

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

THAÍS APARECIDA DOS SANTOS

**SÍNTESE *IN SITU* DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA OBTENÇÃO DE
ACABAMENTO ANTIBACTERIANO EM TECIDO NÃO TECIDO**

MARINGÁ
2022

THAÍS APARECIDA DOS SANTOS

**SÍNTESE *IN SITU* DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA OBTENÇÃO DE
ACABAMENTO ANTIBACTERIANO EM TECIDO NÃO TECIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Wanderley Dantas dos Santos
Coorientadora: Dayane Samara de Carvalho Coltre

MARINGÁ
2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S237s

Santos , Thaís Aparecida dos

Síntese *in situ* de nanopartículas de prata para obtenção de acabamento antibacteriano em tecido não tecido / Thaís Aparecida dos Santos . -- Maringá, PR, 2022.
40 f.figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos .

Coorientadora: Profa. Dra. Dayane Samara de Carvalho Coltre.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.

1. Microbiologia têxtil. 2. Nanopartículas de prata. 3. Quitosana. 4. Atividade antibacteriana. I. Santos , Wanderley Dantas dos , orient. II. Coltre, Dayane Samara de Carvalho , coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 579

Marinalva Aparecida Spolon Almeida - 9/1094

THAÍS APARECIDA DOS SANTOS

**SÍNTESE *IN SITU* DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA OBTENÇÃO DE
ACABAMENTO ANTIBACTERIANO EM TECIDO NÃO TECIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular) da Universidade estadual de Maringá para obtenção do grau de mestre em Ciências biológicas

BANCA EXAMINADORA

Wanderley Dantas dos Santos
Universidade Estadual de Maringá

Dayane Samara de Carvalho Coltre
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Hélito Volpato
Universidade Estadual do Paraná

Francielle Pelegrin Garcia
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Paranaense, nascida na cidade de Nova Olímpia, no dia 03 de fevereiro de 1996, filha do carioca Juracy Rodrigues dos Santos e da paranaense Dalvina Maria Aparecida da Silva. Thaís morou em outras duas cidades interioranas, Cidade Gaúcha e Rondon, até realmente ir residir em Paranavaí no ano de 2017. Lá, obteve Licenciatura plena em Ciências biológicas, pela Universidade Estadual do Paraná – UNESPAR, com colação de grau em março de 2018. No ano de 2019, iniciou na docência no ensino profissionalizante no Centro Nacional Integrado de Cursos - CENAIC, atuando como professora no Curso de Atendente de Farmácia, área que possui experiência. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – PBC, com área de concentração em Biologia Celular e Molecular, na Universidade Estadual de Maringá - UEM, Paraná, em 2020. Para esta instituição agora apresenta esta dissertação, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas. Atualmente, exerce o cargo de Técnica do Controle de qualidade, na multinacional General Mills, empresa norte-americana considerada a quinta maior empresa de alimentos do mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, sou grata a mim mesma pela minha determinação, que me fez continuar em momentos que desistir parecia ser a melhor decisão. O processo de aprendizado nem sempre é fácil e agradável, julgo a dizer que depois de um tempo, querer continuar aprendendo requer coragem e paciência. Agradeço a Deus que foi meu porto seguro e me sustentou em toda a minha caminhada, me manteve forte, sem ele eu nada seria.

À minha namorada Ana Cláudia, que esteve ao meu lado, me incentivou e vibrou por cada conquista. Que nesses últimos meses tem cuidado de tudo sozinha, enquanto tento conciliar a finalização da dissertação com o emprego novo. É um momento desafiador, mas ela tem sido meu alicerce.

Aos parceiros que o Mestrado me deu, Mayara, Bruna, Ezequias, Mariane Castardo, Luiz e Mariane, eles foram meu maior presente nos últimos 2 anos. Obrigada por todo incentivo e pela ajuda, mesmo estando em áreas diferentes eles estavam sempre dispostos a me socorrer nas dúvidas que surgiam pelo caminho.

À Mariane Carneiro que me acolheu em sua casa inúmeras vezes, durante minhas idas para Maringá para realizar meus experimentos. Obrigada pelo apoio, pelos caldos de mandioca, pelos cafés, por todos os momentos de consolo e os de alegria.

À minha amiga Aline Souza, que sempre acreditou no meu potencial e me fez focar nas minhas qualidades, quanto o negativismo tomava conta do meu ser.

Ao meu amigo Luiz Grizza, que agiu como um coorientador em todo meu projeto, me auxiliando nos meus planejamentos e análise de dados.

Ao meu orientador, que aceitou orientar alguém que ele sequer conhecia e por sempre saber reconhecer todo o meu esforço em realizar essa pesquisa que foi desafiadora.

À minha coorientadora, por ser sempre prestativa e didática em suas explicações. Nossas conversas sempre foram agradáveis e de muito aprendizado.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Bioquímica de plantas, que me orientaram em dias de experimentos.

Aos professores Celso Vataru Nakamura e Francielle Pelegrin Garcia, pela parceria nas análises microbiológicas e por todos os ensinamentos, são profissionais admiráveis.

Ao departamento de Bioquímica da UEM que me ofereceu toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao departamento de Física da UEM pelas análises de espectroscopia UV-Vis com esfera integradora, em especial o professor Antônio Medina e Fábio Hegeto.

Ao Professor Dr. Helton José Alves da Universidade Federal do Paraná por fornecer a quitosana utilizada nos ensaios.

Finalmente, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa, sem a qual este trabalho não seria possível. Assim como à Universidade Estadual de Maringá- UEM e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – PBC

A todos o meu muito obrigada!

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado é composta por um capítulo em formato de artigo científico, uma parte introdutória, contendo uma biografia curta do autor, agradecimentos e um resumo geral. O artigo é um trabalho original, com dados coletados durante o mestrado, e que deve ser submetido à revista *Environmental Technology*, cujo fator de impacto é 3,247 (2020) e por isso foi escrito seguindo as normas da revista. O capítulo apesar do formato em linhas gerais ser escrito segundo as normas da revista a ser submetido, foi adaptado para facilitar a avaliação da dissertação.

RESUMO GERAL

Introdução. A busca por acabamentos antibacterianos não-tóxicos, eficientes, sustentáveis e de baixo custo tem aumentado nos últimos anos e a pandemia causada pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) estimulou o desenvolvimento de têxteis inteligentes. Diferentes compostos têm sido utilizados para funcionalizar têxteis com atividade antibacteriana e antiviral e a nanotecnologia tem sido uma aliada nesse processo. A prata apresenta atividade antibacteriana comprovada e a quitosana, dentre tantas propriedades, é conhecida como estabilizante de nanopartículas. A partir disso, desenvolvemos um acabamento antibacteriano em tecido não tecido (TNT) por meio da síntese *in situ* de nanopartículas de prata por redução UV.

Metodologia. O TNT é um substrato têxtil comumente utilizado em máscaras faciais. A aplicação da solução de AgNO₃ e quitosana foi realizada por imersão. A síntese das nanopartículas *in situ* foi realizada por exposição à radiação UV. As nanopartículas foram estabilizadas com quitosana de médio peso molecular.

Resultados. O acabamento foi obtido e foi evidenciado a formação de nanopartículas de prata na superfície por meio da presença de bandas de ressonância plasmônica entre os comprimentos de onda de 400–440 nm, pico de plasmon característico para nanopartículas de prata. Apresentou atividade antibacteriana frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, reduzindo o crescimento de ambas em mais de 99%. No teste de citotoxicidade foi identificado que o acabamento não apresentava toxicidade as células humanas, sendo a viabilidade celular maior que 98% nas amostras testadas.

Conclusão. O resultado mais eficiente em relação a menor tempo de experimento, gasto menor com reagentes e atividade antibacteriana satisfatória, foi obtido com a amostra que usou 2 gL⁻¹ nitrato de prata, 1 gL⁻¹ quitosana e foi exposta por 2 h à radiação UV. Ela apresentou resultados semelhantes às demais amostras, porém, com a menor concentração de reagentes e menor tempo de exposição. Estudos adicionais são necessários para caracterizar as nanopartículas, avaliar a capacidade de filtração da máscara contendo o acabamento e a qualidade da fixação do acabamento nanoestruturado no TNT, bem como sua eficiência no controle de vírus e outros microrganismos. No entanto, nossos resultados sugerem fortemente que a tecnologia de formação de acabamento

nanoestruturado com prata e quitosana no TNT tem potencial para aplicação hospitalar e sanitária.

ABSTRACT

Introduction. The search for non-toxic, efficient, sustainable, and low-cost antibacterial textile finishes has increased in recent years and the Coronavirus pandemic has urged the development of these smart textiles. Different compounds have been used to functionalize textiles with antibacterial and antiviral activity, and nanotechnology has been an ally in this process. Silver has known antibacterial activity and chitosan is proven nanoparticle stabilizer. From this, we developed an antibacterial non-woven fabric (TNT) finish through the in-situ synthesis of silver nanoparticles by UV reduction of AgNO₃.

Methodology. TNT is a textile substrate commonly used in face masks. The application of the AgNO₃ and chitosan solution was performed by immersion. The synthesis of the nanoparticles *in situ* was performed by exposure to UV radiation. The nanoparticles were stabilized with medium molecular weight chitosan.

Results. The finish showed antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria, reducing the growth of both by more than 99%. In the cytotoxicity test, it was identified that the finish was not toxic to human cells, with cell viability greater than 98% in the samples tested. The formation of silver nanoparticles on the surface was evidenced by the presence of plasmonic resonance bands between the wavelengths of 400–440 nm, a plasmon peak characteristic for silver nanoparticles.

Conclusion. The most efficient result was obtained with the sample that used 2 gL⁻¹ silver nitrate, 1 gL⁻¹ chitosan and was exposed to UV radiation for 2 h. It presented similar results to the other samples, but with the lowest concentration of reagents and shorter exposure time. Additional studies are needed to characterize the nanoparticles, evaluate the filtration capacity and the quality of fixation of the nanostructured finish on TNT, as well as its efficiency in controlling viruses and other microorganisms. However, our results strongly suggest that the technology of nanostructured finish forming with silver and chitosan on TNT has potential for hospital and sanitary application.

CAPÍTULO 1

Síntese *in situ* de nanopartículas de prata para obtenção de acabamento antibacteriano em tecido não tecido

Thaís Aparecida dos Santos^a, Francielle Pelegrin Garcia^c, Celso Vataru Nakamura^c, Dayane Samara de Carvalho Coltre^{b*} e Wanderley Dantas dos Santos^a.

^aLaboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

^bCoordenação do Curso de Engenharia Têxtil, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, R. Marcílio Dias, 635, 86812-460, Apucarana, PR, Brasil.

^cLaboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos.

*Autor para correspondência: dayanecarvalho@utfpr.edu.br

Resumo

A busca por acabamentos antibacterianos não-tóxicos, eficientes, sustentáveis e de baixo custo tem aumentado nos últimos anos e a pandemia do Coronavírus contribuiu para o crescente desenvolvimento de têxteis inteligentes. Nesse trabalho foi desenvolvido um acabamento antibacteriano em um tecido não tecido (TNT), por meio da deposição de nanopartículas de prata, sintetizadas por redução *in situ* por radiação ultravioleta (UV) e estabilizadas com quitosana de médio peso molecular. O TNT é um substrato têxtil comumente utilizado em máscaras faciais e imersão foi usada para inclusão da solução de síntese no material. A metodologia de aplicação foi eficaz para obter o acabamento antibacteriano frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*, visto que o percentual de redução do crescimento bacteriano foi superior a 99%, para ambas. No teste de citotoxicidade foi identificado que o acabamento não apresentou toxicidade a células humanas, a viabilidade foi maior que 98% nas amostras testadas. A formação de nanopartículas de prata na superfície foi evidenciada por meio da presença de bandas de ressonância

plasmônica entre os comprimentos de onda de 400–440 nm, pico de plásmon característico para nanopartículas de prata. Conclui-se que a amostra mais promissora diferentes é a 1 (2 gL⁻¹ nitrato de prata, 1 gL⁻¹ quitosana, 2 h UV), pois apresentou resultados semelhantes as amostras com concentrações maiores, gerando um custo com reagentes menor. Estudos adicionais são necessários para caracterizar as nanopartículas, avaliar a capacidade de filtração e a qualidade da fixação do acabamento nanoestruturado no TNT, bem como sua eficiência no controle de vírus e outros microrganismos.

Palavras – chaves: Redução UV, têxtil, quitosana, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, citotoxicidade

1. INTRODUÇÃO

Os tecidos obtidos de fibras naturais, como o algodão, são mais suscetíveis crescimento bacteriano, devido à sua estrutura porosa e hidrofílica que retém água e oxigênio, atuando como fonte alimentar para microrganismos. Contudo, as fibras sintéticas, apesar da sua maior hidrofobicidade, não são totalmente imunes a contaminação por bactérias, pois a porosidade encontrada nos tecidos permite que sujeira e umidade se acumulem também entre os fios do tecido, favorecendo um ambiente úmido e quente, propício para o desenvolvimento de microrganismos (HEBEISH et al., 2011). Dessa forma, os têxteis antimicrobianos possuem como finalidade a capacidade de prevenir ou inibir o crescimento de microrganismos, inibir a formação de biofilmes, impedir a disseminação microbiana e, assim, remover as fontes de infecção (HU et al., 2019). Portanto, o desenvolvimento de têxteis com essa atividade é de extrema importância para toda a sociedade, principalmente no ambiente hospitalar, onde a frequência de infecções por microrganismos é mais significativa (BOCKMÜHL et al., 2019).

O desenvolvimento de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), jalecos impregnados de antimicrobianos e a utilização de têxteis funcionalizados por pacientes internados e por profissionais da área é uma alternativa para auxiliar na diminuição de infecções hospitalares, principalmente, infecções respiratórias altamente contagiosas como a Covid-19 (WATANABE e FRONTEIRA, 2021).

Para a obtenção têxteis com capacidade antibacteriana são utilizados desde compostos sintéticos, como Triclosan, compostos de amônio quaternário, polibiguanidas, N-halaminas a agentes de origem natural como a quitosana, além de óxidos de metais, como a prata, o ouro e o zinco, principalmente em nanoescala (WINDLER; HEIGHT e NOWACK, 2013; SIMONIC e TOMSIC, 2010). Pesquisadores da área têxtil buscam a Nanotecnologia, que é uma área em expansão, como uma aliada para desenvolvimento de produtos com alto valor agregado. Segundo Sharma et al. (2019), existem atualmente mais de 1800 produtos de consumo contendo nanomateriais, dentre os amplamente estudados, as NPs (nanopartículas) metálicas destacam-se, principalmente as de prata, ouro, paládio e platina com aplicação em vários setores desde a construção civil, eletroquímica, medicina, cosmética, têxtil, fármacos e até alimentos (NISKA et al., 2018).

As nanopartículas de prata têm sido cada vez mais utilizadas em aplicações nas indústrias têxteis (ADEYEMI, 2020; WATANABE e FRONTEIRA, 2021), porém, os métodos químicos de síntese de nanopartículas de prata podem ser tóxicos, poluentes e apresentar alto custo. Há, portanto, um grande interesse em novas rotas de síntese ecologicamente viáveis que forneçam uma boa dispersão e estabilidade durante a síntese, impedindo a agregação das nanopartículas, o que podem influenciar na sua atividade antibacteriana. (BACKX et al., 2019). Dentre os reagentes que são empregados como estabilizantes de nanopartículas, a quitosana tem ganhado destaque em inúmeros trabalhos (DEL AQUILA, 2017; DE LIMA et al., 2018). A quitosana é uma poliglucosamina linear formada pela condensação da glucosamina na posição $\beta(1\rightarrow4)$, é atóxica, biodegradável, biofuncional e biocompatível (DUTTA et al., 2009). Ela é produzida pela desacetilação da quitina (polímero de N-acetilglucosamina) que forma o exoesqueleto dos artrópodes. A presença de grupos amina livres auxilia nas atividades biológicas e uma delas é a atividade antimicrobiana (ORTIZ et al., 2019).

A atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados foi descoberta por Allan e Hadwiger (1979) que observaram o efeito fungicida dos biopolímeros em diferentes classes de fungos. Neste contexto, a atividade antimicrobiana da quitina, quitosana e seus derivados contra diferentes grupos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos vêm recebendo considerável atenção. No que se refere à propriedade antibacteriana, foi verificada a atividade contra diversos tipos de bactérias, sendo que alguns estudos apontam maior eficiência para bactérias gram-positivas do que para bactérias gram-negativas, enquanto outros indicam o contrário (YOUNES et al., 2014).

Empregar um método adequado para a deposição das nanopartículas é uma etapa vital, podendo a aplicação em substrato têxtil ser realizada pela técnica *in situ* ou *ex situ*. A mais utilizada é a *ex situ*, porém, ela possui algumas limitações como necessidade de agentes estabilizadores, para evitar a aglomeração das nanopartículas no momento da sua preparação, necessidade de purificação antes de ser utilizada e mesmo assim o acabamento e a distribuição pode não ser uniforme (IJAZ et al. 2017). Segundo REHAN et al. 2017, a síntese *in situ*, é mais eficiente, mesmo necessitando da presença de agentes estabilizantes, pois reduz o consumo de energia e reagentes, além de consumir um tempo menor para a síntese.

Dentre os métodos de síntese de nanopartículas, o método de redução química é o mais difundido na literatura, porém, alguns agentes redutores são tóxicos e com um custo mais elevado. Assim, o método de redução por luz UV é considerado uma técnica “limpa” por ser ecologicamente viável, pois há uma diminuição na produção de efluentes e utilização de produtos químicos. O custo também é menor quando comparado com outros métodos, como a redução química (ISAEVA, 2013). Adicionalmente, o método de redução UV, características das nanopartículas como tamanho e formato, são mais controláveis (MARIN, 2008).

Tecidos com propriedades antimicrobianas podem ajudar a proteger as pessoas em crises sanitárias como a da Covid-19, mas, sobretudo, podem ajudar a prevenir infecções hospitalares, protegendo médicos, fisioterapeutas, enfermeiros e pacientes. A atual pandemia mostrou a importância da utilização de EPIs adequados para evitar contrair infecções, tendo como destaque o uso de máscaras cirúrgicas, respiradores tipo PFF2 e máscaras de tecido, como o algodão. Já existem diversas formas de produzir tecidos funcionalizados, em geral esses métodos apresentam custo elevado e impacto ambiental que impedem seu uso. Novas pesquisas podem permitir a disseminação de têxteis com diversas funcionalidades, como exemplo, a diminuição da proliferação de microrganismos patogênicos. Neste sentido, esse trabalho teve como finalidade a obtenção de um acabamento antibacteriano pela deposição de nanopartículas de prata, estabilizadas por quitosana e sintetizadas por redução *in situ* com radiação ultravioleta (UV), utilizando como substrato têxtil TNT comumente utilizado em máscaras cirúrgicas, composto de polipropileno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Análise microbiológica para Nitrato de prata e Quitosana

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) foi utilizado o método de disco difusão para o nitrato de prata e quitosana, utilizando as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O preparo para cada experimento se inicia 24 horas antes, com o cultivo dos microrganismos em caldo Mueller-Hinton (CMH), a 37 °C, durante 24 h. Para os testes, a densidade celular foi padronizada em tubos de solução salina 0,9% estéril, para que a turvação seja idêntica ao tubo da escala McFarland, que corresponde a $0,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada a Produtos Naturais e Sintéticos, da Universidade Estadual de Maringá.

O método de microdiluição (CLSI standard M07-A10) em caldo foi realizado para determinar a concentração CIM e CBM da AgNO₃ (Synth[®]) e da quitosana gentilmente cedida pelo Professor Helton Alves da Universidade federal do Paraná - UFPR, campus Palotina. As três amostras testadas de quitosana, apresentavam grau de desacetilação semelhante, porém, variavam em relação a massa molar viscosimétrica.

2.2. Síntese das nanopartículas

Devido à baixa solubilidade da quitosana em água, a solução de quitosana, foi preparada em uma solução de 1% v/v de ácido acético sob vigorosa agitação, durante 15 h. Posteriormente, uma solução de AgNO₃ preparada, foi combinada com a solução de quitosana, sob agitação de 5 minutos. A solução final ([AgNO₃] 2-6 g L⁻¹; [quitosana] 1-3 g L⁻¹), foi transferida para um béquer de 500 ml, onde a amostra de tecido foi imersa por 10 minutos. Após este período, a amostra de TNT, agora com a solução de AgNO₃ e quitosana foi exposta a uma lâmpada de luz negra (potência de 26 W) por um período de 2 h e 6 h, determinado de acordo com o protocolo experimental. Em seguida, foram colocadas em uma cabine de MDF, que foi projetada e construída para essa finalidade. Com uma distância entre a amostra e a lâmpada de 20 cm. Após o tempo de exposição que foi determinada para cada ensaio, a amostra de tecido foi levada a estufa, por 5 min, a 60 °C até a secagem.

Para avaliar quais dos fatores exercem maior influência na atividade antibacteriana e na formação das nanopartículas de prata utilizamos um protocolo

experimental com variação nas concentrações dos fatores. Abaixo, temos o procedimento experimental, indicando quais as variáveis analisadas e as concentrações determinadas para cada ensaio.

Tabela 1. Protocolo experimental.

Ensaio	Concentração AgNO ₃ (gL ⁻¹)	Concentração Quitosana (gL ⁻¹)	Tempo de redução UV (h)
1	6	3	6
2	2	1	2
3	6	1	2
4	6	1	6
5	6	3	2
6	2	3	6
7	2	3	2
8	2	1	6

2.3. Análise microbiológica dos tecidos

O método de disco difusão (CLSI standard M02) foi realizado para avaliar a atividade antibacteriana do tecido após a síntese das nanopartículas. Para isso, as bactérias foram suspensas em solução salina e semeadas sobre a placa contendo o ágar Muller-Hilton. Em seguida, foram colocados os discos contendo as amostras a serem testadas. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h. Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos foram medidos (em milímetros).

Os microrganismos utilizados no teste de contato dinâmico dos tecidos foram as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cultivados em Caldo Mueller-Hinton (Difco®), como já descrito anteriormente. Para os testes, a densidade celular será padronizada em tubos de solução salina 0,9% estéril, para que a turvação fosse idêntica ao tubo da escala McFarland que corresponde a $0,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

O teste de contato dinâmico é quantitativo e foi utilizado para análise da atividade antibacteriana, sendo adaptado da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) E2149 13.2806. Para esse experimento, foi utilizado meios seletivos e diferenciais, ágar eosina azul de metileno (Kasvi®) para *E. coli* ATCC®25922™ e ágar manitol salgado (Kasvi®) para *S. aureus* ATCC®25923™. Para a realização do teste foi necessário ativar

uma nova cultura de bactéria em Caldo Tríplico de Soja (TSB) estéril a 37 °C por 24 h. A cultura foi diluída em solução tampão estéril (0,3 mM KH₂PO₄) com uma concentração variando de 1,5 x 10⁸ para 3,0 x 10⁸ UFC (unidades formadoras de colônias) mL⁻¹, de acordo com o 0,5 da escala McFarland.

As amostras TNT (5x5 mm) não foram esterilizadas antes do teste, devido à proximidade da temperatura da autoclave, com o ponto de fusão de Polipropileno. Para o Polipropileno isotático, o ponto de fusão pode alcançar o valor máximo de 176 °C, enquanto para o Polipropileno sindiotático tal limite é de 135 °C (ROSÁRIO et al. 2011). Porém, uma amostra do tecido foi colocada em um tubo de ensaio sem inóculo, apenas com a solução tampão estéril (0,3 mM KH₂PO₄), agitada por 1 h e incubada à 37 °C por 24 h, com a finalidade de verificar se houve contaminação do tecido durante a síntese das nanopartículas.

As amostras do TNT foram adicionadas em um Erlenmeyer de 250 mL, inoculadas com a suspensão de microrganismos contendo 50 mL de solução salina e 0,05 mL de inóculo, foram agitadas a 120 RPM em uma incubadora shaker, a 37 °C pelo período de 1 h. Posteriormente, foram diluídas em série e cada amostra foi semeada em duplicata. Os testes foram realizados em duplicata, em dias diferentes. Como controle negativo, utilizou 50 mL da solução tampão estéril, a mesma concentração bacteriana em UFC mL⁻¹ e foi imerso uma amostra do não tecido sem acabamento, para analisar se o material exerce alguma atividade antibacteriana, sem a presença do acabamento. Os resultados foram expressos como a média de UFC mL⁻¹, de acordo com o método de teste ASTM-E2149 13.2806 (adaptado). A porcentagem de redução e a redução logarítmica bacteriana do crescimento microbiano foram determinadas de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Redução bacteriana} = \text{Log}_{10}(\text{B}) - \text{Log}_{10}(\text{A})$$

Onde, A indica o número de UFC mL⁻¹ para o frasco contendo a amostra com acabamento após o tempo de contato e B representa o número de UFC mL⁻¹ para o 'inóculo apenas' no momento '0'. As médias foram calculadas com base nos valores da contagem de UFC, que foi obtida de acordo com o método de contagem em placa de ágar.

2.4. Ensaio de citotoxicidade

Foram utilizadas Fibroblastos da linhagem L929, que foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e analisadas diariamente em microscópio invertido. Para a avaliação da citotoxicidade do tecido, foi empregado o ensaio de metiltiazol (MTT). Este ensaio colorimétrico baseia-se na capacidade das mitocôndrias viáveis de converter um sal de tetrazólio 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) em cristais púrpuras de formazan.

2.5. Caracterização das nanopartículas de prata: Espectroscopia no UV-VIS

A espectroscopia no UV-Vis foi empregada para confirmar a formação de nanopartículas de prata, por meio do surgimento de bandas de ressonância de plásmão de superfície (surface plasmon resonance - SPR). Para essa análise, foram obtidas leituras de reflectância das amostras de tecido sem tratamento e com o tratamento das nanopartículas de prata (NPAg), na região entre 250 e 800 nm, com resolução de 1 nm, utilizando um espectrofotômetro UV/VIS/NIR da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 1050, disponível no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), da UEM. O tamanho da nanopartícula foi estimado a partir de espectros de absorção UV-VIS usando a teoria de Mie-Drude, levando em consideração que tenha formato esférico.

2.6. Análises estatísticas

A avaliação da citotoxicidade e da formação da nanopartículas foram realizadas em triplicata. A análise de variância (ANOVA) foi realizada pelo programa GraphPad Prism® (versão 6.0, GraphPad Software Inc., EUA) para testar a significância das diferenças observadas. O teste de comparação múltipla de Tukey foi aplicado aos dados e as médias que diferiram com probabilidade igual ou maior que 95% foram consideradas estatisticamente significativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e ensaio de microdiluição em caldo para o nitrato de prata e quitosana

Os resultados para atividade antibacteriana da quitosana encontrados na literatura, são conflitantes (XIA e WU, 1996; UENO et al., 1997), devido às diferenças nas suas propriedades físico-químicas (OLIVEIRA, 2021). Características químicas como peso molecular (PM) e grau de desacetilação (GD) são os fatores que mais influenciam nos resultados, pois dependendo do PM a entrada da quitosana na célula pode ser facilitada ou dificultada, enquanto o grau de desacetilação interfere na solubilidade da amostra. Quando o grau de desacetilação atinge 70%, a diluição é viabilizada em soluções aquosas ácidas, o que possibilita várias aplicações. Segundo, SILVA (2010) quando o grau de desacetilação aumenta, influencia na viscosidade e, conseqüentemente, afeta na diluição da amostra, sem estar completamente diluída, não exerce sua atividade antibacteriana. As amostras de quitosana foram identificadas de acordo com a diferença de peso molecular, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Amostras de quitosana e suas características químicas (Nano=nanoquitosana; QM= quitosana com médio peso molecular; QA=quitosana com alto peso molecular)

Amostra	Massa Molar Viscosimétrica	Grau de desacetilação
Nano	12 kda	90%
QM	50 kda	90%
QA	180 kda	92%

De acordo com as análises realizadas, todas as amostras apresentaram atividade frente às bactérias. Os resultados foram divergentes para *S. aureus* e *E. coli*, o que já era esperado, pois esses microrganismos apresentam estruturas celulares diferentes, o que conseqüentemente afeta no mecanismo de ação da quitosana, quando em contato com a superfície celular das cepas. Ainda não está esclarecido qual a forma de ação deste polímero nas células microbianas, porém, muitos autores têm sugerido possíveis mecanismos de ação. Alguns relacionam com a formação de interações eletrostáticas de grupos aniônicos de membranas celulares microbianas com a carga positiva de grupos amina da quitosana, gerando prejuízos na ingestão de nutrientes das células, afetando seu crescimento (GOMES, 2007; YOUNG e KAUSS, 1983).

Zheng e Zhu (2003) sugerem um mecanismo afetado pelo PM, perante bactérias gram-negativas e gram-positivas. Quando em contato com *S. aureus*, a quitosana de PM maior apresenta atividade antibacteriana mais eficaz, a principal razão é a formação de uma membrana polimérica na superfície da célula, impedindo a entrada de nutrientes para o citoplasma. Enquanto em *E. coli*, a quitosana com PM menor possui uma atividade antibacteriana melhor, pelo fato de conseguir permear a membrana celular, e com sua capacidade de adsorção de substâncias eletronegativas, causar danos às atividades fisiológicas da célula, matando-a. Existem mecanismos que sugerem a ligação da quitosana ao DNA bacteriano, comprometendo a síntese proteica e as atividades vitais do microrganismo (SEBTI et al., 2005). Além disso, elas agem como quelante de íons metálicos, produzindo toxinas e afetando o crescimento microbiano (AMORIM et al., 2005).

Na Tabela 3, temos os resultados obtidos pelo teste de microdiluição em caldo para *S. aureus* e *E. coli*. Pode-se notar que a quitosana QM com médio peso molecular apresentou menor CIM, indicando que uma menor concentração dessa amostra é capaz de reduzir o crescimento bacteriano visível. Esse resultado encontrado para *E. coli*, é semelhante ao resultado de Silva (2010). Devido a isso e ao fato de não ter apresentado variação nas replicatas, essa amostra foi selecionada para ser o agente estabilizante das nanopartículas de prata durante a síntese.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) obtido por teste de microdiluição em caldo.

Amostra	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	
	CIM / CBM(1)	CIM / CBM(2)	CIM / CBM(1)	CIM / CBM(2)
Nano	39,0 / 78,1	19,5 / 312,0	156,0 / 156,0	78,1 / 156,0
QM	19,5 / 312,0	19,5 / 312,0	78,1 / 78,1	78,1 / 78,1
QI	39,0 / 156,0	9,7 / 39,0	78,1 / 78,1	39,0 / 39,0

O nitrato de prata possui uma atividade antibacteriana bem estabelecida (SLAWSON et al., 1992; PARK et al., 2014; BOTELHO et al., 2020) devido a sua interação com enzimas, proteínas e DNA (SHI et al., 2015), por isso avaliamos não ser necessário realizar a duplicata dos testes. Para *E. coli* o CIM e o CBM foram ambos de 7.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Enquanto para *S. aureus* obtivemos o CIM de 7.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e o CBM 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$, esses resultados implicam a concentração de nitrato de prata capaz de inibir o crescimento bacteriano de *E. coli* é menor que em *S. aureus*, podendo estar associado ao

fato de a parede celular das bactérias gram-negativas serem mais suscetíveis ao rompimento mecânico, por possuir uma camada mais fina de peptidoglicanos (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

A síntese das nanopartículas *in situ*, foi realizada por redução UV, conforme apresentado em Material e Métodos. Após a síntese, o TNT nanoestruturado foi submetido à análise da atividade antibacteriana do material pelo método de disco difusão. Para ambos os testes, a atividade antibacteriana foi testada em *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923, que são bactérias padrão para este método. Segue abaixo a Tabela 4, e a Figura 1 que apresentam os resultados do teste de disco difusão para a bactéria *S. aureus*.

Tabela 4. Diâmetro dos halos de inibição do crescimento de *S. aureus* obtidos por ação de nanopartículas de prata.

Amostras	Concentração de AgNO ₃ (gL ⁻¹)	Concentração de quitosana (gL ⁻¹)	Tempo de redução UV (h)	Diâmetro do halo (mm)		
				Exp. 2	Exp. 3	
1	6	3	6	8	0	7
2	2	1	2	0	0	0
3	6	1	2	0	11	0
4	6	1	6	0	13	7
5	6	3	2	8	13	7
6	2	3	6	0	11	0
7	2	3	2	0	0	7
8	2	1	6	0	7	0

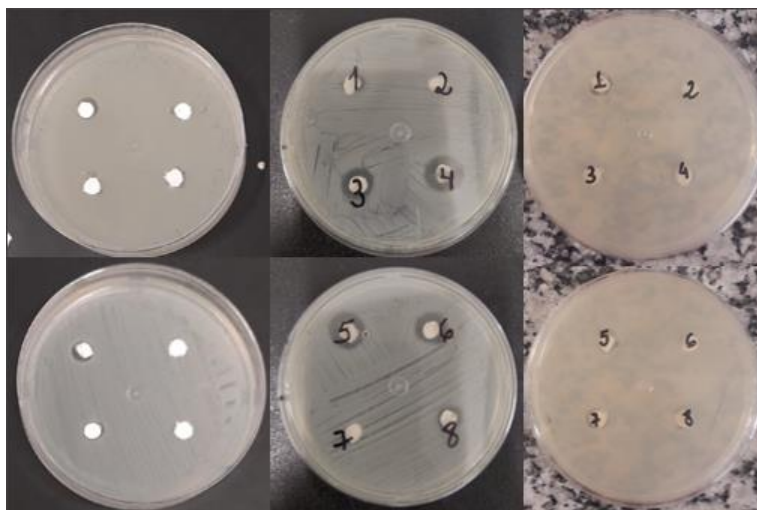


Figura 1. Diâmetro dos halos de inibição obtidos para *S. aureus* realizado pelo método de disco difusão, em triplicata.

De acordo com Perera et al. (2013), halos de inibição acima de 3 mm são considerados significativos. Dentre as amostras analisadas, a Amostra 5 com concentrações de AgNO_3 de 6 gL^{-1} , quitosana 3 gL^{-1} e tempo de redução UV de 2 h, constatamos nas 3 replicatas a formação de halo de inibição maiores que 3 mm, que indica bom efeito antibacteriano. Nas demais amostras, os valores de halo em algumas das replicatas foi zero, somente a Amostra 2 não foi identificado formação de halo em nenhuma das replicatas.

Na Tabela 5 e Figura 2, observamos que a formação de halo de inibição foi menor *E. coli*, em comparação com *S. aureus*. As amostras que apresentaram halo em mais de uma réplica, foram as amostras 1, 3 e 4, as demais ou não apresentaram ou obtiveram a formação de halo em apenas uma das replicatas, é o caso da Amostra 7. Os trabalhos de Fonseca et al. (2022), Hartz et al. (2021) e Abdel-Halim et al. (2014), apresentaram tamanhos de halos de inibição próximos aos resultados que foram obtidos no presente estudo. Sendo os resultados de Fonseca et al. (2022) dose-dependente, quanto maior a concentração das AgNPs maior a diâmetro do halo.

No nosso trabalho os valores de halos de inibição variaram de forma considerável entre *E. coli* e *S. aureus*, porém, é possível examinar que as amostras que apresentaram atividade antibacteriana, foram as que apresentavam uma concentração maior de nitrato de prata e quitosana, em sua maioria. Saini et al. (2019) fez a análise quantitativa do material que foi funcionalizado com nanopartículas pelo método de disco difusão e o resultado da análise para *E. coli* foi um halo de inibição de 1 mm, indicando atividade antibacteriana reduzida.

Tabela 5. Diâmetro dos halos de inibição do crescimento de *E. coli* obtidos por ação de nanopartículas de prata.

Amostras	Concentração AgNO ₃ (gL ⁻¹)	Concentração Quitosana (gL ⁻¹)	Tempo de redução UV (h)	Diâmetro do Halo (mm)		
				Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
1	6	3	6	0	7	10
2	2	1	2	0	0	0
3	6	1	2	0	7	8
4	6	1	6	0	10	6
5	6	3	2	0	0	0
6	2	3	6	0	0	0
7	2	3	2	0	0	6
8	2	1	6	0	0	0

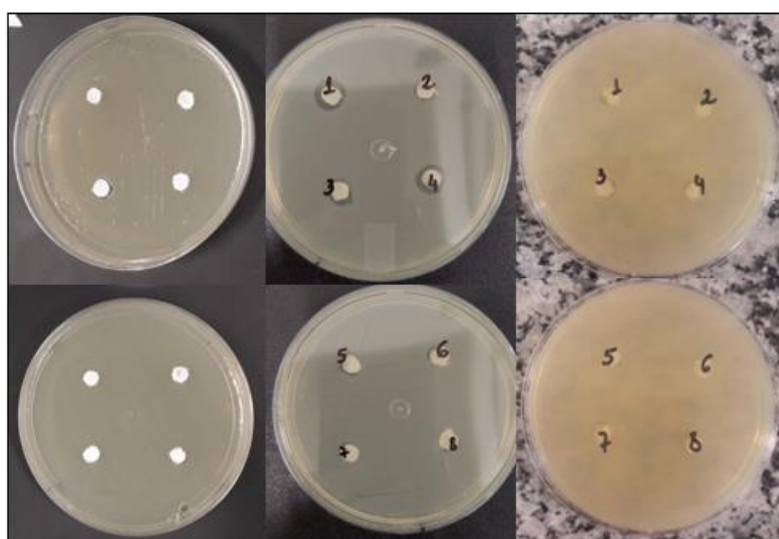


Figura 2. Diâmetro dos halos de inibição obtidos para *E. coli* realizado pelo método de disco difusão, em triplicata.

A partir desses resultados foram selecionadas as amostras que apresentaram boa atividade antibacteriana, para complementar o resultado com a análise quantitativa. Devido ao fato do teste de disco difusão ter apresentado muitas variações nos resultados, buscamos analisar as amostras por meio de um teste quantitativo, para que além de visualizar os resultados, fosse possível mensurar o quanto esse material é ativo. A triagem das amostras foi baseada de acordo com os melhores resultados obtidos com o método de disco difusão.

Sendo selecionadas duas que continham a concentração maior de AgNO₃ e quitosana e variam apenas no tempo de redução UV (amostras 1 e 5) e a amostra que continha a menor concentração dos reagentes e o menor tempo de redução UV (amostra 2), para que com a análise quantitativa pudéssemos observar se na menor concentração, também havia redução da atividade antibacteriana, levando em consideração que características químicas e físicas, são fatores determinantes para a toxicidade dessas partículas frente as células animais, como o tamanho, a morfologia, a dose e o tempo de exposição (DÚRAN et al., 2016; PINZARU et al., 2018; DÚRAN et al., 2019).

A análise da redução da atividade antibacteriana, foi realizada de acordo com a norma E2149-13 da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), com o Teste padrão para determinação da atividade antimicrobiana de agentes antimicrobianos imobilizados sob condições de contato dinâmico, realizado de acordo com a metodologia descrita em Material e Métodos. A Tabela 6 e Figura 3, apresentam os resultados.

Tabela 6. Percentual de redução do crescimento bacteriano realizado pelo teste do contato dinâmico.

Bactéria	UFC/ml		Redução Logarítmica	Percentual de Redução
	T: 0h	T: 1h		
<i>E. coli</i>	6 x 10 ⁴	0	4,31 ± 0,45	99,99%
<i>S.aureus</i>	6,5 x 10 ²	0	2,64 ± 0,14	99%

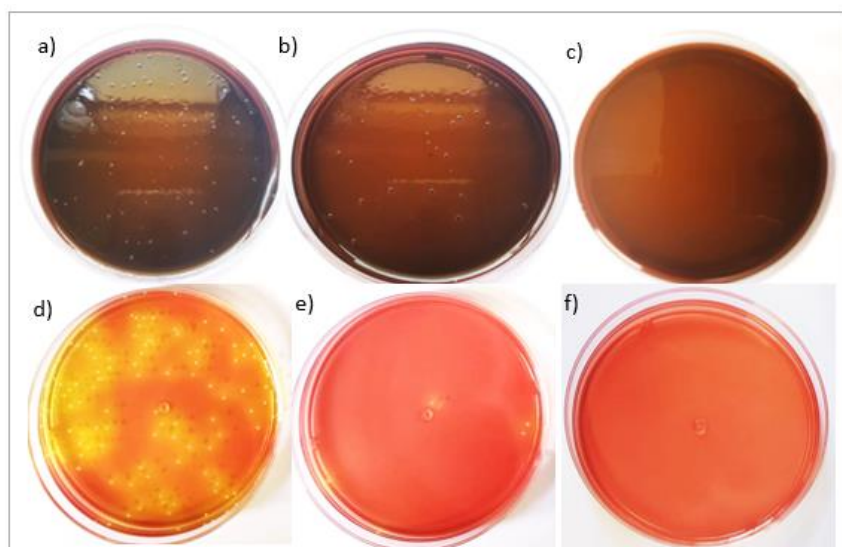


Figura 3. Atividade antibacteriana da amostra realizada por métodos de diluição em série para *E. coli*, a) controle T: 0 (diluição em série 10^{-1}), b) controle T: 1 h (diluição em série 10^{-2}), c) amostra (diluição em série 10^{-1}). Para *S. aureus*, d) controle T: 0 (diluição em série 10^{-2}), e) controle T: 1 h (diluição em série 10^{-4}), f) amostra (diluição em série 10^{-1}).

Os resultados obtidos com a análise quantitativa foram conclusivos em relação à atividade antibacteriana do acabamento do material, visto que foi detectada a redução bacteriana próximo a 100%, inclusive, na amostra que continha uma concentração menor de reagentes e menor tempo de redução UV.

O estudo realizado por Almeida et al. (2021), no qual foi desenvolvido uma nanofibra, eletrofiadas de acetato de celulose (CA) e brometo de cetilpiridínio (CEC) que apresenta atividade antibacteriana, para ser funcionalizada como a parte filtrante de máscaras cirúrgicas, aplicou o mesmo método de análise da atividade quantitativa e apresentou resultados do percentual de redução do crescimento bacteriano, maior que 99,99%, similar ao que observamos aqui. O estudo de Saini et al (2019) aplicou a mesma metodologia para analisar o resultado quantitativo da atividade antibacteriana de um tecido de algodão revestido com nanopartículas de prata, sintetizadas por redução química de nitrato de prata, em que hidrato de hidrazina foi utilizado como agente redutor e álcool polivinílico como agente estabilizante. Neste trabalho, o autor realizou a análise somente com uma bactéria gram-negativa, *E. coli*, e o resultado de redução da atividade antibacteriana foi de 94,56%, mesmo após 5 lavagens o material ainda apresentou redução em 93,3%; porém, esse resultado satisfatório foi evidenciado somente na concentração maior de Ag, que foi de 50 ppm.

O trabalho de Morsi et al. (2017) que estudou a atividade antibacteriana de AgNps associadas a quitosana para o tratamento de água, encontrou resultados semelhantes em relação à redução logarítmica de *S. aureus*, sendo próximos da redução de 2 logs. Ainda em relação ao estudo citado foi testado a atividade em *E. coli*, todavia, a redução foi menor em comparação a analisada no presente estudo. Altava et al. (2016), usaram da mesma metodologia para análise do percentual de redução bacteriana e os resultados para *E. coli* em sua maioria, indicaram redução do percentual acima de 90%, onde o valor da redução aumentava conforme a temperatura e tempo de síntese fosse sendo elevada.

Nie et al. (2021) ao funcionalizaram um têxtil com ação autodesinfetante e propriedade antibacteriana fotodinâmica/fototérmica sinérgica, utilizando sucessivamente metais orgânicos porfirínicos (PCN-224) e nanopartículas de Ag (NPs) cultivadas *in situ* em malha de algodão têxtil (KCT) para obter um efeito bacteriostático. Os autores observaram uma redução da atividade bacteriana maior que 99%, para *E. coli* e *S. aureus*. Wang (2021) realizou a síntese *in situ* de nanopartículas de prata e de selênio em tecido de celulose cationizada com finalidade antimicrobiana. No teste de análise da atividade antimicrobiana foi identificado a redução do percentual microbiano maior que 99,99% em todos os grupos, porém, esse valor foi reduzido após as lavagens provavelmente devido à utilização de detergentes com tensoativos aniônicos em sua composição, que podem ter neutralizado grupos catiônicos após inúmeras lavagens.

O mesmo percentual de redução da atividade microbiana de colônias de *E. coli* e *S. aureus* foi encontrado na investigação de Srisod et al. (2018), que estudou a funcionalização de tecidos de algodão. Com a análise de durabilidade do acabamento, foi identificado que mesmo após 50 lavagens do tecido o efeito de redução ainda se manteve alto, em torno de 90%.

3.2 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi empregado com o intuito de verificar se as concentrações que apresentaram uma excelente atividade antibacteriana seriam prejudiciais em contato com a pele humana. Na Figura 4, temos os resultados do ensaio de citotoxicidade, foi observada viabilidade celular superior a 98% nas amostras testadas,

indicando que o acabamento sintetizado no material não causou toxicidade nas células, pois não houve redução significativa da proliferação celular.

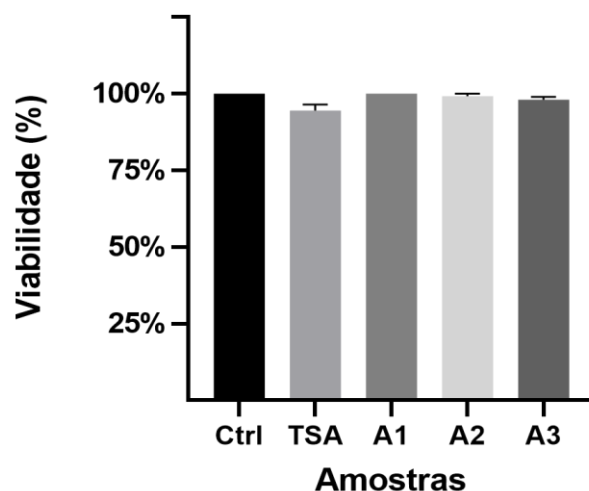


Figura 4. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento de fibroblastos. Ctrl, controle sem TNT; TSA, TNT sem acabamento; A1, 2 gL⁻¹ nitrato de prata 1 gL⁻¹ quitosana, 2 h UV (A1); A2, 6 gL⁻¹ nitrato de prata, 3 gL⁻¹ quitosana, 6 h UV (A2); A3, 6 gL⁻¹ nitrato de prata, 3 gL⁻¹ quitosana, 2 h UV (A3). As barras representam médias (n= 3 ± EPM). Diferenças estatísticas foram avaliadas pelo método de Tuckey (p<0,05).

De acordo com estudos anteriores de Azizi-Lalabadi et al. (2021) o tamanho das nanopartículas é um fator considerável no aumento da toxicidade. Segundo Liao et al. (2019), o cultivo em células *in vitro* e a toxicidade das AgNPs, sendo identificada toxicidade em diversas linhagens celulares, incluindo células epiteliais brônquicas humanas, glóbulos vermelhos, células mononucleares do sangue periférico humano, queratinócitos humanos imortais e células hepáticas. Foi confirmado por esse e outros estudos, que as AgNPs induzem a citotoxicidade que é dependente da concentração, tamanho e tempo, contudo, tamanhos inferiores 10 nm, tendem a ser mais prejudiciais.

Borchio et al. (2021) avaliou a citotoxicidade de AgNPs em fibroblastos e analisou os resultados por um método que quantifica a viabilidade celular após a exposição às nanopartículas. Utilizando diversas concentrações de AgNPs, foi observado que a partir de 1 µg/ml a viabilidade dos fibroblastos era reduzida em 50% e a redução foi dose-dependente a partir dessa concentração, indicando que as nanopartículas reduzem significativamente a viabilidade celular.

O trabalho de Mohseni et al (2019) comparou dois antimicrobianos, nanofibras de quitosana incorporadas com nanopartículas de prata e nanofibras associadas a um produto

padrão (sulfadiazina de prata – SSD). A atividade antimicrobiana foi semelhante à que encontramos aqui, porém, o material incorporado com SSD apresentou toxicidade maior contra as células fibroblástica em relação às AgNPs, mesmo em concentração semelhante. O estudo de Chen (2020) sintetizou e avaliou a síntese de AgNPs reduzida in situ por diferentes agentes redutores na presença de quitosana, tendo por objetivo obter propriedades antibacterianas para o substrato (polipropileno) com custo reduzido. Os resultados foram promissores, para *E. coli* e *S. aureus* a taxa de inibição do crescimento bacteriano foi de 99% e 100%, respectivamente. Dentre as análises mecânicas, o material não foi prejudicado quanto a elasticidade e resistência, inclusive, a presença das nanopartículas executaram melhora nesses parâmetros em comparação ao polipropileno puro.

Srisod et al. (2018) avaliaram a citotoxicidade do tecido de algodão funcionalizado com AgNPs, utilizando células L929, os ensaios demonstraram que os tecidos tratados com os agentes antimicrobianos não apresentavam toxicidade para as células. Para Durán et al. (2016) as nanopartículas de prata podem ser internalizadas, liberar íons de Ag^+ , gerando estresse oxidativo, que promove morte celular. O mecanismo esclarecido da ação citotóxica das nanopartículas de prata ainda não é elucidado, por isso é importante garantir que o material que está sendo funcionalizado não apresente concentrações que possam ser prejudiciais à segurança de pessoas e do meio ambiente.

3.3 Formação das nanopartículas

A espectroscopia no UV-Vis é a técnica mais usada para caracterização de nanopartículas, sendo rápida e eficiente para caracterizações em nanoescala. A presença da ressonância plasmônica entre os comprimentos de onda de 400–440 nm resultam num pico de plásmon característico para AgNPs (ABBASI et al. 2016; SHAHEEN et al., 2018).

Com a finalidade de confirmar a formação de nanopartículas de prata nas duas faces da superfície do tecido, os espectros de refletância foram obtidos. Para a amostra controle, observamos que as medidas de refletância em cada lado (controle A e controle B) apresentam diferenças na região abaixo de 400 nm (região do UV), em todos os ensaios

realizados, como mostra a Figura 5. Na Figura 6, podemos observar que a Amostra 1 apresenta uma menor reflectância que o controle. Como a reflectância é menor podemos concluir que existe uma absorção nesta região do espectro.

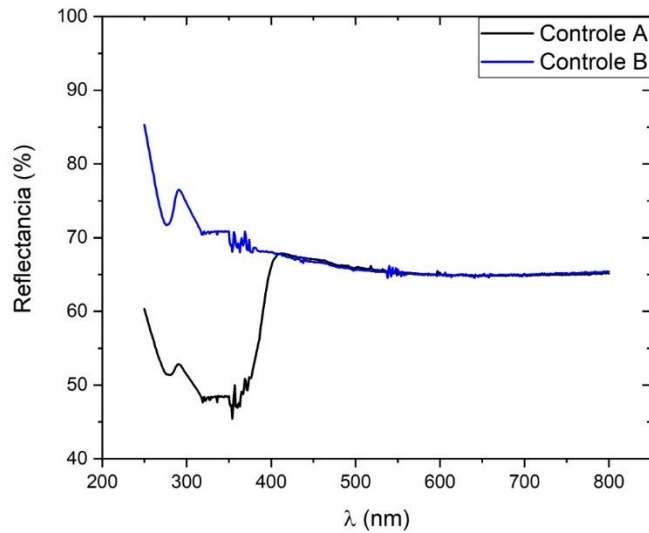


Figura 5. Reflectância para a amostra controle nos diferentes lados (A e B).

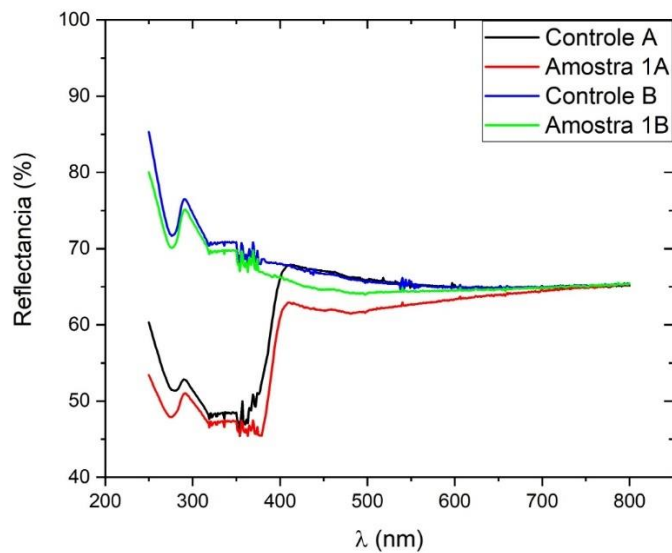


Figura 6. Comparação entre a reflectância da amostra referente a amostra 1 e o controle.

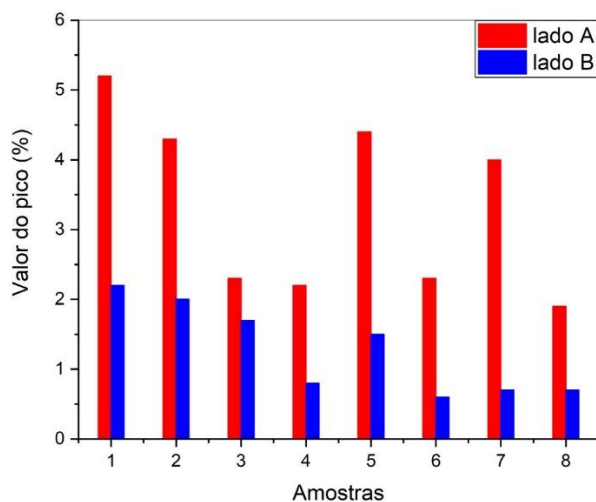


Figura 7. Valor (%) do pico da banda observado na subtração dos espectros de refletância do controle e respectivo ensaio.

A subtração dos espectros (controle – amostra) resulta em um espectro proporcional à quantidade de radiação absorvida pelo material depositado na amostra (Figura 7). A reflectância UV-Vis com a configuração utilizada, mostrou que o maior pico, e conseqüentemente maior quantidade de nanopartículas de prata foi obtida com a Amostra 1 (lado A) com valor de pico de 5,2%. Na seqüência os ensaios 5, 2 e 7 (lado A) que apresentaram valores de pico entre 4,4 e 4,0%. E por fim o conjunto formado pelas amostras 3, 4, 6 e 8, apresentaram valores de pico entre 2,3 e 1,9. É importante observar que na amostra controle, as medidas de refletância apresentam diferenças para cada um dos lados na região abaixo de 400 nm.

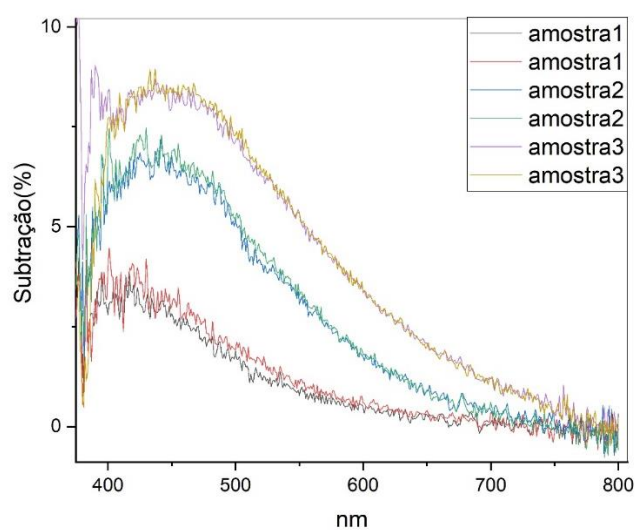


Figura 8. Análise da formação de AgNPs em ambos os lados das amostras.

A segunda caracterização obtida para análise da formação das nanopartículas, foi realizado nas três amostras otimizadas (Figura 8). As diferenças para

cada um dos lados na região abaixo de 400nm (região do UV) continuam sendo observadas. Foi realizada a verificação se um lado apresenta intensidade de banda maior que o outro, na Amostra 1 não foi significativo, mas nas amostras 2 e 3 são mais visíveis, como a intensidade da banda deve ser proporcional a quantidade de partículas absorvedoras, isto indica existe um lado que há uma quantidade maior de AgNPs do que o outro. As bandas estão centradas em 426 nm, 440 nm e 452 nm, para as amostras 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 8).

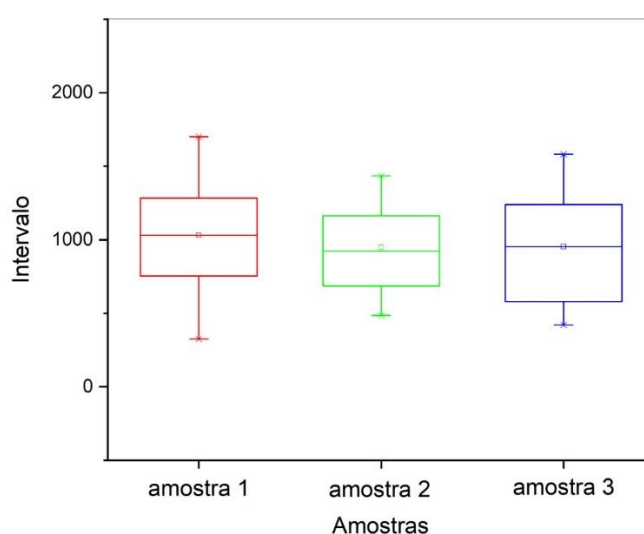


Figura 9. Análise estatística da formação das nanopartículas de prata nas três amostras de acordo com as concentrações, 2 gL⁻¹ nitrato de prata, 1 gL⁻¹ quitosana, 2 h UV (A1); 6 gL⁻¹ nitrato de prata, 3 gL⁻¹ quitosana, 6 h UV (A2) e 6 gL⁻¹ nitrato de prata, 3 gL⁻¹ quitosana, 2 h UV (A3). Nenhum dos tratamentos diferem estatisticamente, foram avaliados pelo método de Tuckey (p<0,05).

Porém, de acordo com a análise estatística, nenhum dos tratamentos diferem em relação a formação das AgNPs (Figura 9). A estimativa do tamanho do diâmetro da partícula, considerando que a partícula seja esférica, está representada na Figura 10.

Torres et al. (2022) realizou a síntese *in situ* de nanopartículas de prata em um tecido de algodão, a fim de verificar o quanto o tamanho influencia na propriedade super hidrofóbica. Por meio da técnica da espectroscopia no UV-Vis identificou a formação de nanopartículas de prata, porém, a diferença nos picos de absorção indica tamanho de nanopartículas diferentes (pico de absorbância 400, 403 e 406 nm, variando de acordo com os agentes que foram agregados para estabilização das nanopartículas).

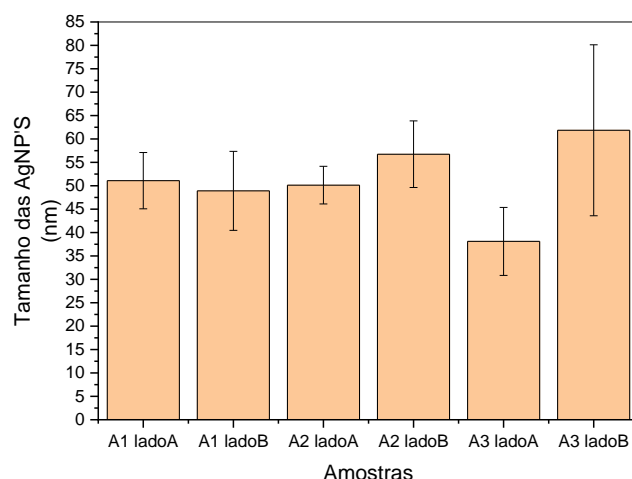


Figura 10. Estimativa do tamanho do diâmetro das nanopartículas.

Essa diferença nos picos de absorvância que influenciam no tamanho das nanopartículas, também foi encontrada por Huang et al. (2004). Há muitas discussões em torno do mecanismo de ação das nanopartículas de prata perante bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, a maior parte dos autores atribui essa atividade a interação das nanopartículas com estruturas e compostos presentes na membrana celular desses microrganismos, alterando a permeabilidade e causando lise celular (DURAN et al., 2016; GOMES et al., 2020). Panacék et al. (2009) associam esse mecanismo à constituição da parede celular de cada microrganismo, o que justifica resultados diferentes quando se compara atividade bacteriana em *E. coli* e *S. aureus*.

Stoimenov et al. (2002) analisaram o efeito de nanopartículas de óxidos metálicos altamente reativas em *E.coli* e identificou alterações na morfologia da membrana bacteriana que aumentavam a permeabilidade da célula, afetando o transporte de substâncias essenciais ao metabolismo, causando a morte celular. A membrana externa das células de *E. coli* é constituída em sua maioria por endotoxinas, conhecidas como lipopolissacarídeos (LPS), que fornecem uma barreira de permeabilidade eficaz.

Para Amro et al. (2000) a depleção de metais pode causar deformidades na membrana externa, alterando sua permeabilidade pela liberação progressiva de moléculas de LPS e proteínas da membrana, afetando as atividades fisiológicas da célula. Sondi e Stalonek-Sondi (2004) especulam que esse mesmo mecanismo aconteça com nanopartículas de prata em contato com gram-negativas como a *E. coli*.

4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que síntese *in situ* de nanopartículas de prata por meio da redução UV foi eficiente, pois foi possível identificar a formação de nanopartículas pela técnica de espectroscopia no UV-Vis e pelo teste de redução da atividade bacteriana observamos que a redução do crescimento das colônias foi superior a 99% em todas as amostras testadas. O teste de citotoxicidade demonstrou que o tratamento não afetou a viabilidade da célula eucariótica, indicando que o acabamento não é tóxico para as células de Fibroblastos da linhagem L929. Visto que as três amostras sintetizadas com concentrações diferentes de reagentes e tempo de redução UV apresentaram resultados semelhantes nas análises realizadas, consideramos que a amostra mais promissora é a Amostra 1 (2 gL⁻¹ nitrato de prata, 1 gL⁻¹ quitosana, 2 h UV), pois ela foi tão eficiente quantos as duas amostras com concentrações maiores, porém, sua síntese tem um custo menor. Estudos subsequentes precisam ser realizados para caracterizar as nanopartículas, analisar a capacidade de filtração e a estabilidade desse acabamento no TNT em condições de umidade e passagem de ar respiratório, bem como sua atividade antiviral.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, E.; MILANI, M.; FEKRI AVAL, S.; KOUHI, M.; AKBARZADEH, A. et al. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n.2, p. 173-180, 2016.
- ABDEL-HALIM, E. S.; AL-DEYAB, S. S.; ALFAIFI, A. Y. A. Cotton fabric finished with β -cyclodextrin: Inclusion ability toward antimicrobial agent. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 550-556, 2014.
- ADEYEMI, O. S.; SHITTU, E. O.; AKPOR, O. B.; ROTIMI, D.; BATIHA, G. E. S. As nanopartículas de prata restringem o crescimento microbiano, promovendo estresse oxidativo e danos ao DNA. **Revista EXCLI**, v. 19, n. 492, 2020.
- ALMEIDA, D. S.; SCACCHETTI, F. A. P.; SANTOS, R.; AGUIAR, M. L.; BEAL, A. et al. Evaluation of biocidal properties of biodegradable nanofiber filters and their use in face masks, **Environmental Technology**, 2021.
- ALTAVA, L. F.; COMPER, A. T.; MOREIRA, J. C.; KOSLOWSKI, L. A. D. Estudo da eficiência antimicrobiana de sílica e poliamida 66 impregnadas com nanopartículas de prata. In: **XVII SILUBESA**. Anais eletrônicos... Florianópolis, 2016.
- AMORIM, R. V. S.; TAKAKI, G. M. C.; LEDINGHAM, W. M.; FUKUSHIMA, K. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. **Journal industrial Microbiology and Biotechnology**, v.32, n. 1, p. 19-23, 2005.
- AMRO, N. A.; KOTRA, L. P.; WADU-MESTHRIGE, K.; BULYCHEV, A.; MOBASHERY, S.; LIU, G. Y. High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. **Langmuir**, v. 16, n. 6, p. 2789-2796, 2000.
- ANVISA. Interpretação de dados microbiológicos. **Métodos para o TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos**. 2008. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos1a.htm#:~:text=os%20métodos%20de%20macrodiluição%20em,capaz%20de%20inibir%20o%20crescimento>. Acesso em: 25 de maio de 2022.
- AZIZI-LALABADI, M.; GARAVAND, F.; JAFARI, S. M. Incorporation of silver nanoparticles into active antimicrobial nanocomposites: Release behavior, analyzing techniques, applications and safety issues. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 293, 2021.
- BOCKMÜHL, D. P.; SCHAGES, J.; REHBERG, L. Lavandaria e higiene têxtil na área da saúde e não só. **Célula microbiana**, v. 6, n. 7, pág. 299, 2019.
- BACKX, B. P.; DELAZARE, T. Meio dispersivo na síntese eficiente de nanopartículas de prata para aplicação em tecidos antimicrobianos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 14, n. 2, p. 252-257, 2019.

BORCHIO, P. G. M.; SOUZA, W.; BOLDRINI, L.C.P.; RIBEIRO, A.R.; GRANJEIRO, J.M. Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas usadas nas indústrias biotecnológicas. In: **Congresso Metrologia**, Rio de Janeiro, 2021.

BOTELHO, M. P. J.; DO NASCIMENTO, F. B.; PARMAGNANI, A. A.; BOTELHO, M. V. J.; GONINI JÚNIOR, A. Verificação da capacidade antibacteriana e antifúngica de nanopartículas de prata incorporadas a gessos odontológicos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 19371-19380, 2020.

CAROLYN, A. R.; HADWIGER, L. A. O efeito fungicida da quitosana em fungos de composição variável da parede celular. **Micologia Experimental**, v. 3, n. 3, p. 285-287, 1979.

CHEN, J.; FAN, L.; YANG, C.; WANG, S.; ZHANG, M. et al. Facile synthesis of Ag nanoparticles-loaded chitosan antibacterial nanocomposite and its application in polypropylene. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1286-1295, 2020.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests**. 13th edition. CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**; Approved standard 10th edition. CLSI standard M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

DEL AGUILA, E. M. Nanopartículas de Quitosana: Produção, Características Físico-Químicas e Aplicações Nutracêuticas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, 2017.

DE LIMA, I. R.; FIALHO, B. O.; DA SILVA, H. S.; VIRGÍLIO, A.; SIMÃO, R. A.; DE CASTRO, J. A.; FONSECA, G. S. Síntese e Caracterização de Nanopartículas De Prata como Agentes de Superfície. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, 2018.

DÍAZ, C.; VALENZUELA, M. L.; LAVAYEN, V.; MENDONZA, K.; PEÑA, D. O.; O'DWEYER, C. Nanostructured copper oxides and phosphates from a new solid-state route. **Inorganica Chimica Acta**, v. 377, p. 5–13, 2011.

DURÁN, Nelson et al. Nanopartículas de prata: uma nova visão sobre aspectos mecanicistas da atividade antimicrobiana. **Nanomedicina: nanotecnologia, biologia e medicina**, v. 12, n. 3, pág. 789-799, 2016.

DURÁN, N.; ROLIM, W. R.; DURÁN, M.; FÁVARO, W. J.; SEABRA, A. B. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v. 42, p. 206-213, 2019.

DUTTA, P. K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, J. Perspectivas para filmes antimicrobianos à base de quitosana em aplicações alimentícias. **Food chemistry**, v. 114, n.4, p. 1173-1182, 2009.

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

GOMES, D. M. D.; DURÁN, N.; SEABRA, A. B.; SILVA, L. P.; PRADO, F. B.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. F. S. Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 15, n. 2, p. 433-443, 2020.

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de *Bacillus Subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

HARTZ, T. P.; DE FRAGA, K. R.; SCHEEREN, C. W. Filmes biopoliméricos como suporte para nanopartículas de prata: estudo da atividade antimicrobiana. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, n. 21, p. 317-323, 2021.

HEBEISH, A.; EL-SHAFEI, A.; SHARAF, S.; ZAGHLOUL, S. Novel precursors for green synthesis and application of silver nanoparticles in the realm of cotton finishing. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 605-613, 2011.

HUANG, H.; YUAN, Q.; YANG, X. Preparation and characterization of metal – chitosan nanocomposites. **Colloids and surfaces**, v. 39, p. 31–37, 2004.

HU, R.; ZHAO, Z.; ZHOU, J.; FAN, T.; LIU, Y.; ZHAO, T.; LU, M. Microdissolução de superfície assistida por ultrassom para incorporar nano TiO₂ em tecidos de algodão em solução aquosa de ZnCl₂. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 56, p. 160-166, 2019.

IJAZ, F.; SHAHID, S.; KHAN, S. A.; AHMAD, W.; ZAMAN, S. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Abutilon indicum* leaf extract: Antimicrobial, antioxidant and photocatalytic dye degradation activities. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 4, p. 743-753, 2017.

ISAEVA, E. I.; KIRYUKHINA, S. N.; GORBUNOVA, V. V. Photochemical synthesis of silver and gold nanoparticles in polyhydric alcohols. **Russ. J. Gen. Chem.**, v. 83, p. 619–623, 2013.

LIAO, C.; LI, Y.; TJONG, S. C. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 2019.

MARIN, M. L.; MCGILVRAY, K. L.; SCAIANO, J. C. Photochemical strategies for the synthesis of gold nanoparticles from Au (III) and Au (I) using photoinduced free radical generation. **J. Am. Chem. Soc.** V. 130, p. 16572–16584, 2008.

MOHSENI, M., SHAMLOO, A., AGHABABAIE, Z., AFIOUL, H., ABDI, S., MORAVVE, H., e VOSSOUGH, M. (2019). Um estudo comparativo de curativos carregados com sulfadiazina de prata e nanopartículas de prata: avaliação in vitro e in vivo. **Revista Internacional de Farmácia**, 564, 350-358.

MORSI, R. E.; ALSABAGH, A. M.; NASR, S. A.; ZAKI, M. M. Multifunctional Nanocomposites of Chitosan, Silver Nanoparticles, Copper Nanoparticles and Carbon Nanotubes for water treatment: Antimicrobial characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 264-269, 2017.

NIE, X.; WU, S.; LIAO, S.; CHEN, J.; HUANG, F.; et al. Light-driven self-disinfecting textiles functionalized by PCN-224 and Ag nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, 2021.

NISKA, K.; ZIELINSKA, E.; RADOMSKI, M. W.; INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. **Chem-Biol. Interact**, v. 295, p.38-51, 2018.

OLIVEIRA, M. Z. F. S.; FERNANDES, T. S. M. Síntese e caracterização de beads de quitosana comercial reticulados com glutaraldeído. **Revista Matéria**, v. 26, n. 2, 2021.

ORTIZ, H. O.; RODRÍGUEZ, B. G.; PLIEGO, G. C.; JIMENEZ, L. I. Atividade antibacteriana da quitosana e os complexos interpolieletrólitos de poli (ácido acrílico)–quitosana. **Braz. arco. biol. Technol**, v.53, n.3, 2019.

PARK, J. W.; OH, J. H.; KIM, W. K.; LEE, S. K. Toxicity of Citrate-Coated Silver Nanoparticles Differs According to Method of Suspension Preparation. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 93, p. 53–59, 2014.

PANÁČEK, A.; KOLÁŘ, M.; VEČEŘOVÁ, R.; PRUCEK, R.; SOUKUPOVÁ, J. et al. Atividade antifúngica de nanopartículas de prata contra *Candida spp*. **Biomaterials** , v. 30, n.31, p. 6333-6340, 2009.

PERERA, S.; BHUSHAN, B.; BANDARA, R.; RAJAPAKSE, G. Morphological, antimicrobial , durability , and physical properties of untreated and treated textiles using silver-nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 975–989, 2013.

PINZARU, I.; CORICOVAC, D.; DEHELEAN, C.; MOACĂ, E. A.; MIOC, M. et al. Stable PEG-coated silver nanoparticles–A comprehensive toxicological profile. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 546-556, 2018.

REHAN, M.; BARHOUM, A.; ASSCHE, GV.; DUFRESNE, A.; GATJEND, L.; WILKEN, R. Towards multifunctional cellulosic fabric: UV photo-reduction and *in-situ* synthesis of silver nanoparticles into cellulose fabrics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 877–886, 2017.

ROSÁRIO, F.; PACHEKOSKI, W. M.; SILVEIRA, A. P.; SANTOS, S. F. D.; JÚNIOR, H. S.; CASARIN, S. A. Resíduos de sisal como reforço em compósitos de polipropileno virgem e reciclado. **Polímeros**, v. 21, p. 90-97, 2011.

SAINI, G.; THAKUR, K.; GNANESWARI, M. D. Preparação de Tecido de Algodão revestido com NanoSilver e sua avaliação bactericida. **Journal of Materials NanoScience**, v. 6, n. 1, p. 13–18, 2019.

SIMONCIC, B.; TOMSIC, B. Estruturas de novos agentes antimicrobianos para têxteis-uma revisão. **Revista de Pesquisa Têxtil**, v. 80, n. 16, pág. 1721-1737, 2010.

SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; CARNET-PANTIEZ, A.; GRELIER, S.; COMA, V. J. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. **Food science**, v. 70, p. 1100 - 1104, 2005.

SILVA, J.N. **Esferas de alumina funcionalizadas com nanopartículas de ouro e prata obtidos a partir do biopolímero quitosana**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2010.

SHAHEEN, T. I.; ABDEL, A. T. Y.; ABEER, A. *In-situ* green myco-synthesis of silver nanoparticles onto cotton fabrics for broad spectrum antimicrobial activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 2121-2130, 2018.

SHARMA, V. K.; SAYES, C. M.; GUO, B.; PILLAI, S.; PARSONS, J. G. et al. Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under environmentally relevant conditions: A review. **Sci total Environ**, v. 653, p.1042-1051, 2019.

SHI, C.; GAO, J.; WANG, M.; FU, J.; WANG, D.; ZHU, Y. Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity. **Materials Science and Engineering**, v. 55, p. 497-505, 2015.

SLAWSON, R. M.; VANDYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. **Plasmid**, v. 27, n. 1, p. 72-79, 1992.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Nanopartículas de prata como agente antimicrobiano: um estudo de caso sobre *E. coli* como modelo para bactérias Gram-negativas. **Journal of colloid and interface science**, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

SRISOD, S.; MOTINA, K.; INPRASIT, T.; PISITSAK, P. A green and facile approach to durable antimicrobial coating of cotton with silver nanoparticles, whey protein, and natural tannin. **Progress in Organic Coatings**, v. 120, p. 123-131, 2018.

STOIMENOV, P. K.; KLINGER, R. L.; MARCHIN, G. L.; KLABUNDE, K. J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. **Langmuir**, v. 18, n. 17, p. 6679-6686, 2002.

TORRES, J. A. J.; LÓPEZ, J. A.; CHÁVEZ, N. R. R.; PÉREZ, J. L. H.; RAMÍREZ, J. F. S. Uso de Nanopartículas de Plata para el Desarrollo de Textiles Funcionales. **Instituto Politécnico Nacional**, 2022.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.

UENO, K.; YAMAGUCHI, T.; SAKAIRI, N.; NISHI, N.; TOKURA, S. **Advance in Chitin Science**, v. 2, n. 156, 1997.

WANG, Q.; BARNES, L. M.; MASLAKOV, K. I.; HOWELL, C. A.; ILLSLEY, M. et al. *In situ* synthesis of silver or selenium nanoparticles on cationized cellulose fabrics for antimicrobial application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 121, 2021.

WAZED, A. S.; RAJENDRAN, S.; JOSHI, M. Síntese e caracterização de quitosana e nanopartículas de quitosana carregadas com prata para poliéster bioativo. **Polímeros de carboidratos**, v. 83, n. 2, p. 438-446, 2011.

WATANABE, E.; FRONTEIRA, I. The use of antimicrobial-impregnated fabrics in health services: an integrative review. **Rev. latinoam. enferm.**, 2021.

WINDLER, L.; HEIGHT, M.; NOWACK, B. Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. **Environment international**, v. 53, p. 62–73, 2013.

XIA, W; WU, Y. Functional properties of chito-oligosaccharides. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, v. 15, n. 4, p. 297, 1996.

YOUNES, I.; SELLIMI, S.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Influência do grau de acetilação e peso molecular de quitosanas homogêneas nas atividades antibacteriana e antifúngica. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57-63, 2014.

YOUNG, D. H.; KAUSS, H. Release of calcium from suspension - cultured *Glycine max* cells by Chitosan, other polycations, and Polyamines in relation to effects on membrane permeability. **Plant physiology**, v. 73, p. 698-702, 1983.

ZHENG, L. Y; ZHU, J. F. Estudo da atividade antimicrobiana da quitosana com diferentes pesos moleculares. **Polímeros de carboidratos**, v. 54, n. 4, pág. 527-530, 2003.