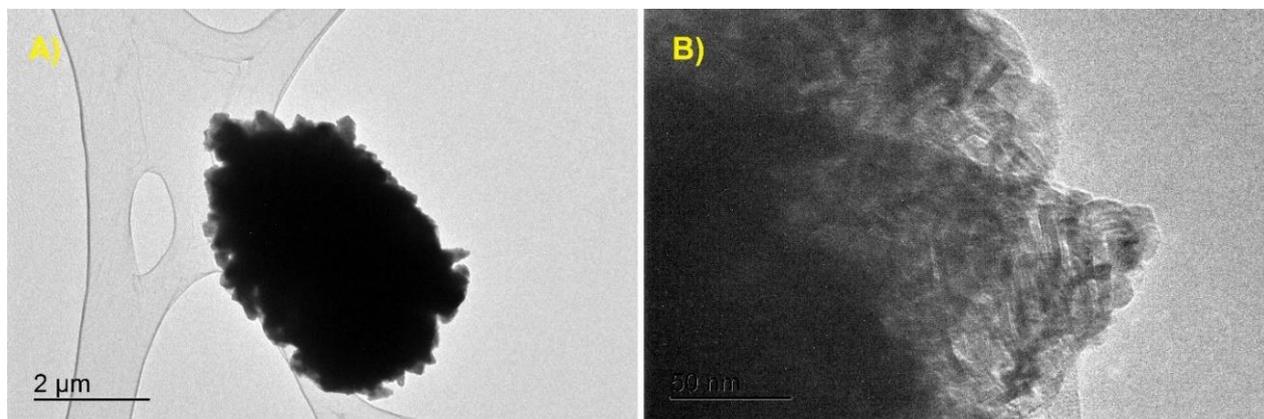


Fonte: O autor, 2022.

Na Figura 13-A e B estão presentes as imagens de MET obtidas da amostra de NCBS-E, ou seja, produzidas com as NPs-Ag previamente sintetizadas através da rota química, primeiramente descrita por Brust et al. (1995, 1994). Nesta rota, as NPs-Ag são produzidas em sistema bifásico água/tolueno, e a reação se dá na interface líquido-líquido. O resultado final é a obtenção de NPs-Ag passivadas por DT, o que estabiliza as partículas e impede seu crescimento e sua degradação. Entretanto, para a tentativa de realização da impregnação com NPs-Ag previamente sintetizadas por esse método, foi necessário o uso de tolueno como solvente, meio em que as NPs-Ag formam dispersão estável, e assim nota-se pelas imagens que a proposta de impregnação por esta rota não foi bem-sucedida, tendo apenas alguns poucos indícios da presença de NPs-Ag entre as escamas da NCB.

Vale aqui mencionar que na Figura 13-B, nota-se que a microestrutura das NCB se mantém quando colocada em um solvente orgânico como o tolueno, sendo assim, a microestrutura de “escama” permanece tal qual na NCB original (branco), demonstrando assim a resistência da NCB à mudança de polaridade do meio. Contudo, a utilização do tolueno pode de alguma forma ter interferido na incorporação das NPs-Ag na membrana, uma vez que para este tipo de incorporação, a boa interação entre a matriz hospedeira e o solvente contendo o hóspede é de fundamental importância para o sucesso da obtenção proposta. A presença do passivante utilizado para estabilizar tais NPs, o DT, também é um fator que deve ser levado em consideração, uma vez que é necessário que exista uma boa interação entre a superfície das NPs e a superfície dos poros da NCB para que a impregnação seja bem sucedida.

Figura 13. A) Imagem de MET em escala de 2 μm de NCBS-E. B) Imagem de MET em escala de 50 nm de NCBS-E.

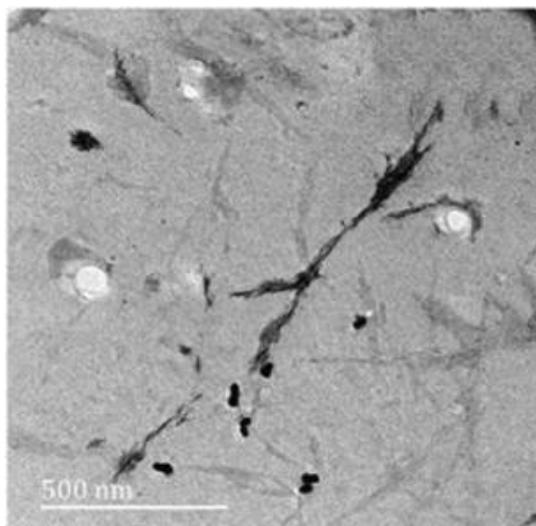


Fonte: O autor, 2022.

Conforme Gibril et al. (2018), que realizaram a incorporação de prata (rota ácida de síntese), zinco e hidroxiapatita em uma suspensão de NCB, relatam que em imagens de MET de espécies com NPs-met como as de prata, por conta da densidade eletrônica maior, as mesmas ficam visualmente com maior contraste como podemos ver na Figura 14, onde os pontos bem escuros são atribuídos à prata incorporada na matriz. Entretanto no caso aqui apresentado, com a baixa concentração das NPs-Ag na NCB, temos uma quantidade pequena destas ocorrências nas imagens. Aqui, medidas de análises térmicas (TGA e DSC) serão fundamentais para comprovar a baixa quantidade de NPs impregnadas por essa rota.

Um ponto importante a ser observado nessas amostras é a organização das NPs enfileiradas, indicando que existem poros na NCB que interagem com as NPs, permitindo então sua entrada.

Figura 14. Imagem de MET em escala de 500 nm de NCB produzidas a partir de iodo incorporadas com NPs-Ag.

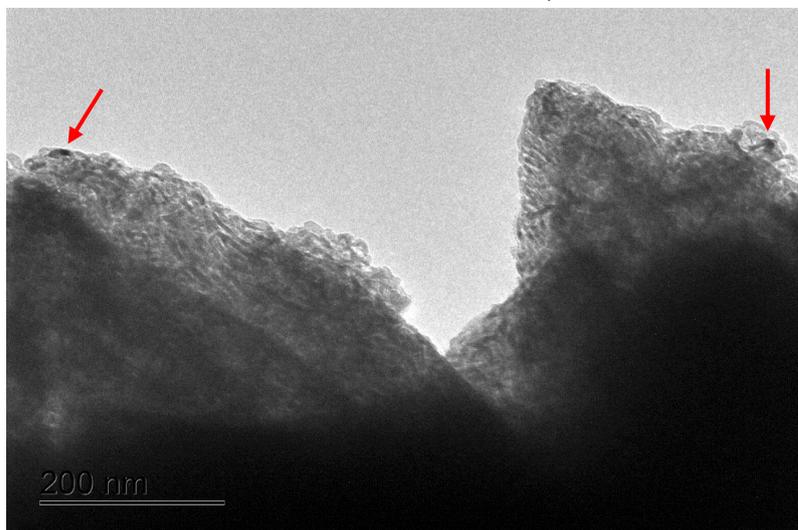


Fonte: Adaptado de GIBRIL et al., 2018.

Na Figura 15 (amostra NCBS-E), observamos a presença de NPs-Ag incorporadas, como destacado pelas setas, contudo, aparentemente com uma concentração baixa e não demonstrando homogeneidade na distribuição, o que já não é visto na Figura 16, que apresentou diversos pontos escuros, deixando claro que aparentemente as NCB úmidas incorporam e/ou aderem mais NPs-Ag, corroborando com a hipótese de que a secagem consolida as escamas, diminuindo os espaços entre as fibrilas da NCB e dificultando ainda mais a entrada de NPs-Ag como proposto. As imagens aqui apresentadas deixam clara a importância do

estudo de rotas de impregnação, solventes apropriados e superfícies das espécies interagentes para que um controle da concentração de NPs nas membranas possa ser alcançado.

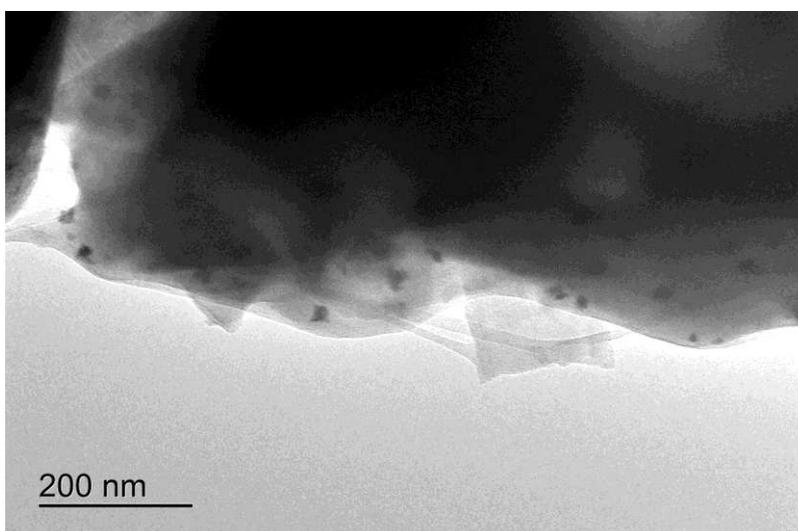
Figura 15. Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-E (setas indicam NPs-Ag).



Fonte: O autor, 2022.

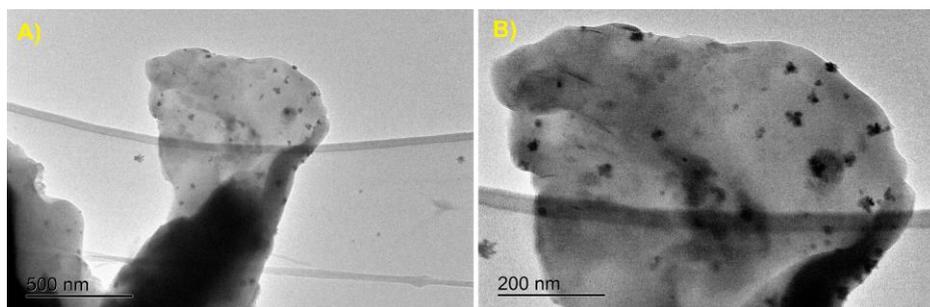
Nas Figuras 16 e 17-A e B, que mostram imagens dos nanocompósitos NCBU-E, é possível observar diversos pontos escuros, que indicam a presença de NPs-Ag na amostra, os pontos apresentam certa homogeneidade em sua distribuição. A número de pontos vistos nas imagens da amostra NCBU-E são muito maiores do que os vistos na amostra com a mesma rota de incorporação, porém, com a membrana seca, indicando que a abertura dos poros é fundamental para uma entrada mais efetiva das NPs-Ag.

Figura 16. Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBU-E.



Fonte: O autor, 2023.

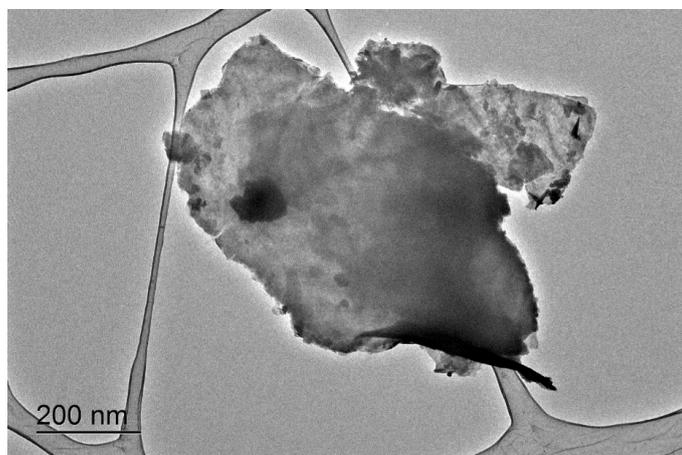
Figura 17. A) Imagem de MET em escala de 500 nm de NCBU-E. B) Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBU-E.



Fonte: O autor, 2023.

As imagens de MET das amostras de NCBS-IB, com a impregnação de Ag^+ nos espaços entre as escamas, com posterior redução com o uso do NaBH_4 estão presentes nas Figuras 18 a 28. Nota-se na Figura 18 que as NPs-Ag foram sintetizadas nos espaços inter-fibras da NCB, entretanto a distribuição das NPs também não foi homogênea por toda a NCB. Nota-se ainda que as NPs adquirem formatos diferentes do esférico, tornando-se alongadas e com formato acicular, principalmente nas bordas dos grãos de NCB.

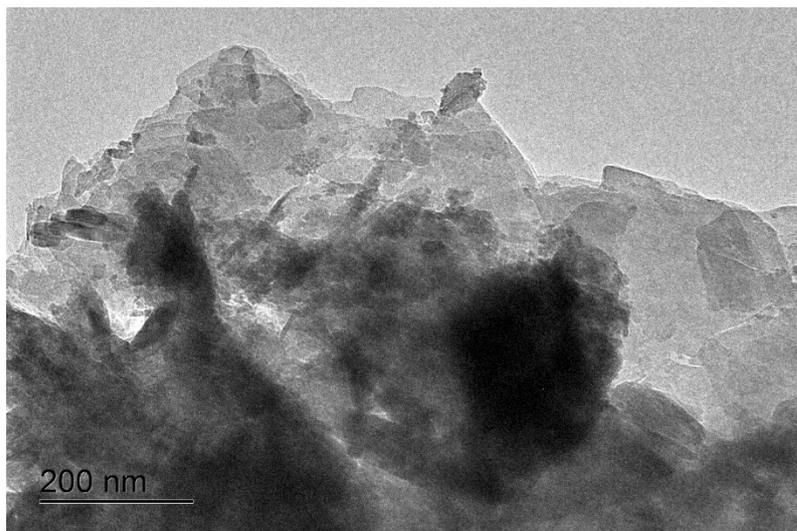
Figura 18. Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB.



Fonte: O autor, 2022.

Cieśła et al. (2020), que utilizaram de uma rota de síntese de NPs-Ag semelhante à realizada no presente trabalho, notaram por imagens MET a heterogeneidade do tamanho das NPs-Ag incorporados no meio, independente da concentração de AgNO_3 utilizada na solução precursora. Nas imagens de MET aqui apresentadas nota-se que há partículas grandes e pequenas, o que corrobora com os dados da literatura, no que diz respeito ao controle limitado do tamanho das NPs-Ag nesses sistemas, podendo ser atribuído também a matriz de NCB que está em escamas e com espaços vagos heterogêneos dentre as fibrilas conforme Figura 19.

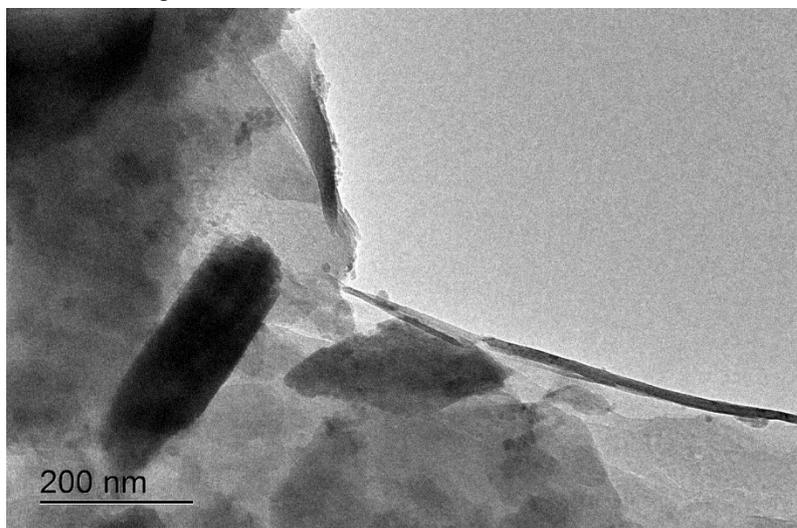
Figura 19. Imagem de MET em escala de 200 nm de outra área da NCBS-IB.



Fonte: O autor, 2022.

A Figura 20, demonstra a heterogeneidade da incorporação das NPs-Ag nas amostras NCBS-IB, onde observou-se que aparentemente as NPs-Ag ficaram aderidas preferencialmente na superfície, em função provavelmente da interação do cátion prata com os grupos funcionais da superfície da NCB. Além disso, vale lembrar que a entrada dos cátions também depende de capilaridade do solvente juntamente com a difusão do precursor no meio. Assim, estudos com soluções contendo diferentes concentrações de precursor, mudança de temperatura e tempo de impregnação são necessários para uma conclusão criteriosa. Contudo, temos amostras contendo NPs-Ag cujo crescimento aqui é restringido por barreira física, num material final do tipo hospedeiro-hóspede.

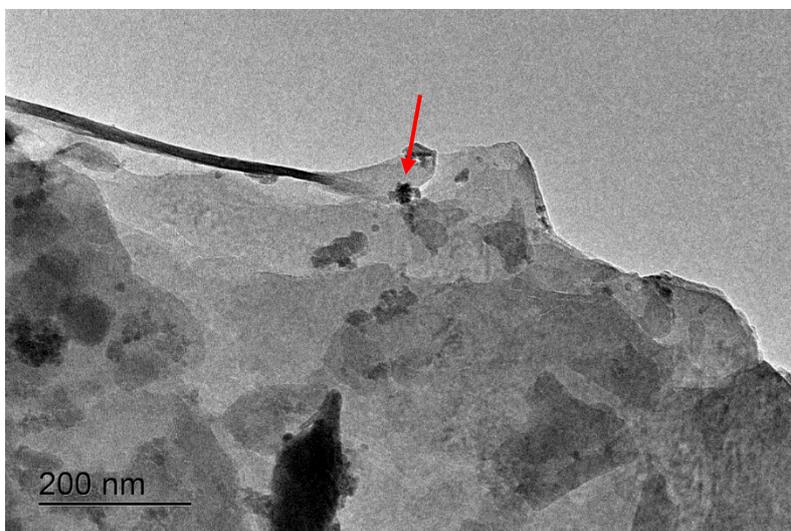
Figura 20. Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB, com mais detalhes escuros de possível alojamento de NPs-Ag.



Fonte: O autor, 2022.

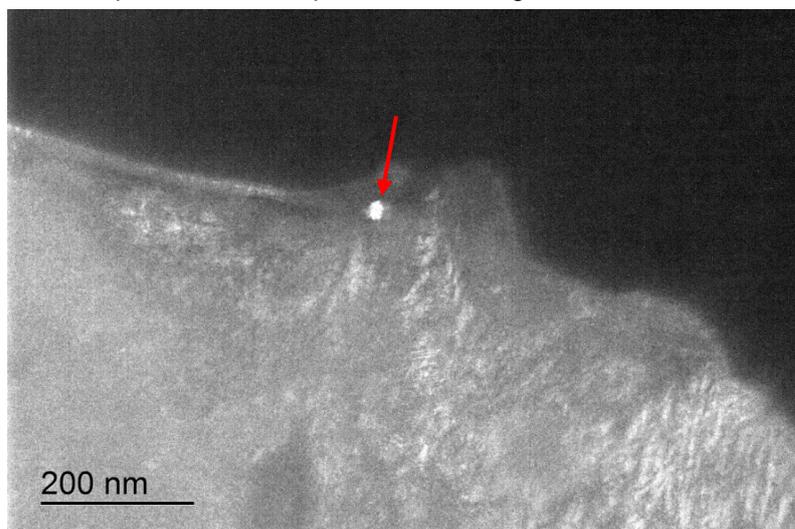
Na Figura 21, podemos notar a morfologia de escamas assim como na NCB branco e na NCB *Ex situ*, o que mostra que mesmo a membrana após secagem e reidratação realizado pela solução precursora e do agente redutor durante a formação das NPs-Ag, que não houve alteração em sua estrutura, demonstrando sua resistência e plasticidade. O interessante também de se observar é que há algumas espécies de maior contraste, como já dito anteriormente, que podem indicar a presença de NPs-Ag na membrana, e que pode ser confirmada com a obtenção de imagens de campo escuro, como visto na Figura 22.

Figura 21. Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB, onde na seta em vermelho observamos NPs-Ag.



Fonte: O autor, 2022.

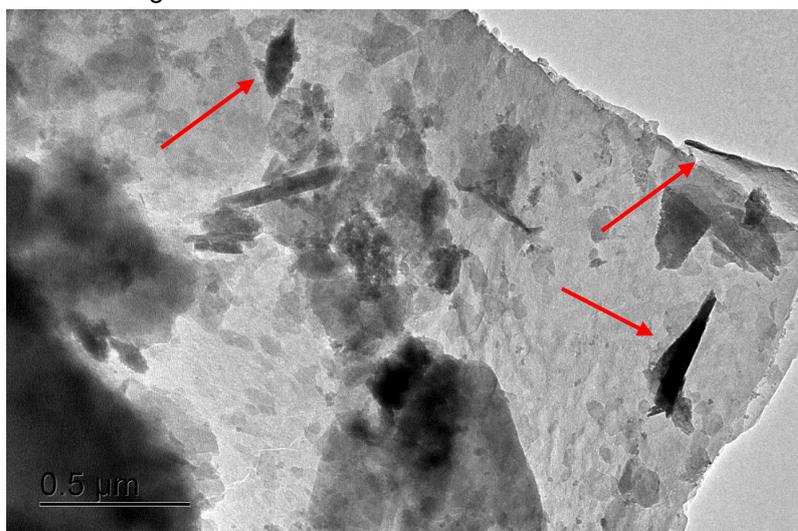
Figura 22. Imagem em campo escuro de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB, onde na seta em vermelho observamos ponto luminoso que indica NPs-Ag cristalina.



Fonte: O autor, 2022.

Já na Figura 23, podemos notar regiões de alto contraste e que podem indicar o acúmulo de NPs-Ag, porém novamente vemos que não há uniformidade tanto na incorporação quanto no crescimento das mesmas. Entretanto isso não inviabiliza seu uso potencial como bactericida e/ou virucida, lembrando que, mesmo heterogêneas, as NPs apresentam altos valores de área superficial, o que é fundamental para a aplicação proposta.

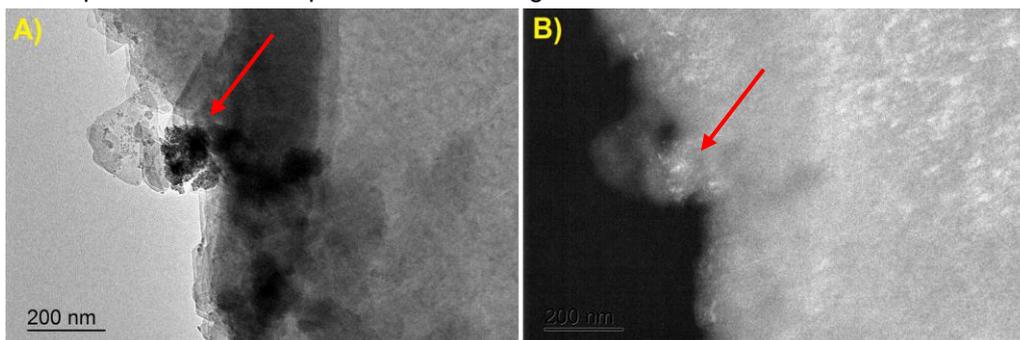
Figura 23. Imagem de MET em escala de 0,5 μm de NCBS-IB, onde na seta em vermelho observamos possíveis NPs-Ag.



Fonte: O autor, 2022.

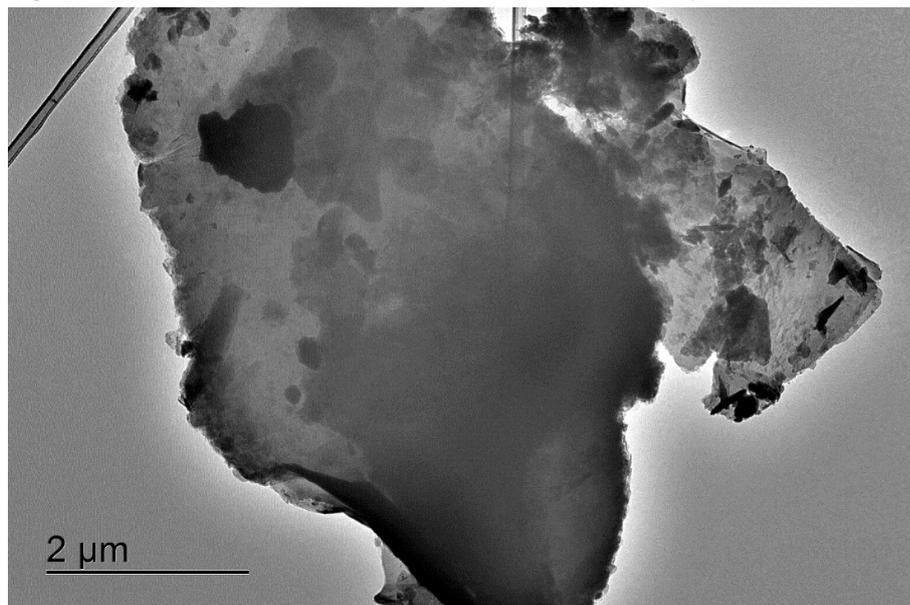
Na Figura 24-A, podemos ver algumas áreas de aglomerados (vide seta) que demonstra que, mesmo após o processo de síntese, a organização estrutural das NCB se mantêm. As Figuras 24-A e B mostram a comparação entre o campo claro e escuro de uma mesma região, deixando claro a presença das NPs-Ag cristalinas, e a Figura 25 mostra imagem de outra região mais espessa da amostra, novamente mostrando a heterogeneidade das estruturas de prata obtidas na rota *In situ*.

Figura 24. A) Imagem de MET de NCBS-IB, onde na seta em vermelho observamos a presença de NPs-Ag. B) Imagem em campo escuro de MET em escala de 200 nm de NCBS-IB, onde observamos pontos luminosos que indicam NPs-Ag cristalina.



Fonte: O autor, 2022.

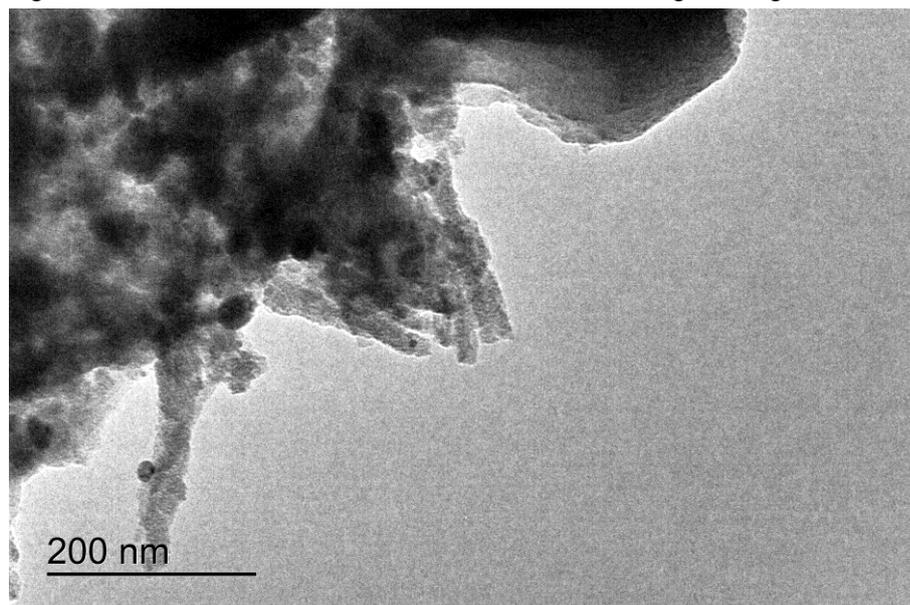
Figura 25. Imagem de MET de NCBS-IB, onde observa-se as NPs de prata.



Fonte: O autor, 2022.

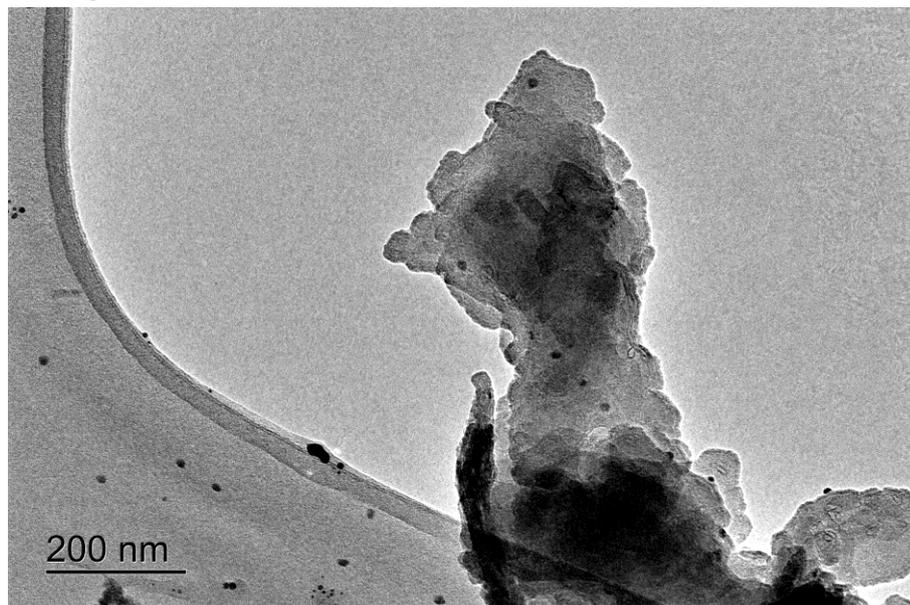
Nas Figuras 26 e 27, ambas de NCBS-IA podemos observar maior quantidade de pontos que podem ser relacionados com a presença de NPs-Ag, o que pode indicar maior concentração de prata, visto que essas amostras contam com uma concentração 10x maior do precursor na solução de obtenção do que a anterior; outro ponto interessante observado é a maior homogeneidade desses pontos, o que já não é visto nas amostras *In situ* com concentração menor.

Figura 26. Imagem de MET de NCBS-IA, onde observa-se as NPs-Ag nas regiões mais escuras.



Fonte: O autor, 2023.

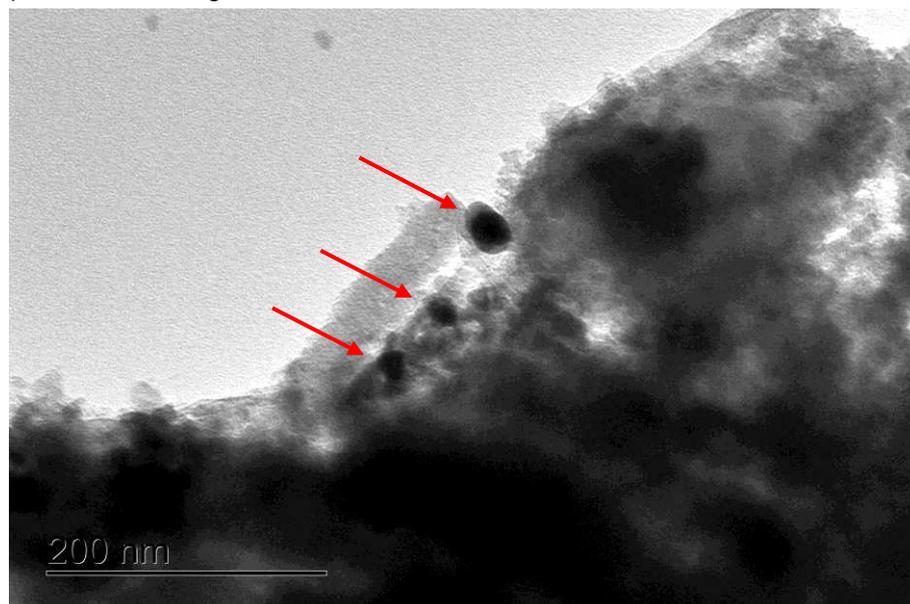
Figura 27. Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IA, onde observamos pontos escuros que indicam NPs-Ag.



Fonte: O autor, 2023.

Na Figura 28 podemos observar conforme destacado pelas setas, possíveis NPs-Ag, além do alto contraste da imagem característicos das NPs-met. O maior número de partículas, bem como um aparente aumento no tamanho médio das mesmas nessas amostras quando comparada com a anterior é justificado pela maior concentração de prata no meio de impregnação.

Figura 28. Imagem de MET em escala de 200 nm de NCBS-IA, onde nas setas em vermelho observamos possíveis NPs-Ag.



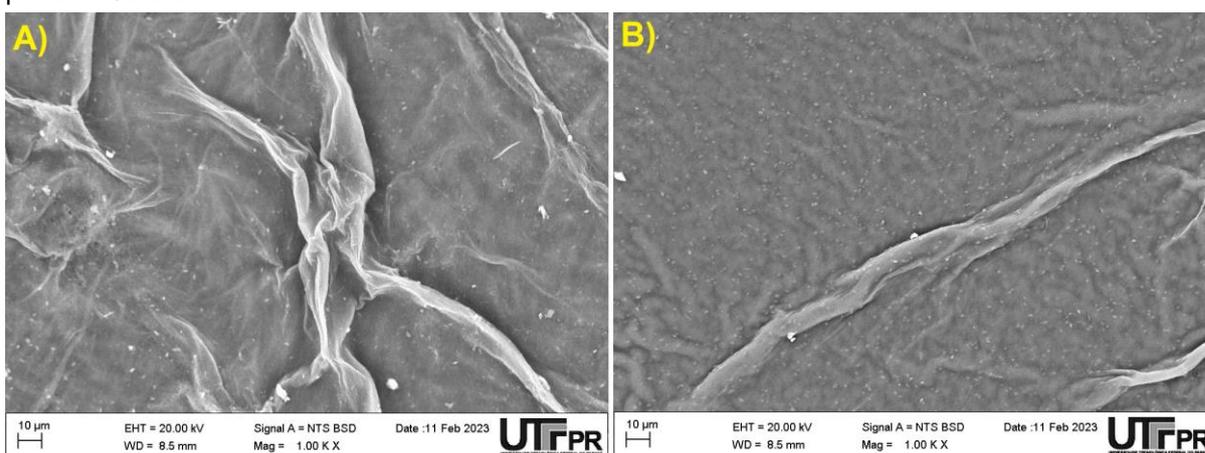
Fonte: O autor, 2023.

Os resultados demonstrados podem indicar que o mecanismo de impregnação das NPs-Ag posteriormente sintetizadas é facilitado, quando comparado com as NPs-Ag previamente sintetizadas, talvez pela maior facilidade de entrada do cátion Ag^+ pelos poros da NCB. Além disso, no caso das NPs-Ag previamente sintetizadas, temos ainda a questão da menor afinidade do solvente apolar com os grupos funcionais da NCB, que assim acabam por dificultar a incorporação ou adsorção das NPs-Ag nas membranas, podemos notar também que quanto maior a concentração do agente precursor também acarreta na maior concentração de NPs-Ag incorporadas e/ou aderidas.

5.3 IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV COM ESPECTROSCOPIA POER ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

As imagens MEV da amostra NCBU-B e NCBS-B presentes nas Figuras 29-A e B, respectivamente, mostraram membranas com superfície homogênea, como esperado. Nas imagens também podemos observar claramente visto que estão na mesma magnificação, a diferença de superfície entre a membrana úmida e seca, onde a úmida apresenta mais rugosa e a seca mais lisa.

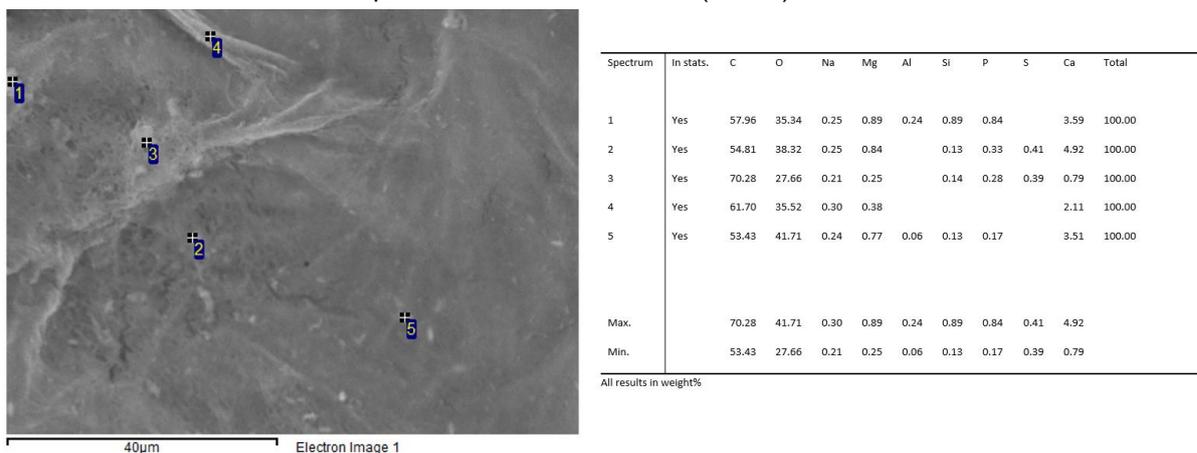
Figura 29. A) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBU-B. B) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBS-B.



Fonte: O autor, 2023.

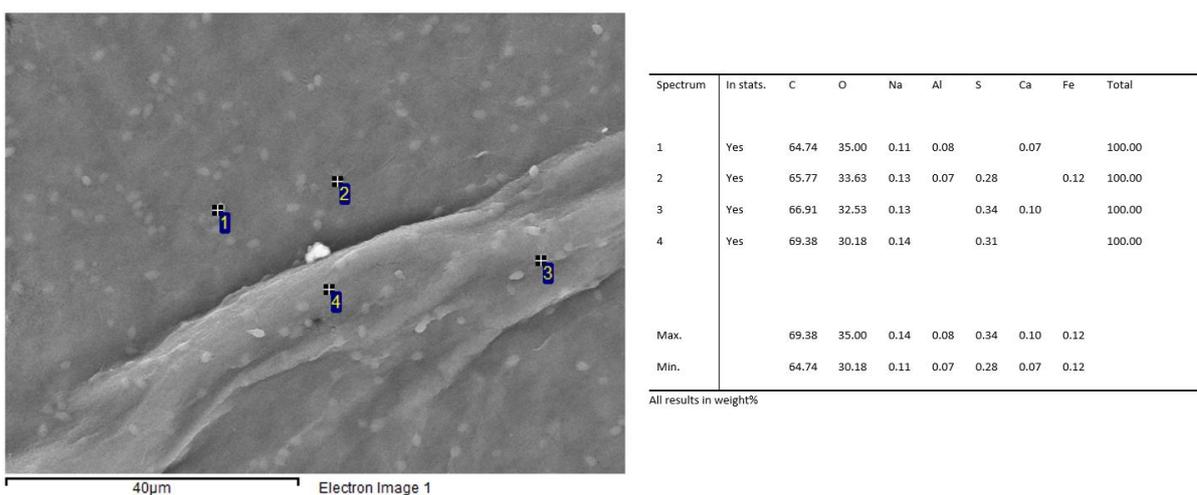
Nas Figuras 30 e 31 (ambas a esquerda), temos os pontos demarcados para análise EDS, pois como podemos observar alguns detalhes na superfície da amostra nas Figuras 29-A e B, há a presença de alguns artefatos que podem ter sua origem no manuseio do material pós síntese.

Figura 30. Imagem de MEV de NCBU-B. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBU-B (direita).



Fonte: O autor, 2023.

Figura 31. Imagem de MEV de NCBS-B. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBS-B (direita).



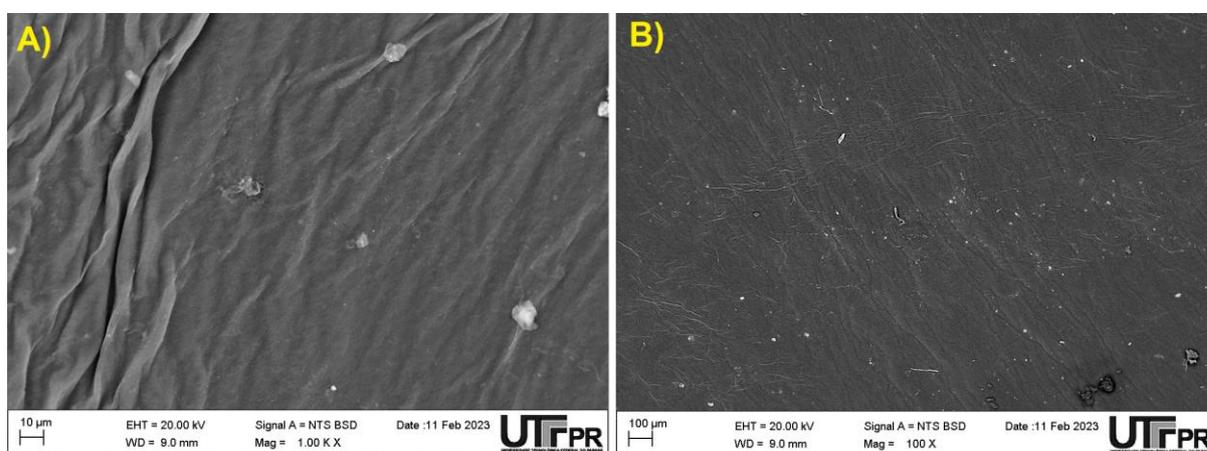
Fonte: O autor, 2023.

Foram realizadas análises com EDS, para efeito de comparação com as demais amostras impregnadas com NPs-Ag. Os dados obtidos estão em porcentagem nas tabelas ao lado de suas respectivas imagens (Figura 30 e 31 ambas a direita), onde nota-se a presença majoritária dos elementos carbono e oxigênio. Os demais constituintes estão em baixa concentração e podem estar relacionados com subprodutos residuais da síntese da NCB.

Nas Figuras 32-A e B estão presentes as imagens MEV da amostra de NCBU-E e NCBS-E, respectivamente; onde nota-se em ambas, pontos brilhantes que indicam a presença de NPs-Ag. Em ambos os casos, como as NPs-Ag previamente sintetizadas estão dispersas em tolueno, uma solução apolar, diferente da que foi

utilizada para preparar as NCB (água – polar) pode ter dificultado a incorporação das NPs-Ag na matriz, contudo as NPs-Ag podem ter ficado aderidas na superfície das mesmas (mesmo que em pouca quantidade), pois conforme veremos nas análises EDS há a presença de prata em quantidade singelas, essa pouca quantidade pode ser explicada também pelas questões de afinidade da superfície da membrana (composta por hidroxilas – polares) com o DT que recobre as NPs (apolar). Pode-se observar também aqui a diferença de rugosidade dentre NCB úmida e seca.

Figura 32. A) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBU-E. B) Imagem de MEV em escala de 100 μm de NCBS-E.

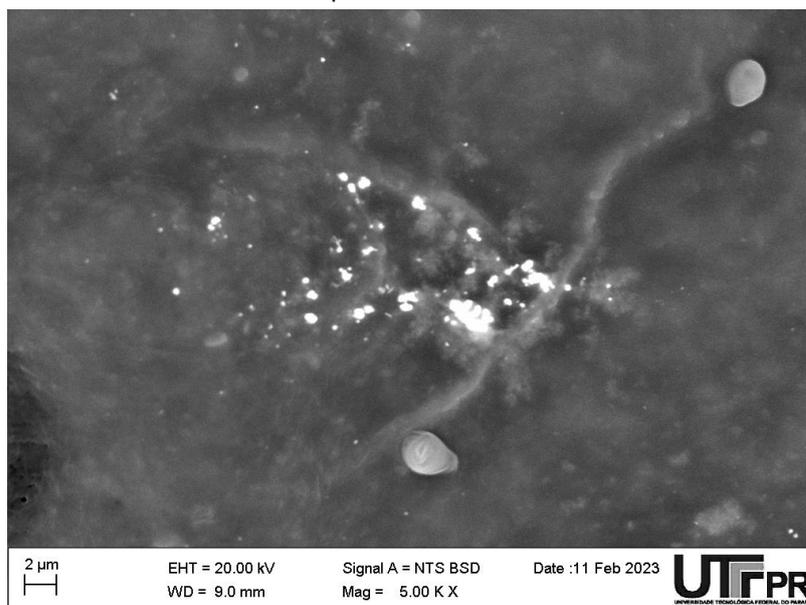


Fonte: O autor, 2023.

Na Figura 33 está presente uma imagem da amostra NCBS-E feita com maior magnificação onde nota-se o efeito descrito anteriormente de intumescimento, juntamente com alguns pontos com alto brilho que foram relacionados com a presença de prata nas análises de EDS. Assim, temos que a tentativa de obtenção de nanocompósitos contendo NPs-Ag previamente preparadas, na NCB é possível, contudo, a quantidade de NPs-Ag incorporados e/ou aderidos aparenta ser baixa, tanto em NCB úmida quanto na seca. Novamente medidas de análises térmicas tornam-se fundamentais para tal conclusão.

Vale mencionar aqui que a secagem das amostras novamente mostra como resultado a diminuição nos espaços entre fibrilas o que dificulta a entrada das NPs-Ag na NCB. Tal fato foi observado nas amostras sintetizadas por Gupte et al. (2021), que descreve que o processo de secagem faz as fibrilas coalescerem entre si, sendo isto, resultado das ligações de hidrogênio, que faz com que diminua ainda mais o espaço existente dentre elas.

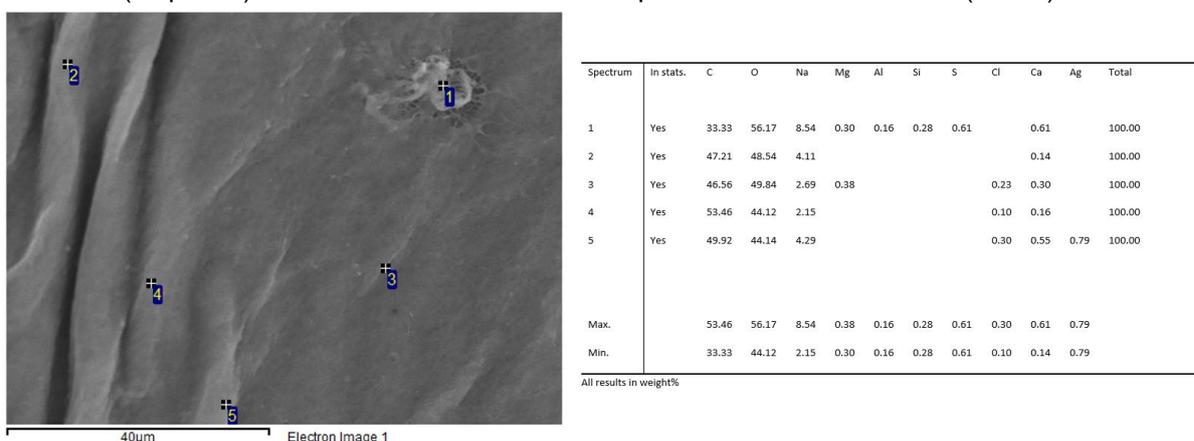
Figura 33. Imagem de MEV em escala de 2 μm de NCBS-E.



Fonte: O autor, 2023.

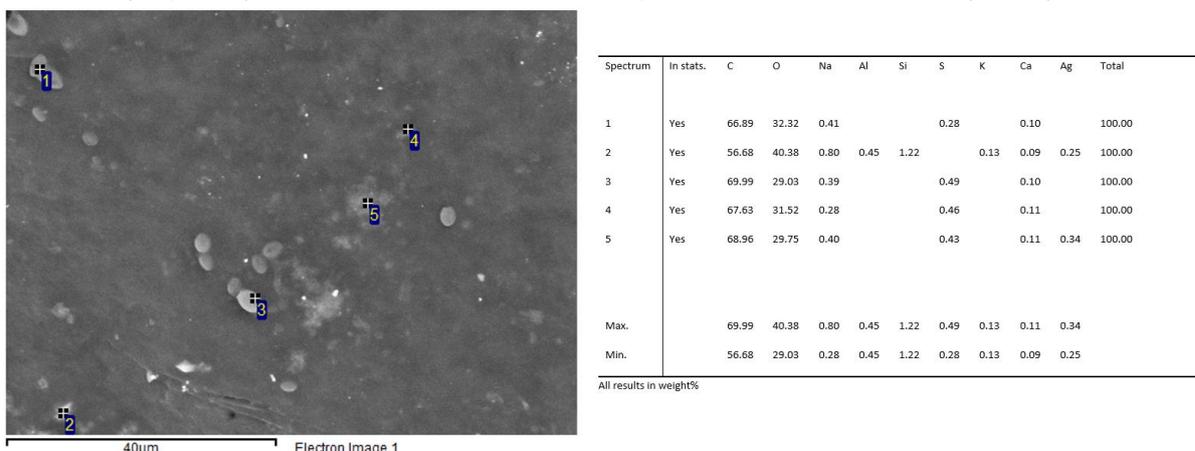
Como já mencionado, para verificação da composição dos pontos brilhantes observados na NCB estarem relacionados à presença de NPs-Ag, foram realizadas análise EDS, em 5 pontos (em ambas as amostras), conforme demarcado na Figura 34 e 35 (ambas a esquerda), do qual foi encontrado sinais de prata na superfície da amostra, e talvez, a adsorção na superfície da mesma não tenha ocorrido de forma efetiva por conta das NPs-Ag sintetizadas *Ex situ* serem como já mencionado incorporadas em um meio apolar (tolueno) dificultando assim a interação dos grupos funcionais polares (hidroxilas) que compõem a amostra, logo, dificultando também a não aderência na superfície da NCB de forma satisfatória.

Figura 34. Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBU-E. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBU-E (direita).



Fonte: O autor, 2023.

Figura 35. Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBS-E. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBS-E (direita).



Fonte: O autor, 2023.

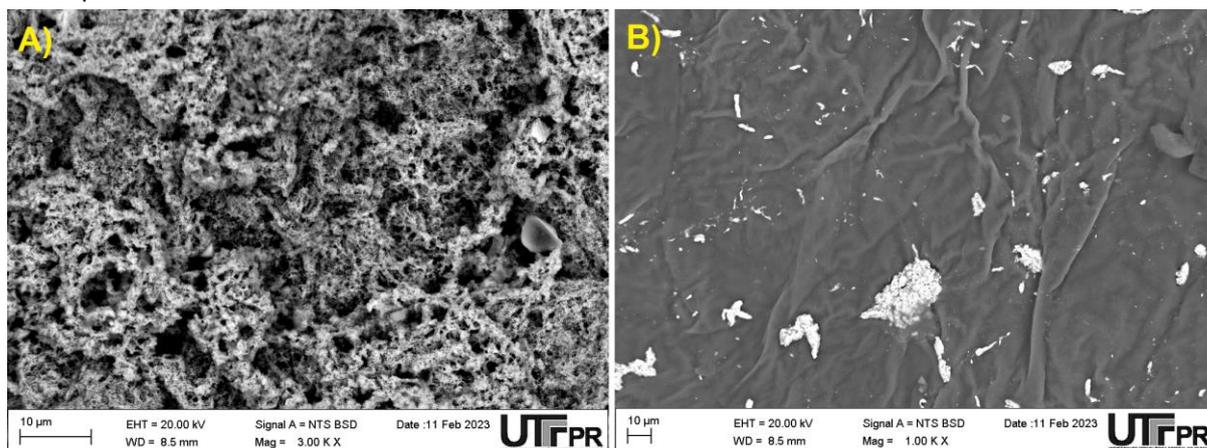
Devido a menor quantidade de água presente na amostra NCBS-E o solvente orgânico pode ter intumescido mais a NCB seca do que a úmida, o que acarretou em uma incorporação levemente maior de NPs-Ag na NCB, o que justifica ter sido encontrado prata em mais de 1 ponto.

E assim como na análise EDS das NCB branco há a presença de outros elementos, que são possíveis subprodutos da obtenção da NCB, além de também a assinatura de carbono e oxigênio (composição da NCB), como pode ser visto na tabelas ao lado de suas respectivas imagens (Figura 34 e 35 ambas a direita).

Como as amostras NCB com NPs-Ag incorporadas *Ex situ*, demonstraram ser nanocompósitos com baixa concentração de prata, passaremos agora para as imagens de amostras obtidas com a incorporação dos Ag^+ nos interstícios da NCB, com posterior redução química com a utilização do NaBH_4 como agente redutor. Para efeito de comparação de incorporação foram utilizadas membranas úmidas e também previamente secas, comumente utilizado em sínteses de NPs-met.

Discutiremos agora as amostras com concentração $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NPs-Ag sintetizadas *In situ*. Conforme podemos observar na Figura 36-A, há a presença de manchas com alto brilho na NCBU-IA que indica a presença de prata na superfície, bem como na Figura 36-B, com a amostra NCBS-IA, também podemos observar pontos brilhantes, até mesmo distribuídos de forma mais homogênea do que a NCB úmida, talvez por conta da superfície ser mais lisa e não rugosa como a encontrada na NCB úmida.

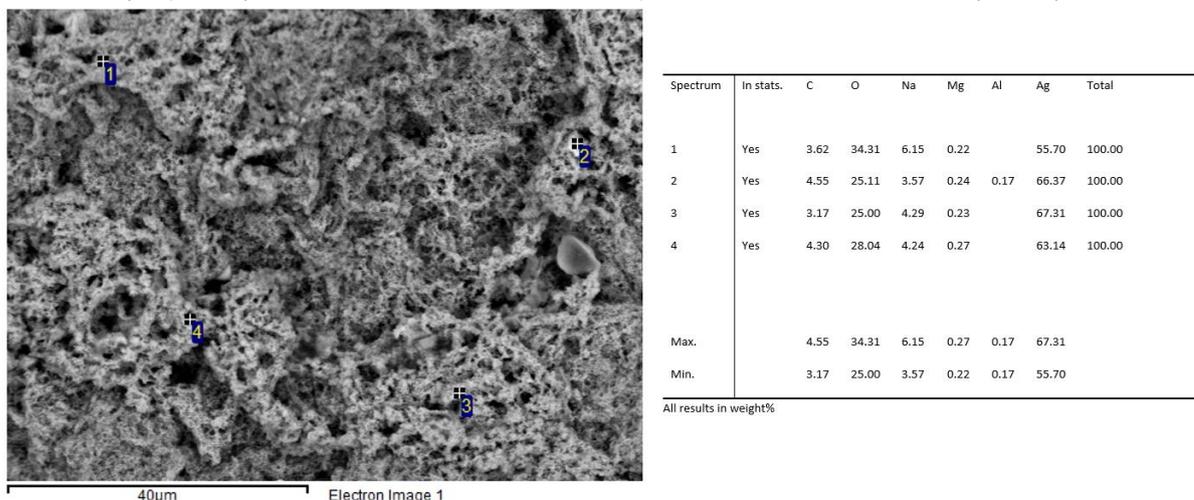
Figura 36. A) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBU-IA. B) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBS-IA



Fonte: O autor, 2023.

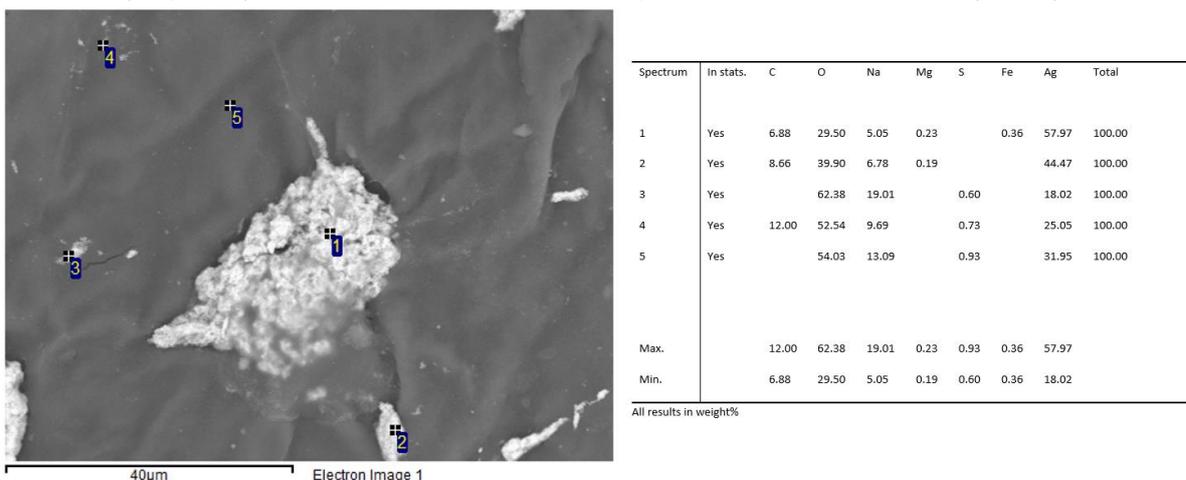
Nas Figuras 37 e 38 (ambas a esquerda), podemos ver pontos de brilho mais intensos e que após análises de EDS (Figura 37 e 38 ambas a direita), constatou-se que assim como nas demais imagens há a presença de carbono e oxigênio (composição da NCB), mas também a presença elevada de prata em todos os pontos analisados, com maior concentração de prata encontrada na amostra úmida (NCBU-IA), o que corrobora com a hipótese de que a incorporação utilizando de solventes que tenham afinidade com a superfície da amostra, facilita a incorporação das NPs-Ag na superfície da mesma.

Figura 37. Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBU-IA. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBU-IA (direita).



Fonte: O autor, 2023.

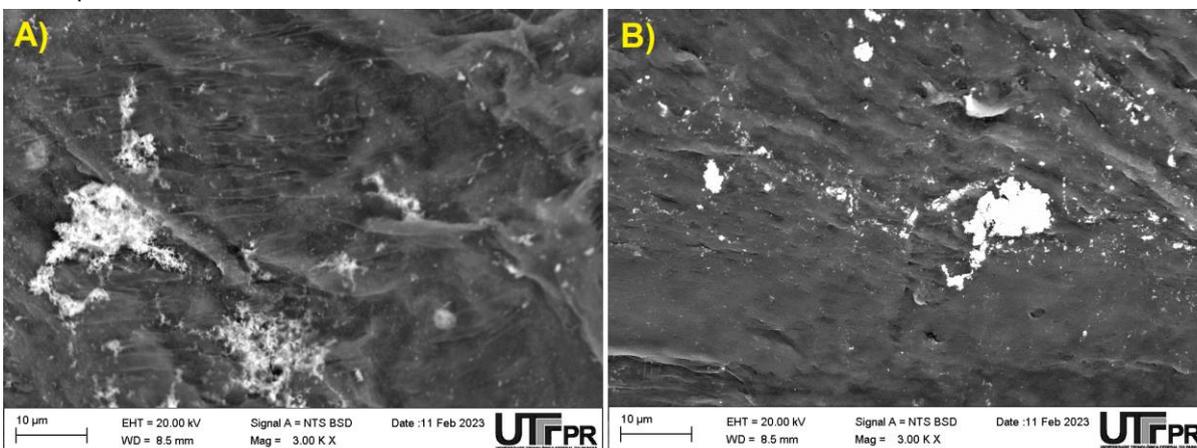
Figura 38. Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBS-IA. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBS-IA (direita).



Fonte: O autor, 2023.

Nas Figura 39-A e B, onde encontra-se imagens das amostras NCBU-IB e NCBS-IB respectivamente, com concentrações de NPs-Ag de $1 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, nota-se que há a presença de pontos com alto brilho que indicam a presença de prata na superfície das membranas, mesmo com concentração 10x menor que a anterior.

Figura 39. A) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBU-IB. B) Imagem de MEV em escala de 10 μm de NCBS-IB.



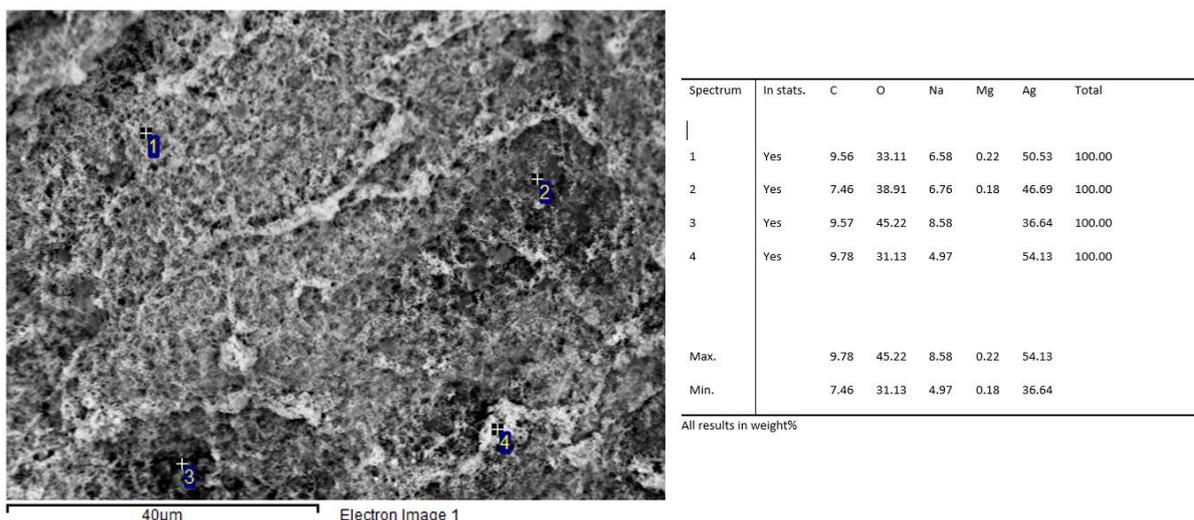
Fonte: O autor, 2023.

Na Figuras 40-esquerda podemos observar assim como nas membranas úmidas anteriores a rugosidade das mesmas bem como manchas brancas que foram analisadas por EDS, e já na Figura 41-esquerda, podemos ver uma morfologia mais lisa, explicada pela fibrilas estarem compactadas, e também pontos de brilho mais intensos ligadas a presença de prata.

Após análises de EDS (Figuras 40 e 41 ambas a direita), constatou-se que assim como nas demais imagens há a presença de elementos da composição das

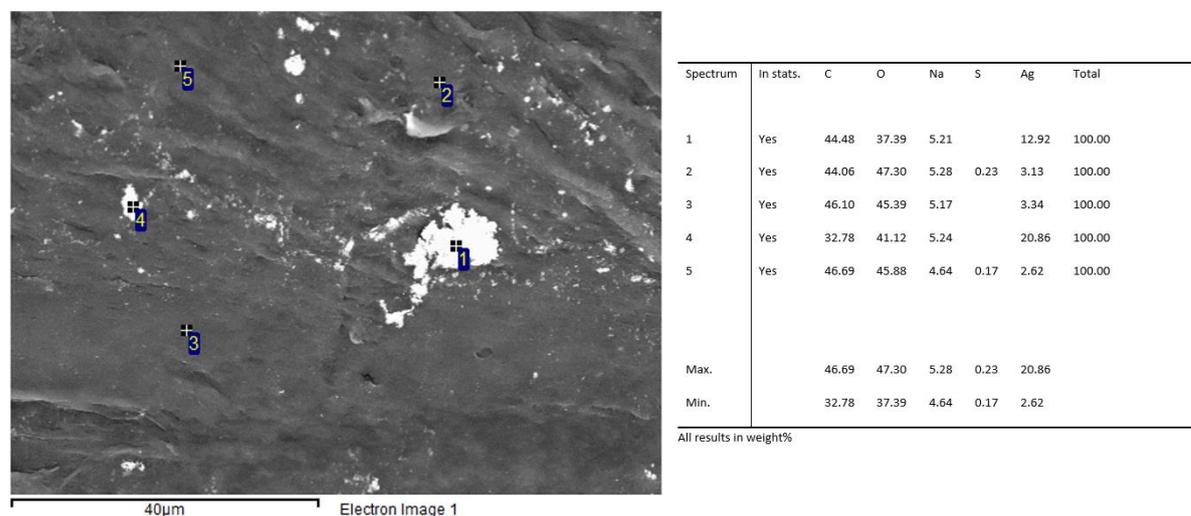
NCB, como carbono e oxigênio, e também a presença de prata em todos os pontos, assim como nas amostras *In situ* anteriores, a maior concentração de prata encontra-se nas amostras úmidas.

Figura 40. Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBU-IB. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBU-IB (direita).



Fonte: O autor, 2023.

Figura 41. Imagem de MEV em escala de 40 μm de NCBS-IB. Pontos demarcados para análise com EDS (esquerda). Resultados de análise de EDS para amostras de NCBS-IB (direita).



Fonte: O autor, 2023.

Podemos agora comparar através da MEV comparada com a MET, que as NPs-Ag ficaram mais aderidas na superfície da amostra do que incorporada à mesma. A prata na MEV é visualizada como pontos luminosos nas imagens assim como pode ser visto em diversas imagens na literatura, além de que foi possível constatar que a aderência das NPs-Ag na superfície é ditada pela afinidade do meio no qual as NPs-Ag se encontram e os grupamentos químicos da superfície da NCB,

pois como no trabalho de Pawcenis et al. (2019), no qual, sintetizou e incorporou NPs-Ag utilizando AgNO_3 como precursor e diferentes frações de nanocristais de celulose oxidadas como agente redutor do AgNO_3 na nanocelulose, eles também verificaram por meio de MEV a incorporação e adesão das NPs-Ag na superfície da membrana, e os pesquisadores utilizaram justamente das propriedades de polaridade dos grupos hidroxila da NCB para que a prata fosse incorporada de forma mais efetiva.

Outro trabalho que corrobora com a aderência das NPs-Ag na superfície por conta da polaridade do meio é a de Shaheen et al. (2021), que utilizou de um meio alcalino com NaOH na NCB como agente redutor para síntese das NPs-Ag, as NPs além de aderidas a superfície demonstram formato esférico e homogeneidade em toda extensão da NCB. Visto que até o momento temos a caracterização básica de todos os nanocompósitos produzidos nesse trabalho, passaremos para os testes de atividade antimicrobiana.

5.4 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A ação antimicrobiana foi testada frente a quatro cepas diferentes de bactérias (*E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*), e demonstraram resultados satisfatórios dependendo de onde for aplicado o nanocompósito.

Os testes microbiológicos foram realizados em placa de Petri com meio de cultivo MHA estéreis, no qual, cada uma das cepas das bactérias liofilizadas foram espalhadas com um *swab* estéril nas suas respectivas placas, e depois encubadas em estufa bacteriológica sob temperatura de 28° C para seu crescimento.

As amostras foram distribuídas nas placas de Petri com a respectiva características (úmida e seca), no qual as placas de teste foram divididas em três quadrantes, com as siglas de suas respectivas concentrações e meio de incorporação, conforme Tabela 2, e a placa C (controle) onde foram colocados os brancos (controles negativos) com as siglas também na Tabela 2 e os discos com o antibiótico (controle positivo), onde discos com cloranfenicol foram nomeados de “DA. Clo” e discos com gentamicina foram nomeados com “DA. Gen”. Os halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital e retirado medidas de quatro pontos do halo e feito a média de tamanho.

Tabela 2. Sigla nos quadrantes com suas respectivas concentrações de NPs-Ag.

Concentração de NPs-Ag		Sigla no Quadrante
<i>In situ</i>	1 mol · L ⁻¹	1 M
	1x10 ⁻¹ mol · L ⁻¹	1x10 ⁻¹ M
<i>Ex situ</i>	4,x10 ¹² mol · L ⁻¹ de NPs-Ag em 10 mL de Tolueno	Tol
Branco Seco	0 mol · L ⁻¹	B
Branco Úmida	0 mol · L ⁻¹	BU

Fonte: O autor, 2023.

5.4.1 Teste com a bactéria *E. coli*

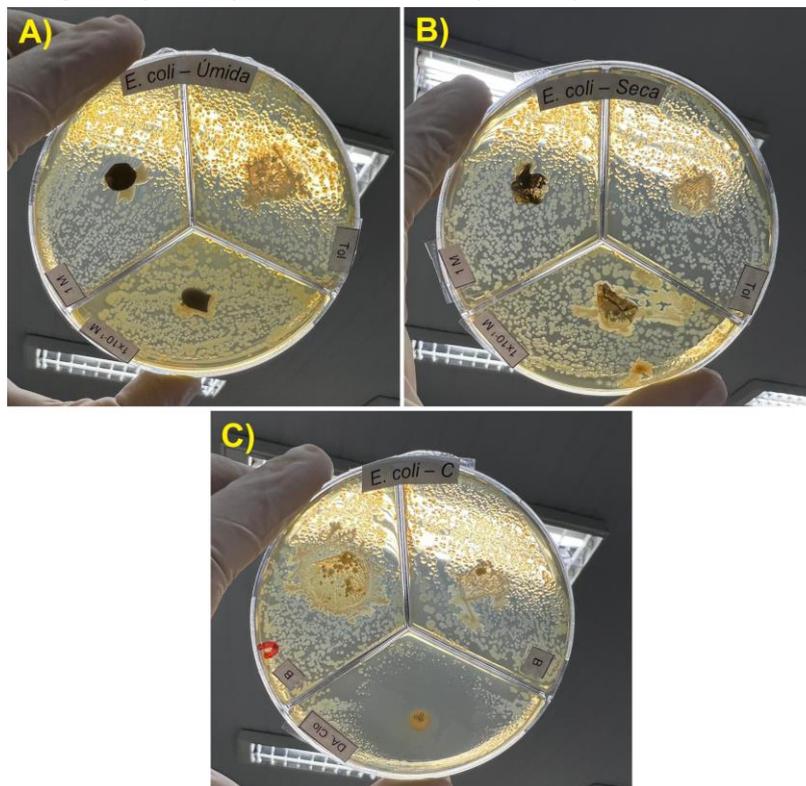
Na amostra NCBU-IA no quadrante 1 M (Figura 42-A) foi formado um halo de inibição, o que corrobora com os dados obtidos em MET e MEV de que as NPs-Ag podendo estar tanto incorporadas quanto aderidas a membrana, o halo de inibição teve raio aproximado de 3,46 mm, 1,73x maior do que a encontrado na literatura que realizou testes com a NCB também úmida e com NPs-Ag incorporadas (MANEERUNG et al., 2007).

Já nas amostras NCBU-IB e NCBS-IB nos quadrantes 1x10⁻¹ M (úmida e seca) nas Figuras 42-A e B, podemos notar que não houve uma ação antimicrobiana efetiva, talvez por não ter incorporado NPs-Ag suficiente nas mesmas ou a concentração não ser o suficiente para tal efeito, na amostra NCBS-IA no quadrante 1 M (Figura 42-B) também notou-se crescimento que pode ter ocorrido por conta das NPs-Ag não tem incorporado o suficiente dentre as fibrilas da NCB.

Na Figura 42-A e B, no quadrante Tol (úmida e seca), que continham a amostra NCBU-E e NCBS-E, podemos observar que as mesmas não demonstraram efeito antimicrobiano esperado, talvez por não estarem aderidas e/ou incorporadas em concentração suficiente para ter ação antimicrobiana ou por conta da camada de DT que recobre as NPs-Ag, não permitindo assim o contato da prata com o meio.

Conforme podemos verificar na Figura 42-C, a amostra branco nos quadrantes BU e B, notou-se como era de se esperar crescimento microbiano, visto que não há nada inibitório incorporado as mesmas, bem como, no quadrante DA. Clo, notou-se halos de inibição como esperado com raio aproximado de 10,62 mm.

Figura 42. Imagens do teste de ação antimicrobiana contra bactéria *E. coli* com luz retroiluminada nas placas. A) Placa de Petri com NCB úmidas. B) Placa de Petri com NCB seca. C) Placa de Petri com controle negativo (B e BU) e controle positivo (DA. Clo).



Fonte: O autor, 2023.

5.4.2 Teste com a bactéria *S. aureus*

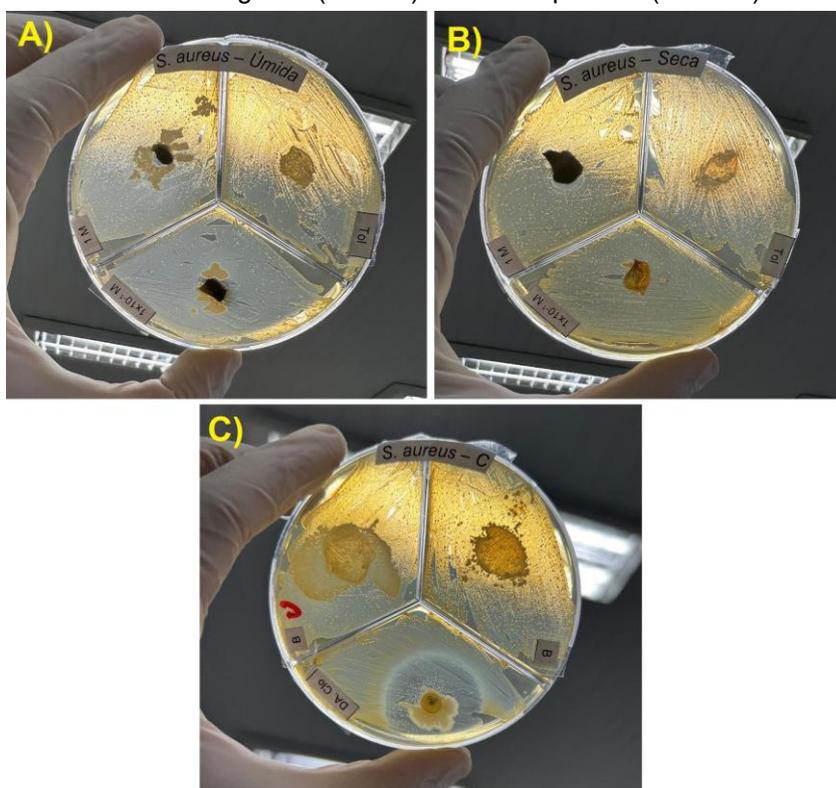
Na Figura 43-A todas as amostras com NPs-Ag *In situ* em membrana úmida demonstraram efeitos antimicrobiano mesmo que de forma singela, sendo que no quadrante 1 M com a amostra NCBU-IA houve halo de inibição aproximado de 1,10 mm e no quadrante 1×10^{-1} M com a amostra NCBU-IB houve um halo de inibição de 1,84 mm, essa ação pode ter ocorrido devido haver mais espaço dentre as fibrilas, permitindo então maior impregnação de NPs-Ag na matriz de NCB, o que corrobora com os dados da literatura, pois conforme visto no trabalho de Maneerung et al. (2007), que realizaram testes antimicrobianos com as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, os pesquisadores obtiveram resultados positivos utilizando da mesma rota de síntese do presente trabalho, apenas alterando o tempo de reação e concentração do AgNO_3 e do agente redutor (NaBH_4) sendo ela 100:1, resultando numa concentração de NPs-Ag incorporada nas membranas de NCB de $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, e obtendo como resultado uma halo de inibição de

aproximadamente 2 mm (*E. coli*), bem próximo do obtido, e 3,5 mm (*S. aureus*) aproximadamente 3,18x maior do que o obtido, contudo satisfatório. O quadrante Tol não demonstrou ação antimicrobiana, podendo ter como explicação o mesmo do discutido anteriormente na *E. coli*.

Não foram notados em nenhum dos quadrantes da Figura 43-B ação antimicrobiana em nenhuma das amostras, podendo ser resultado do aquecimento das mesmas, comprimirem as fibrilas, não possibilitando a entrada de NPs-Ag, ficando em quantidade insuficiente para demonstrar ação satisfatórios. Conforme pudemos observar nas análises de MET e MEV as concentrações nas membranas secas de fato são mais baixas comparadas as úmidas.

No quadrante DA. Clo (Figura 43-C) com o antibiótico cloranfenicol, notou-se halos de inibição como esperado com raio aproximado de 9,13 mm, e ainda na Figura 43-C, assim como nos testes de *E. coli* notou-se crescimento microbiano, nos quadrantes BU e B, visto que não contam com nenhum agente inibitório.

Figura 43. Imagens do teste de ação antimicrobiana contra bactéria *S. aureus* com luz retroiluminada nas placas. A) Placa de Petri com NCB úmidas. B) Placa de Petri com NCB seca. C) Placa de Petri com controle negativo (B e BU) e controle positivo (DA. Clo).



5.4.3 Teste com a bactéria *E. faecalis*

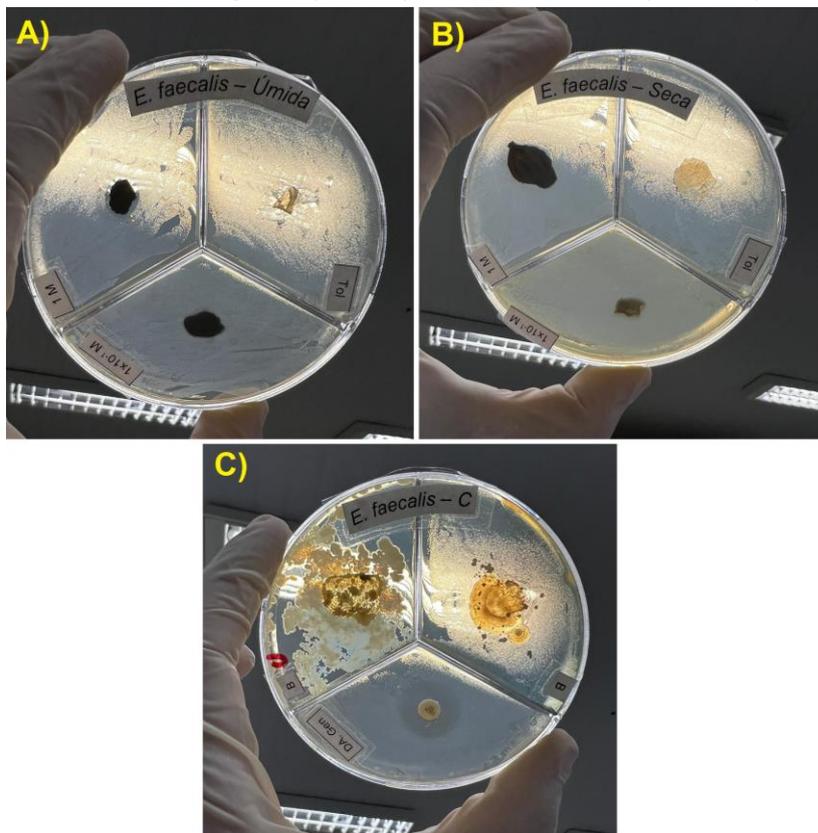
Na Figura 44-A todas as amostras úmidas demonstraram efeitos antimicrobiano, sendo que no quadrante 1 M com a amostra NCBU-IA houve halo de inibição aproximado de 0,92 mm, no quadrante 1×10^{-1} M com a amostra NCBU-IB houve um halo de inibição de 0,51 mm halo menor talvez por conta da concentração de NPs-Ag ser menor, e no quadrante Tol houve um halo de inibição de 1,89 mm, colaborando a análise de MEV que demonstra índices de NPs-Ag impregnado e/ou aderido nas membranas.

Já na Figura 44-B não foram notados em nenhum dos quadrantes ação antimicrobiana em nenhuma das amostras, podendo ser explicada como nas anteriores por conta das fibrilas estarem mais comprimida, não permitirem a entrada de NPs-Ag suficiente para demonstrar resultados satisfatórios.

Em estudos realizados por Neves et al. (2021) com NPs-Ag, cita que a bactéria *E. faecalis*, necessita de um tempo de exposição ao agente biocida superior a 14 dias, (o tempo de exposição do presente trabalho foi de 10 dias), e que mesmo assim com essa exposição, foi demonstrado que elas reduzem a carga, mas não eliminam a bactéria, demonstram maior resistência dessa bactéria às NPs-Ag.

No quadrante DA. Gen na Figura 44-C, com o antibiótico gentamicina, notou-se halos de inibição como esperado com raio aproximado de 5,11 mm, e notou-se crescimento microbiano, nos quadrantes BU e B (Figura 44-C), visto que não contam com nenhum agente inibitório.

Figura 44. Imagens do teste de ação antimicrobiana contra bactéria *E. faecalis* com luz retroiluminada nas placas. A) Placa de Petri com NCB úmidas. B) Placa de Petri com NCB seca. C) Placa de Petri com controle negativo (B e BU) e controle positivo (DA. Gen).



Fonte: O autor, 2023.

5.4.4 Teste com a bactéria *P. aeruginosa*

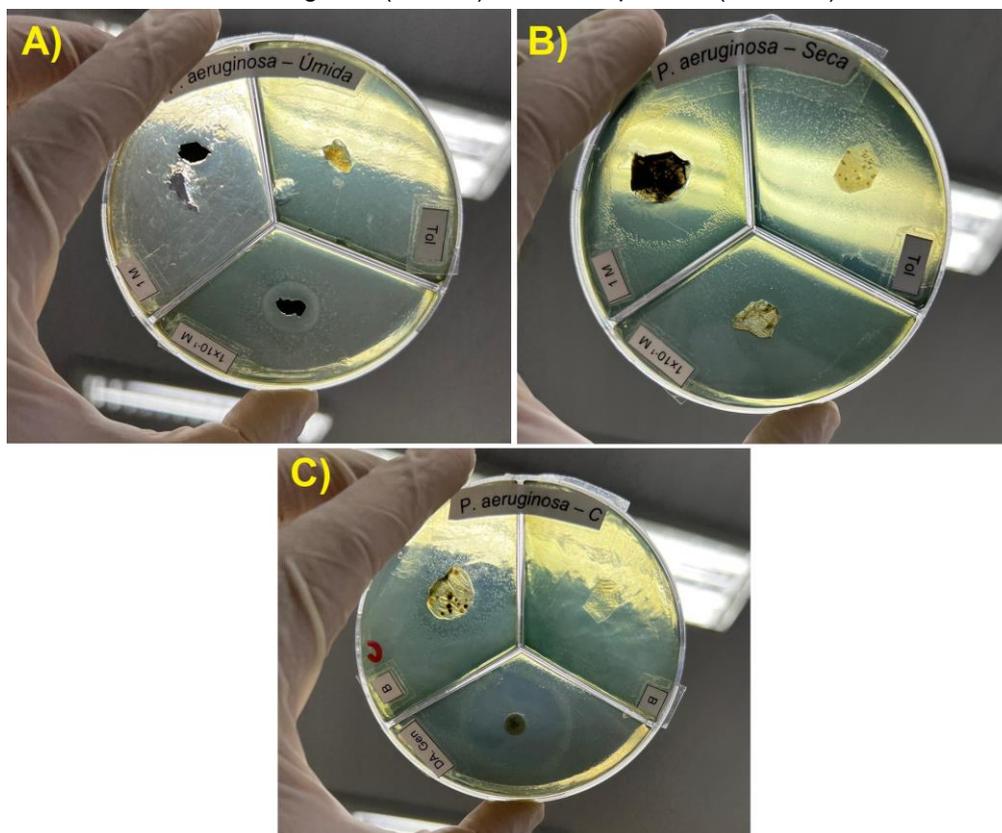
Podemos observar na Figura 45-A que todas as amostras demonstraram efeitos antimicrobiano, sendo que nos quadrantes 1 M com a amostra NCBU-IA houve halo de inibição aproximado de 0,51 mm, no quadrante 1×10^{-1} M com a amostra NCBU-IB houve um halo de inibição de 1,81 mm, e no quadrante Tol houve um halo de inibição de 1 mm.

Na Figura 45-B foram notados em todos os quadrantes com amostras com NPs-Ag *In situ*, ação antimicrobiana, sendo que no quadrante 1 M com a amostra NCBS-IA houve halo de inibição aproximado de 8,20 mm, no quadrante 1×10^{-1} M com a amostra NCBS-IB houve um halo de inibição de 2,65 mm e apenas no quadrante Tol com amostra NCBS-E notou-se crescimento microbiano, esse dados obtidos colaboram com os encontrados na literatura e com as análises de MET e MEV realizadas, pois no trabalho de Shaheen et al. (2021), que utilizou de

P. aeruginosa como microrganismo de teste os autores relataram halo de inibição das NPs-Ag utilizadas, no trabalho eles utilizaram uma rota alcalina para redução do precursor, porém e utilizam concentrações 10x, 100x e 1000x menores que a utilizada no presente trabalho

No quadrante DA. Gen na Figura 45-C, com o antibiótico gentamicina, notou-se halos de inibição como esperado com raio aproximado de 9,12 mm, e notou-se crescimento microbiano, nos quadrantes BU e B (Figura 45-C), visto que não contam com nenhum agente inibitório.

Figura 45. Imagens do teste de ação antimicrobiana contra bactéria *P. aeruginosa* com luz retroiluminada nas placas. A) Placa de Petri com NCB úmidas. B) Placa de Petri com NCB seca. C) Placa de Petri com controle negativo (B e BU) e controle positivo (DA. Gen).



Fonte: O autor, 2023.

Dentre as duas características (úmida e seca) testadas nas membranas as que mais apresentaram efeitos antimicrobianos independente da concentração de NPs-Ag, foram as úmidas, com 75% das amostras com ação biocida, enquanto as amostras secas tiveram 25% de eficácia, esse maior efeito biocida das membranas úmidas podem ser explicado por conta das mesmas estarem com suas fibrilas mais espaçadas entre si, permitindo assim maior permeação e/ou aderência das NPs-Ag nas NCB (independente da concentração), já tal espaçamento é menor quando as

membranas são secas previamente, pois as fibrilas coalesce entre si e assim acabam por dificultar a entrada e/ou crescimento das NPs-Ag.

As NCB com maior concentração de prata, mostram halos de inibição 1,5x maior quando comparados com as com menor concentração de prata. As membranas com NPs-Ag *Ex situ*, indiferente de úmidas ou secas apresentaram em 37,5% das amostras, ação antimicrobiana, tal porcentagem pode ter ocorrido por conta ou de uma baixa concentração de prata tanto incorporada quanto aderidas nas membranas, devidos os diversos fatores discutidos nas análises anteriores ou a ação não ter sido efetiva por conta do encapsulamento das NPs-Ag pelo DT, que não permite o contato da prata com as bactérias, sendo assim, não possibilitando a prata de inativar as proteínas que permitem a permeação na membrana que acaba por então causar morte celular (SHAHEEN et al., 2021).

Portanto, os resultados obtidos demonstraram que a utilização das membranas de NCB para obtenção de nanocompósitos contendo NPs-Ag, apesar do efeito antimicrobiano ter sido modesto em alguns casos, elas tem potencial, para reduzir as cargas microbianas, demonstrando maior potencial nas membranas úmidas e com NPs-Ag sintetizadas *In situ*, contudo, ainda há mais possibilidades a serem exploradas tanto de síntese quanto de análises para assim se obter resultados ainda melhores e assim sua atividade e aplicabilidade poderem ser ampliadas. Vale ainda mencionar que essas atividades já podem ser aproveitadas em embalagens alimentícias, o que deve prorrogar a vida útil de alimentos, entretanto testes de lixiviação são necessários para uma proposta de tal utilização.

6. CONCLUSÕES

As NCB produzidas, demonstraram-se visualmente integras e resistentes, seja ela úmida ou seca e com uma morfologia em escamas diferente da comumente citada na literatura. A NCB úmida apresentando aspecto gelatinoso e a seca apresentando aparência de papel manteiga, ambas conforme esperado, podendo assim ser futuramente utilizado para produção de embalagens dentre outros.

As amostras apresentaram resultados interessantes, e mesmo não demonstrando grande eficácia como agente antimicrobiano contra algumas das bactérias testadas, por parte de algumas amostras, conseguimos, com os ensaios realizados, demonstrar o potencial do sistema para utilização como agente antimicrobiano para aplicações onde não há cargas microbianas elevadas, como no caso para proteção de alimentos.

Como podemos notar nas caracterizações realizadas, não houve uma incorporação das NPs-Ag de forma significativa, muito menos uniforme nas NCB secas, independente do meio de incorporação, tal resultado pode ser explicado por conta da contração das fibrilas no momento da secagem da NCB, que é bem menor do que o espaço encontrado entre elas quando comparado a membrana úmida. Essa retração das fibrilas na secagem pode estar ocasionando a não incorporação suficiente das NPs-Ag e até mesmo a não redução das mesmas dentre a fibrila talvez pelo espaço ser extremamente pequeno.

Um dos pontos que também devem ser levado em consideração é a espessura das amostras, que mesmo que tenha se seguido um padrão de cultivo de 7 dias para a retirada da mesma do meio de cultivo, elas podem apresentar diferentes espessuras, e qualquer variação mesmo que pequena na temperatura e/ou pH acarreta na produtividade da bactéria, visto também que, elas são produzidas em camadas extremamente finas, o que também explica a morfologia em escamas encontradas nas imagem de MET, tais dados de morfologia e comportamento frente a incorporação de outros materiais se mostra fundamental para determinar futuras aplicações a esses nanocompósitos.

Sendo assim, ainda é necessário análises de caracterização da NCB e das NPs-Ag, por outras técnicas como calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e DRX a fim de

se obter ainda mais dados relevantes para trabalhos e aplicações futuras e assim contribuir para o que se refere ao cerne da pesquisa. Contudo, a síntese e caracterização de nanocompósitos de NCB incorporados com NPs-Ag foi alcançado com êxito e com resultados interessantes e satisfatório, levando em consideração os objetivos do trabalho.

7 TRABALHOS FUTUROS

Tendo em vista a versatilidade do nanocompósito exposto neste trabalho, diversas pesquisas futuras podem ser realizadas tanto em relação a aplicabilidade quanto estudos de caracterizações físicas e/ou químicas, tais como:

- Sintetizar as NPs-Ag conforme metodologia deste trabalho, incorporá-las em NCB e posteriormente liofilizá-las;
- Realizar a incorporação de outras NPs-met e/ou alterar o agente redutor da síntese deste trabalho;
- Realizar a síntese e incorporação de NPs-Ag ou outras NPs-met previamente sintetizadas;
- Estudar a interação da NCB e do nanocompósito exposto neste trabalho em diferentes solventes;
- Estudar efeitos de citotoxicidade do nanocompósito sintetizado;
- Aplicar o nanocompósito explorado neste trabalho em diferentes áreas.

8 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R. M. B. **Desenvolvimento de uma Blenda Biodegradável à Base de Celulose Bacteriana (CB) e Polihidroxibutirato (PHB) para Aplicação como Embalagem Ativa para Alimentos**. 2019. 131 p. Dissertação (Mestre) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2019. Disponível em: <http://tede2.unicap.br:8080/handle/tede/1112>. Acesso em: 31 jul. 2020.

ALVARENGA, G. H. F. et al. Avanços e benefícios da nanotecnologia no desenvolvimento das vacinas contra sars-cov-2: uma revisão integrativa. **Revista científica multidisciplinar**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 1 - 8, 30 jan. 2022. Disponível em: <https://www.recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/1111/883>. Acesso em: 9 fev. 2022.

BAIG, N.; KAMMAKAKAM, I.; FALATH, W. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. **Materials Advances**, Arábia Saudita, p. 1820-1871, 23 fev. 2021. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2021/ma/d0ma00807a>. Acesso em: 5 jan. 2023.

BALLOTTIN, D. P. M. **Caracterização de Nanopartículas de Prata e sua Aplicação na Produção de Tecidos Antimicrobianos**. 2014. 235 p. Tese (Doutor) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/248431/1/Balottin_DanielaPottMarinho_D.pdf. Acesso em: 5 ago. 2020.

BOTELHO, M. P. J. et al. Verificação da capacidade antibacteriana e antifúngica de nanopartículas de prata incorporadas a gessos odontológicos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 4, p. 19371-19380, 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/8763>. Acesso em: 29 jun. 2020.

BRUST, M.; FINK, J.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D. J.; KIELY, C. J., Synthesis and reactions of functionalized gold nanoparticles, **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, p. 1665, 1995.

BRUST, M.; WALKER, M.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D. J.; WHYMAN, R., Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system, **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, p. 801, 1994.

CIEŚLA, J. Effect of different conditions of synthesis on properties of silver nanoparticles stabilized by nanocellulose from carrot pomace. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 245, p. 1-9, 2 jun. 2020. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0144861720306871?token=CF510B083C8C705C37E8AAE8135EC4EC0B2EF4127F2A6B0AB96AE0F375E4E7E325F10356C0B392048DCC8CC45EEA9D00&originRegion=us-east-1&originCreation=20221018181413>. Acesso em: 14 out. 2022.

CLARO, F. C.; MAGALHÃES, W. L. E. Síntese de nanopartículas de prata em filmes de Nanocelulose. **IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**, São Carlos, p. 149-152, 22 nov. 2017. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/169203/1/2017-AAC-Washington-WNAA-Sintese.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2021.

COSTA, B. S. **Superbactérias e o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos**. 2019. 57 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel) - Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2019. Disponível em: <http://dspace.mackenzie.br/handle/10899/20064>. Acesso em: 29 jun. 2020.

CURVELLO, R.; RAGHUWANSHI, V. S.; GARNIER, G. Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, Australia, p. 47-61, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.03.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868619300028>. Acesso em: 29 jun. 2020.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **The Royal Society of Chemistry**, Atlanta, 16 dez. 2005. *Chemical Society Reviews* This journal, p. 209-217. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2006/cs/b514191e/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 2 ago. 2020.

FERNANDES, V. *Pra você que ainda é romântico*. 1ª. ed. São Paulo: Planeta do Brasil, 2021.

FISCHER, M. R. et al. Biossíntese e Caracterização de Nanocelulose Bacteriana para Engenharia de Tecidos. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, p. 1-17, 3 out. 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-70762017000500428&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 31 jul. 2020.

GARCIA, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**, Madrid, v. 44, p. 1-20, 24 jun. 2011. Disponível em: https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/44/28/283001/meta?casa_token=7dt89AKDAPsAAAAA:j4G9E-7mIPUQBy817rir5pUDgo4_5oVoYKglv1FKfDh3ijP-QC-Nw4ResZwQswc3G0tAhwU6nBNqLEQ. Acesso em: 16 jan. 2023.

GIBRIL, M. E. et al. Beneficiation of pulp and paper mill sludge: production and characterisation of functionalised crystalline nanocellulose. **Clean Technologies and Environmental Policy**, [S. l.], p. 1835-1845, 9 jul. 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10098-018-1578-3.pdf>. Acesso em: 16 out. 2022.

GUIMARÃES, M. G. et al. Estudo Prospectivo e Tecnológico da Celulose com Ênfase em Nanocelulose e Catálise. **Cadernos de Prospecção**, Brasília, v. 12, n. 3, p. 576-589, 2018. DOI <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v12n3p576>. Disponível em: <https://rigs.ufba.br/index.php/nit/article/view/26593>. Acesso em: 28 jun. 2020.

GUPTE, Y. et al. Characterization of nanocellulose production by strains of *Komagataeibacter* sp. isolated from organic waste and Kombucha. **Carbohydrate Polymers**, v. 266, p. 1-9, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861721005634>. Acesso em: 28 jun. 2023.

em: 23 set. 2022.

HAMMOND, J. et al. Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries. **Biosensors**, v. 4, n. 4, p.172-188, 20 jun. 2014.

JORGE, L. et al. Bacterial nanocellulose biomembrane as a support for human insulin aiming at transdermal permeation. **Química Nova**, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422020000500572&script=sci_arttext>. Acesso em: 19 Fev. 2021.

KOMARNENI, S. Nanocomposites. **Journal of Materials Chemistry**, Pennsylvania, p. 1219-1230, 1 jan. 1992.

LOUREIRO, B. S. M. **Materiais híbridos funcionais baseados em cristais líquidos e nanomateriais 2D**. 2022. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade do Porto, Porto, 2022. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/146203/2/595154.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.

MANEERUNG, T. et al. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, Tailândia, v. 72, p. 1-10, 3 abr. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861707003645>. Acesso em: 29 set. 2022.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os Nanomateriais e a Descoberta de Novos Mundos na Bancada do Químico. **Química Nova**, Aveiro, v. 35, n. 7, p. 1434-1446, 15 jun. 2012. Acesso em: 3 ago. 2020.

MATSUDA, L. M. M. **Comparação do método químico e método a plasma no preparo de nanocompósitos de prata e nanocelulose**. 2020. 70 p. Dissertação (Mestre) - Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2020. Disponível em: https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/13498/Disserta%3%a7%3%a3o_apresentada_corre%3%a7%3%a3o_final.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 20 fev. 2021.

MIKKELSEN, D.; FLANAGAN, B.; DYKES, G.; GIDLEY, M. J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 576–583, ago. 2009.

MODY, V. V. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, [S. l.], v. 2, p. 282-290, 28 ago. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2996072/>. Acesso em: 23 jan. 2023.

NEVES, J. O. et al. Análise antimicrobiana do uso da nanopartícula de prata com hidróxido de cálcio como medicação intracanal. **Unifunec ciências da saúde e biológicas**, São Paulo, v. 4, p. 1-9, 20 abr. 2021. Disponível em: <https://seer.unifunec.edu.br/index.php/rfce/article/view/5188/4094>. Acesso em: 16 fev. 2023.

NOGUEIRA, A. F. et al. Preparação de Nanopartículas de Prata e Ouro: Um

Método Simples para a Introdução da Nanociência em Laboratório de Ensino. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 27 jul. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v35n9/v35n9a30.pdf>. Acesso em: 4 ago. 2020.

NORRAHIM, M. N. F. et al. Emerging development of nanocellulose as an antimicrobial material: an overview: *Materials Advances*. **Royal Society of Chemistry**, [S. l.], p. 3538-3551, 1 fev. 2021. DOI 10.1039/d1ma00116g. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2021/ma/d1ma00116g>. Acesso em: 30 nov. 2021.

OLIVEIRA, M. M. **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades**. 2005. 174 p. Tese (Doutor) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/3098>. Acesso em: 28 jun. 2020.

OLIVEIRA, M. M.; INAGAKI, C. S.; ZARBIN, A. J. G. . Direct and one-step synthesis of polythiophene/gold nanoparticles thin films through liquid/liquid interfacial polymerization. **Journal of colloid and interface science**, v. 516, p. 498-510, 2018.

OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. Carbon Nanotubes Decorated with both Gold Nanoparticles and Polythiophene. **Journal of Physical Chemistry**. C, v. 112, p. 18783-18786, 2008.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; GUIMARÃES, T. R. Propriedades mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 16, n. 2, p. 136-140, 2006. DOI <https://doi.org/10.1590/S0104-14282006000200014>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-14282006000200014&script=sci_arttext. Acesso em: 28 jun. 2020.

PAWCENIS, D. et al. Preparation of silver nanoparticles using different fractions of TEMPO-oxidized nanocellulose. **European Polymer Journal**, [S. l.], p. 242-255, 11 abr. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305718319712>. Acesso em: 5 out. 2022.

PICHETH, G. F. et al. Bacterial Cellulose in Biomedical Applications: A Review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Curitiba, v. 104, p. 97-106, 1 nov. 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813017313375>. Acesso em: 3 ago. 2020.

PIELAK, F. **Desenvolvimento de nanocompósito de nanocelulose bacteriana e TiO₂ e sua aplicação na degradação do corante preto reativo 5 por fotocatalise heterogênea**. 2019. 97 p. Dissertação (Mestre) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4208/1/CT_PPGCTA_M_Pielak%20C%20Fernanda_2019.pdf. Acesso em: 28 jun. 2020.

REGIS, L. H. V. et al. O uso de nanotecnologia em fármacos no Brasil. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 15, p. 1-12, 17 nov. 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/22294/20003>. Acesso em: 10

jan. 2022.

RUPARELIA, J. P. et al. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, Índia, p. 707-716, 2008. DOI <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S174270610700195X>. Acesso em: 29 jun. 2020.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da desinfecção hospitalar. **Texto Contexto - Enfermagem**, Florianópolis, v. 13, n. spe, p. 64-70, 2004.

SCHNEIDER, G. et al. Use of Textiles Impregnated with Antimicrobials in Health Services: Integrative Review. **SciELO - Health Sciences**, São Paulo, p. 1-25, 10 ago. 2020. Disponível em: <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/260>. Acesso em: 12 ago. 2020.

SHAHEEN, T. I. et al. Benign Production of AgNPs/Bacterial Nanocellulose for Wound Healing Dress: Antioxidant, Cytotoxicity and In Vitro Studies. **Journal of Cluster Science**, [S. l.], p. 1-17, 22 out. 2021. DOI <https://doi.org/10.1007/s10876-021-02190-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10876-021-02190-6.pdf>. Acesso em: 21 set. 2022.

SILVA, A. S. et al. Nanotecnologia aplicada no enfrentamento da COVID-19. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 12, p. 113420 - 113438, 8 dez. 2021. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/40873/pdf>. Acesso em: 12 jan. 2022.

SOEIRO, V. S. et al. Bacterial nanocellulose and fibroin: natural products to produce a structure membranes. **Revista Matéria**, Sorocaba, v. 26, n. 4, p. 1 - 11, 18 maio 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rmat/a/dVwBRjMKKdygLDtTmqw79tc/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 7 dez. 2021.

TAVAKOL, S. et al. The role of nanotechnology in current COVID-19 outbreak. **Heliyon**, Tehran, p. 1 - 11, 13 abr. 2021. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S2405-8440%2821%2900944-0>. Acesso em: 13 jan. 2022.

THOSTENSON, E. T.; LI, C.; CHOU, T. Nanocomposites in context. **Composites Science and Technology**, [S. l.], p. 491-516, 10 dez. 2004. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0266353804003008?casa_token=Qs7GqsxjR7IAAAAAA:J9T563kNU9KvquXsAHQwZK0hdPAHplQZSZSeJHYDfogFW2d-ua8IPO_sS0nj1ZRbu4c3h6QWwHq. Acesso em: 4 jan. 2023.

ZANONI, E. T. **Nanopartículas de ouro**: As peculiaridades do ouro. [S. l.], 2015. Disponível em: <https://nanomateriais.wordpress.com/tag/nanopartículas-de-ouro/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

ZARBIN, A. J. G. Química de (Nano)materiais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 20 jul. 2007. Disponível em:

<https://www.scielo.br/pdf/qn/v30n6/a16v30n6.pdf>. Acesso em: 4 ago. 2020.

ZHAO, X. et al., Polymer-supported nanocomposites for environmental application: A review. **Chemical Engineering Journal**, 2011. 170(2–3): p. 381-394.