

Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos

Synthesis, characterization and application of silver nanoparticles as antimicrobial agents

Fabiana Sedina Antunes¹

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil
fabi_grena@hotmail.com

Nicolle Dal'Acqua²

Universidade de Caxias do Sul, Brasil
ndacqua@yahoo.com.br

Carlos Pérez Bergmann¹

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil
bergmann@ufrgs.br

Marcelo Giovanela²

Universidade de Caxias do Sul, Brasil
mgiovan1@ucs.br

Resumo. A síntese de nanopartículas de prata (NPs Ag) tem atraído o interesse de vários pesquisadores nestes últimos anos, tanto do ponto científico como tecnológico. Essas NPs possuem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas quando comparadas ao metal em escala macroscópica, e têm sido utilizadas em aplicações tais como catálise, em dispositivos optoeletrônicos e na área médica. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo sintetizar e caracterizar NPs Ag, além de avaliar sua eficiência antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As NPs Ag foram inicialmente preparadas através da redução química de íons prata com boroidreto de sódio, na presença de citrato de sódio tribásico dihidratado. Em seguida, as mesmas foram caracterizadas por espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A avaliação da atividade antimicrobiana das NPs Ag frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi realizada com base no método de antibiograma qualitativo.

Abstract. The synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) has attracted the interest of many researchers in recent years, both from scientific and technological point of view. These NPs present unique physical, chemical and biological properties when compared to metal at a macroscopic scale, and have been used in applications such as catalysis, optoelectronic devices and medical area. In this context, the aim of this work was to synthesize and characterize Ag NPs and evaluate its antimicrobial efficiency against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Ag NPs were initially prepared by chemical reduction of silver ions with sodium borohydride in the presence of sodium citrate tribasic dihydrate. Then, they were characterized by molecular absorption spectroscopy in the ultraviolet and visible (UV-Vis) region and transmission electron microscopy (TEM). The evaluation of antimicrobial activity of Ag NPs was performed with basis on the qualitative antibiogram method against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In general, the UV-Vis spectra of colloidal solutions of Ag

¹ Departamento de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Osvaldo Aranha, 99, 90035-190, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil.

No geral, os espectros de UV-Vis das soluções coloidais de NPs Ag (18 ppm e 1000 ppm, respectivamente) foram muito similares entre si, evidenciando a presença de uma única banda centrada em aproximadamente 400 nm, que é indicativo de NPs com formato esférico. Esse resultado foi corroborado pelas análises de MET que mostraram NPs Ag com tamanhos médios de $7,3 \pm 4,3$ nm (solução coloidal de 18 ppm) e de $15,2 \pm 7,4$ nm (solução coloidal de 1000 ppm). Os antibiogramas, por sua vez, revelaram que apenas a solução coloidal de 1000 ppm apresentou atividade antimicrobiana em relação às duas bactérias testadas.

Palavras-chave: Nanotecnologia, nanopartículas de prata, agentes antimicrobianos.

NPs (18 ppm and 1000 ppm, respectively) were very similar to each other, indicating the presence of a single band centered at approximately 400 nm, which is indicative of NPs with spherical shape. This result was corroborated by TEM analysis which showed Ag NPs with average sizes of 7.3 ± 4.3 nm (colloidal solution of 18 ppm) and 15.2 ± 7.4 nm (colloidal solution 1000 ppm). The antibiograms, in turn, revealed that only the colloidal solution of 1000 ppm showed antimicrobial activity against the two bacterial strains tested.

Key words: Nanotechnology, silver nanoparticles, antimicrobial agents.

Introdução

Uma das grandes descobertas da Nanotecnologia foi o fato de que, em cada tamanho, um mesmo material pode apresentar características físicas e químicas completamente distintas (Alivisatos, 1997).

A utilização de materiais nanoestruturados está cada vez mais difundida na indústria brasileira. Percebe-se um grande interesse na utilização de nanopartículas de prata (NPs Ag), devido às suas propriedades notáveis como boa condutividade, elevado efeito catalítico, alta área superficial e excelente atividade antimicrobiana. As NPs Ag podem ser utilizadas para reduzir infecções, prevenir a colonização bacteriana em superfícies de prótese, em cateteres e materiais odontológicos, bem como na indústria de alimentos, no tratamento de água e na fabricação de tintas antibactérias (Guzmán *et al.*, 2009).

O efeito antimicrobiano da prata é reconhecido há muito anos. Na antiguidade, a mesma era utilizada no tratamento de queimaduras e como agente quimioterápico contra patologias provocadas por bactérias, como a *Staphylococcus aureus*. Após a descoberta da penicilina, o uso da prata como agente bactericida diminuiu consideravelmente. Porém, com a seleção de cepas resistentes a antibióticos, a prata voltou a despertar interesse na comunidade científica em virtude do desenvolvimento de novos antimicrobianos (Chopra, 2007).

As soluções coloidais de NPs Ag, devido à alta relação área por volume, apresentam propriedades antimicrobianas contra diversos tipos de micro-organismos, tais como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. A Medicina tem demonstrado que a pra-

ta aniquila mais de 650 agentes patogênicos e não cria resistência (Petica *et al.*, 2008). Isso acontece porque, ao entrarem em contato com a membrana celular desses micro-organismos, as NPs Ag causam danos no processo de respiração celular e permeabilidade. Além disso, as NPs Ag ligam-se ao enxofre e ao fósforo presentes no DNA, impedindo a divisão celular (Morones *et al.*, 2005; Levin *et al.*, 2009).

Novos métodos de produção de NPs Ag têm surgido, sendo os principais baseados na redução química de sais de prata em meio aquoso. As NPs Ag têm sido sintetizadas também utilizando métodos eletroquímicos, decomposição térmica, ablação a laser, irradiação por micro-ondas, processos de micelas reversas, dentre outros (Jian *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2004).

Devido às nanopartículas serem muito pequenas e termodinamicamente instáveis, torna-se necessário estabilizá-las mediante a adição de reagentes protetores ou com uma matriz polimérica. A estabilização eletrostática ocorre através de espécies carregadas, como cátions e ânions, que se adsorvem à superfície das nanopartículas. Já a estérica, ocorre através do uso de grupos volumosos (Aiken e Finke, 1999). Além disso, a escolha adequada do material de proteção também pode fornecer uma barreira para neutralizar a atração entre as nanopartículas, devido à interação das forças de van der Waals (Fonseca, 2005), evitando que as mesmas se aglomerem.

Hoje em dia, a indústria está procurando novos produtos para competir no mercado. No entanto, as NPs Ag disponíveis são caras e limitadas. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de processos de baixo custo para a produção de NPs Ag que serão utilizadas na

formulação de novos tipos de materiais bactericidas (Kim *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2010).

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo sintetizar NPs Ag pelo método da redução química, bem como caracterizar as mesmas utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), além de avaliar sua eficiência antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*).

Experimental

Materiais

Todos os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Nitrato de prata (AgNO_3) e boroidreto de sódio (NaBH_4) foram adquiridos da Merck. Citrato de sódio tribásico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foi adquirido da Sigma-Aldrich. As soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (18,2 M Ω /cm), obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore).

Síntese das nanopartículas de prata (NPs Ag)

As NPs Ag foram preparadas através da redução química de íons prata por NaBH_4 e estabilizadas com citrato de sódio tribásico dihidratado. Esse procedimento foi baseado no método descrito por Jana *et al.* (2001). O processo de preparação das NPs Ag pode ser descrito como segue: inicialmente, 50 mL de AgNO_3 0,25 mmol/L foram adicionados a 50 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mmol/L por 30 s, sob agitação magnética vigorosa e ao abrigo da luz, a $23 \pm 2,0$ °C. Imediatamente após a mistura dessas duas soluções, adicionou-se uma alíquota de 3 mL de NaBH_4 1,00 mmol/L. Em seguida, a agitação foi mantida por mais 1 min e a solução resultante (de tonalidade amarelo-ouro) foi imediatamente armazenada em frasco âmbar e ao abrigo da luz, até o momento das análises. A concentração dessa solução coloidal, em termos de NPs Ag, é de aproximadamente 18 ppm.

Além disso, foi utilizada uma solução de NPs Ag fornecida pela empresa TNS (Florianópolis, SC) com concentração de 1000 ppm. A síntese dessas NPs Ag foi realizada de maneira análoga à descrita anteriormente, alterando-se apenas a concentração e o volume das soluções utilizadas.

Caracterização das NPs Ag

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis das soluções contendo as NPs Ag foram registrados em um espectrofotômetro Thermo Scientific EVOLUTION 60, na faixa de comprimento de onda situada entre 250 e 650 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm.

As imagens de MET foram obtidas em um microscópio Jeol JEM 1200 EXII, operando com uma tensão de 80 kV. As amostras foram preparadas depositando-se 10 gotas da solução de NPs Ag em um filme de carbono amorfo (com 3,0 – 5,0 nm de espessura), sustentado em uma grade de cobre com 3,0 mm de diâmetro. O término da preparação da amostra ocorreu pela evaporação total do solvente. Os histogramas de distribuição de tamanho de partícula foram então estimados, utilizando-se o *software* Image J.

Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana das NPs Ag foi realizada com base no método de antibiograma qualitativo contra cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) no Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (LAPA) da Universidade de Caxias do Sul.

Um método adequado para avaliar a eficiência de um agente antimicrobiano consiste em medir o tamanho relativo à zona de inibição (ZOI) ao redor do agente testado. Um inóculo padrão de cada micro-organismo foi inicialmente esfregado pelo método de "Spread Plate" sobre a superfície de uma placa de Petri com o meio de cultura Mueller-Hinton, onde foram colocados papéis-filtro estéreis impregnados com as NPs Ag. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h e a 37 °C em uma estufa bacteriológica, e as ZOI formadas ao redor dos papéis-filtro foram então medidas (Valášková *et al.*, 2010).

Resultados e discussão

Caracterização das NPs Ag

Espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis

A Figura 1 mostra o aspecto visual das soluções coloidais de NPs Ag deste trabalho, nas concentrações de 18 ppm e 1000 ppm, respectivamente.

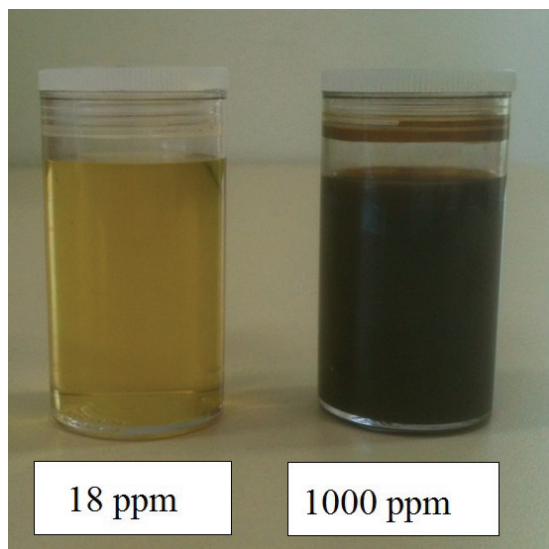


Figura 1. Aspecto visual das soluções coloidais de NPs Ag de 18 ppm e 1000 ppm.

Figure 1. Visual appearance of Ag NPs colloidal solutions of 18 ppm and 1000 ppm.

Como pode ser constatado, a cor das soluções é muito diferente, uma vez que a concentração de NPs Ag varia drasticamente de um sistema para outro. Para registrar o espectro de UV-Vis dessas soluções foi necessário diluir apenas aquela de maior concentração para que banda de máxima absorção permanecesse dentro da faixa de linearidade do espectrofotômetro.

Na Figura 2 podem ser observados os espectros de UV-Vis das soluções coloidais de NPs Ag de 18 ppm e 1000 ppm (diluição de 100 vezes). O comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) para as NPs Ag nos dois sistemas está centrado em aproximadamente 400 nm, o que indica a presença de NPs Ag com formato esférico (Noguez, 2007; Pinto *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, o aumento no tamanho das NPs resulta em um deslocamento da banda plasmônica para regiões de maior comprimento de onda, o que significa que os tamanhos das NPs Ag na solução coloidal de 18 ppm são relativamente menores do que aqueles na de 1000 ppm (Song e Kim, 2009). De acordo com a teoria de Mie, apenas uma única banda plasmônica é esperada no espectro de absorção de NPs esféricas, enquanto NPs anisotrópicas podem dar origem a duas ou mais bandas, dependendo do formato das mesmas (Klabunde, 2001).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As Figuras 3 e 4 apresentam, respectivamente, as imagens de MET das soluções coloidais de NPs Ag de 18 ppm e 1000 ppm, nas quais podem ser observadas NPs de formato esférico. Esses resultados são corroborados pela análise de UV-Vis, conforme já foi discutido anteriormente.

Os histogramas de distribuição do tamanho das NPs, por sua vez, podem ser visualizados nas Figuras 5 e 6. O diâmetro médio

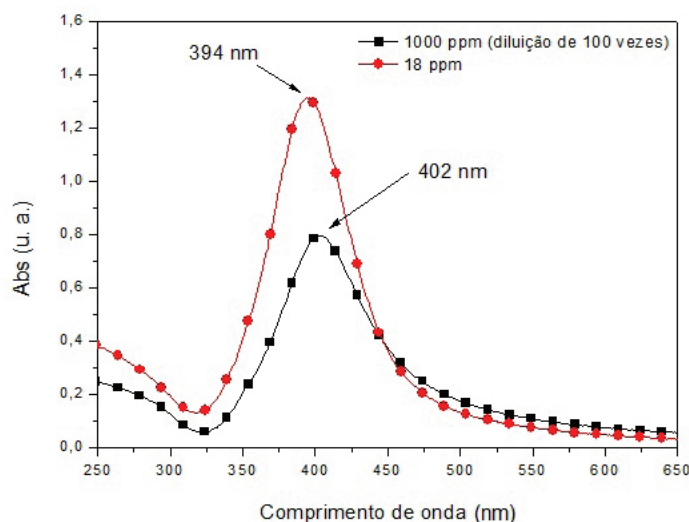


Figura 2. Espectros de UV-Vis das soluções coloidais de NPs Ag de 18 ppm e de 1000 ppm (diluição de 100 vezes).

Figure 2. UV-Vis spectra of Ag NPs colloidal solutions of 18 ppm and 1000 ppm (dilution of 100 times).

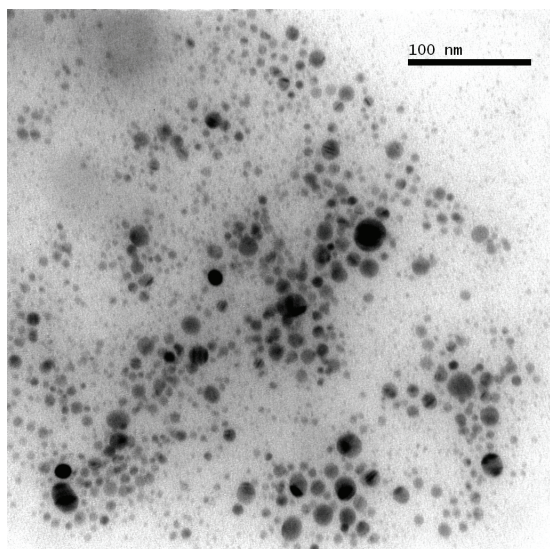


Figura 3. Imagem de MET da solução coloidal de NPs Ag de 18 ppm.

Figure 3. TEM image of Ag NPs colloidal solution of 18 ppm.

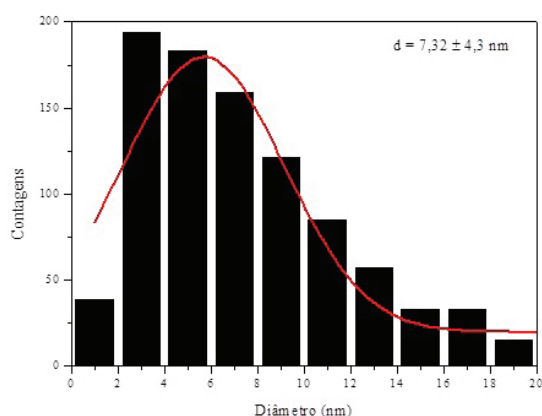


Figura 5. Histograma de distribuição do tamanho das NPs Ag obtidas a partir da imagem de MET da solução coloidal de 18 ppm.

Figure 5. Particle size distribution histogram of Ag NPs colloidal solution of 18 ppm obtained from TEM image.

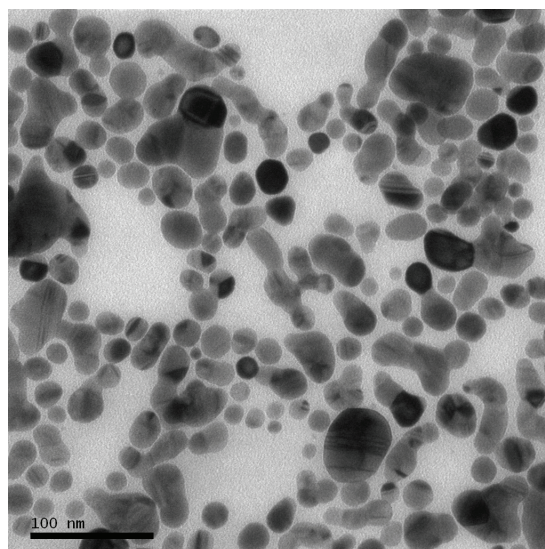


Figura 4. Imagem de MET da solução coloidal de NPs Ag de 1000 ppm.

Figure 4. TEM image of Ag NPs colloidal solution of 1000 ppm.

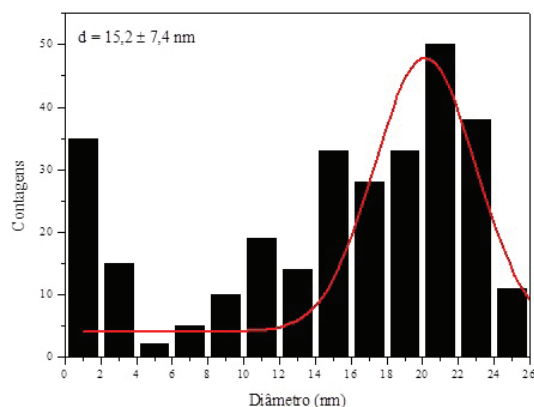


Figura 6. Histograma de distribuição do tamanho das NPs Ag obtidas a partir da imagem de MET da solução coloidal de 1000 ppm.

Figure 6. Particle size distribution histogram of Ag NPs colloidal solution of 1000 ppm obtained from TEM image.

das NPs Ag nas soluções coloidais de 18 ppm e 1000 ppm foram de aproximadamente $7,32 \pm 4,3$ nm e $15,2 \pm 7,4$ nm, respectivamente. Os λ_{max} observados nos espectros de UV-Vis da Figura 2 já demonstravam esse aumento do tamanho de partícula para as NPs Ag da solução coloidal de 1000 ppm, uma vez que a banda plasmônica já estava deslocada para a região de maior comprimento de onda (Song e Kim, 2009; Pinto *et al.*, 2010).

Avaliação da atividade antimicrobiana das NPs Ag

As Figuras 7 e 8 mostram as ZOI formadas após a realização dos ensaios com as NPs Ag da solução coloidal de 1000 ppm contra cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), respectivamente.

Como pode ser observado, existem zonas claras bem definidas ao redor dos papéis-

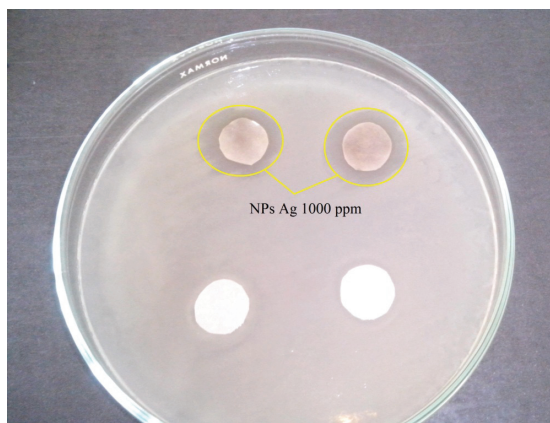


Figura 7. Teste de difusão no meio Mueller-Hinton utilizando cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Figure 7. Diffusion test in Mueller-Hinton medium using strains of *Escherichia coli* (ATCC 25923).

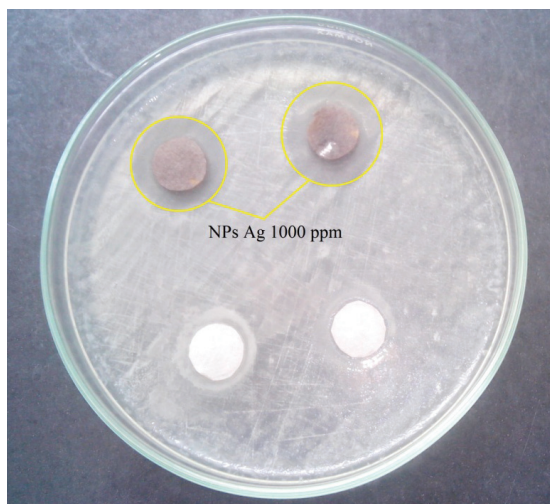


Figura 8. Teste de difusão no meio Mueller-Hinton utilizando cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Figure 8. Diffusion test in Mueller-Hinton medium using strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

filtro, onde as soluções coloidais de NPs Ag foram impregnadas. Além disso, o diâmetro médio da ZOI foi da ordem de 15 mm para a *Escherichia coli* e de 25 mm para a *Staphylococcus aureus*. As NPs Ag da solução coloidal de 18 ppm, por outro lado, não apresentaram atividade antimicrobiana.

Em geral, as bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as bactérias Gram-positivas, devido à complexidade da membrana celular

das primeiras, que acaba dificultando a entrada e consequentemente a difusão das NPs Ag para o interior desses micro-organismos (Durrán *et al.*, 2010). A baixa concentração de NPs Ag na solução coloidal de 18 ppm também pode ter contribuído significativamente para o resultado obtido nesse ensaio.

Conclusões

Neste trabalho foram sintetizadas soluções coloidais de NPs Ag pelo método de redução química, utilizando nitrato de prata e boroidreto de sódio na presença de citrato de sódio tribásico dihidratado. As soluções obtidas foram caracterizadas pelas técnicas de UV-Vis e MET, e a eficiência antimicrobiana dessas NPs foi igualmente avaliada frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

No geral, os espectros de UV-Vis das soluções coloidais de NPs Ag (18 ppm e 1000 ppm, respectivamente) foram muito similares entre si, evidenciando a presença de uma única banda centrada em aproximadamente 400 nm, que é indicativo de NPs com formato esférico. Esse resultado foi corroborado pelas análises de MET que mostraram NPs Ag com tamanhos médios de $7,3 \pm 4,3$ nm (solução coloidal de 18 ppm) e de $15,2 \pm 7,4$ nm (solução coloidal de 1000 ppm), respectivamente.

Com relação aos ensaios microbiológicos, os antibiogramas revelaram que apenas a solução coloidal de 1000 ppm apresentou atividade antimicrobiana em relação às duas bactérias testadas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*). As NPs Ag da solução coloidal de 18 ppm, por outro lado, não apresentaram atividade antimicrobiana. A baixa concentração de NPs Ag nessa solução coloidal pode ter contribuído significativamente para esse resultado.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS pelo apoio recebido e ao Laboratório de Análise e Pesquisa em Alimentos da UCS pelos ensaios microbiológicos.

Referências

- ALIVISATOS, A.P. 1997. Nanocrystals: building blocks for modern materials design. *Endeavour*, 21:56-60.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0160-9327\(97\)01018-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0160-9327(97)01018-1)

- AIKEN, J.D.; FINKE, R.G. 1999. A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **145**:1-44.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1169\(99\)00098-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1169(99)00098-9)
- CHOPRA, I. 2007. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **59**:587-590.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm006>
- DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; CONTI, R.D.; ALVES, O.L.; COSTA, F.T.M.; BROCCHI, M. 2010. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **21**:949-959.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010000600002>
- FONSECA, G.S. 2005. *Nanopartículas de irídio em líquidos iônicos: síntese, caracterização e aplicação em reações de hidrogenação catalítica*. Porto Alegre, RS. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 252 p.
- GUZMÁN, M.G.; DILLE, J.; GODET, S. 2009. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*, **2**:104-111.
- JANA, N.R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C.J. 2001. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. *Chemical Communications*, **7**:617-618.
<http://dx.doi.org/10.1039/b100521i>
- JIAN, Z.; YONGCHANG, W.; YIMIN, L. 2004. Fluorescence spectra character of silver-coated gold colloidal nanoshells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **232**:155-161.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2003.10.017>
- KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.H.; PARK, S.J.; LEE, H.J.; KIM, S.H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C.H.; KIM, Y.K.; LEE, Y.S.; JEONG, D.H.; CHO, M.H. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **3**:95-101.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- KLABUNDE, K.J. 2001. *Nanoscale materials in Chemistry*. New York, John Wiley & Sons, 287 p.
<http://dx.doi.org/10.1002/0471220620>
- LEVIN, S.C.; HOFMANN, C.; ALI, A.T.; KELLY, T.A.; MOROSAN, E.; NORDLANDER, P.; WHITMIRE, H.K.; HALAS, J.N. 2009. Magnetic-plasmonic core-shell nanoparticles. *Journal American Chemical Society - ACS Nano*, **3**:1379-1388.
<http://dx.doi.org/10.1021/nn900118a>
- MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J.L.; CAMACHO, A.; RAMIREZ, J.T. 2005. The bacterial effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, **16**:2346-2353.
<http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- NOGUEZ, C. 2007. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *The Journal of Physical Chemistry*, **111**:3806-3819.
- PETICA, A.; GAVRILIU, S.; LUNGU, M.; BURUNTEA, N.; PANZARU, C. 2008. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering B*, **152**:22-27.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mseb.2008.06.021>
- PINTO, V.V.; FERREIRA, M.J.; SILVA, R.; SANTOS, H.A.; SILVA, F.; PERREIRA, F. 2010. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, **364**:19-25.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.04.015>
- SONG, Y.J.; KIM, S.B. 2009. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **32**:79-84.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00449-008-0224-6>
- VALÁSKOVÁ, M.; HUNDÁKOVÁ, M.; KUTLÁKOVÁ, K.M.; SEIDLEROVÁ, J.; CAPKOVÁ, P.; PAZDZIORA, E.; MATEJOVÁ, K.; HERMÁNEK, M.; KLEMM, V.; RAFAJA, D. 2010. Preparation and characterization of antibacterial silver/vermiculites and silver/montmorillonites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **74**:6287-6300.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gca.2010.08.025>
- YIN, H.; YAMAMOTO, T.; WADA, Y.; YANAGIDA, S. 2004. Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. *Materials Chemistry and Physics*, **83**:66-70.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2003.09.006>

Submetido: 07/08/2013

Aceito: 21/08/2013