



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

MIRIAN MODESTO

**DESENVOLVIMENTO DE GEL DE NANOCELULOSE COM  
ÁCIDO HIALURÔNICO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
COM PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS**

---

Londrina  
2022

MIRIAN MODESTO

**DESENVOLVIMENTO DE GEL DE NANOCELULOSE COM  
ÁCIDO HIALURÔNICO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
COM PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Tischer

Coorientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M691d Modesto, Mirian.

Desenvolvimento de gel de nanocelulose com ácido hialurônico e nanopartículas de prata / Mirian Modesto. - Londrina, 2022.  
85 f. : il.

Orientador: Cesar Augusto Tischer.

Coorientador: Gerson Nakazato.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

Inclui bibliografia.

1. biopolímeros - Tese. 2. *Pseudomonas aeruginosa* - Tese. 3. nanopartículas - Tese. 4. bactericidas - Tese. I. Tischer, Cesar Augusto. II. Nakazato, Gerson. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

MIRIAN MODESTO

**DESENVOLVIMENTO DE GEL DE NANOCELULOSE COM  
ÁCIDO HIALURÔNICO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA  
COM PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Coorientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Renata K. Takayama Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Suzana Mali de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de maio de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, meu suporte, por agir e permitir que os seus propósitos se realizem em minha vida.

Ao meu amado filho Enzo, por ser meu companheiro de fé e de vida, que mesmo em tão tenra idade, me incentiva e apoia em todas as circunstâncias.

Ao prof. Dr. César Tischer, meu orientador, por compartilhar comigo seus conhecimentos e me orientar na execução deste trabalho.

Ao prof. Dr. Gerson Nakazato, meu co-orientador, por compartilhar comigo conhecimentos e ensinamentos muito além do que eu pudesse esperar. Por ser um grande parceiro e um exemplo de profissional que levarei por toda vida.

Aos professores do curso de Mestrado em Biotecnologia, que com tanta eficiência transmitiram seus conhecimentos, permitindo que essa etapa fosse concluída e me preparando para as posteriores.

A todos os amigos do curso, em especial meu colega de grupo de pesquisa Gabriel, que sempre se dispôs a ajudar em tudo que fosse preciso e a trocar conhecimentos e experiências.

A todos os profissionais dos Departamentos de Bioquímica/Biotecnologia e de Microbiologia da UEL, que em nenhum momento mediram esforços para colaborar, mostrando que toda conquista pessoal passa pelo fato de existir uma equipe de suporte que auxilia em nosso sucesso.

**“Nenhuma vocação valerá a pena, se não fores executada com tamanha dedicação e amor, para poderes ser chamada de Missão.”**

Mirian Modesto.

MODESTO, Mirian. **Desenvolvimento de gel de nanocelulose com ácido hialurônico e nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas.** 2022. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

O presente trabalho refere-se ao desenvolvimento de um gel compósito de liberação sustentada, tópico hidrofílico composto por nanocelulose, ácido hialurônico, sorbato de potássio e nanopartículas de prata. O compósito constituído entre nanocelulose e ácido hialurônico tem a característica de formar uma rede hidrofílica capaz de reter grandes quantidades de água, se tornando semelhante aos tecidos biológicos e com capacidade de incorporar agentes com finalidade específicas, dando origem a eficientes sistemas de liberação. Nanopartículas de prata, exibem um conjunto de mecanismos de ação antimicrobiana, de forma aprimorada e apresentando amplo espectro contra várias cepas de bactérias e outros patógenos, com efeito de longa duração em baixas concentrações, o que limita relativamente a toxicidade da prata para as células humanas. Neste estudo, foi avaliada a atividade antibacteriana das AgNPs quimicamente sintetizadas frente a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade antibacteriana foi avaliada utilizando técnicas de disco-difusão em ágar, microdiluição seriada em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), e curva de tempo de morte. As nanopratas foram caracterizadas pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia na Região do Ultravioleta-visível (UV-vis). Pelas imagens da MEV, se constatou que o compósito apresentou arranjo randômico, tridimensional e com preenchimento de toda a rede de nanofibrila da celulose. Pelos ensaios de atividade antimicrobiana, CIM apresentou valor de 1,5 µg/mL e efeito bactericida. O ensaio de Curva de morte constatou que o agente teve efeito bacteriostático com 1 hora de ação e em 3 horas cessou o crescimento bacteriano. O gel formulado exibiu grande potencial para aplicação como bactericida, em baixas concentrações do ativo sendo proposto como alternativa para o tratamento e controle de infecções causados por *P. aeruginosa* usando nanopartículas de prata como agente antimicrobiano.

**Palavras-chave:** biopolímeros; *pseudomonas aeruginosa*; nanoprata; bactericida.

MODESTO, Mirian. **Development of nanocellulose gel with hyaluronic acid and silver nanoparticles with antibacterial properties.** 2022. 85 p. Dissertation (Master in Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

The present work refers to the development of a hydrophilic topical, sustained-release composite gel composed of nanocellulose, hyaluronic acid, potassium sorbate and silver nanoparticles. The composite consisting of nanocellulose and hyaluronic acid has the characteristic of forming a hydrophilic network capable of retaining large amounts of water, becoming similar to biological tissues and capable of incorporating agents with specific purposes, giving rise to efficient delivery systems. Silver nanoparticles exhibit a set of mechanisms of antimicrobial action, in an Enhanced form and presenting a broad spectrum against several strains of bacteria and Other pathogens, with a long-lasting effect at low concentrations, which relatively limits the toxicity of silver to human cells. In this study, the antibacterial activity of chemically synthesized AgNPs against the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated. Antibacterial activity was evaluated using disk diffusion techniques in agar, serial broth microdilution to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), and time to death curve. The nanosilver were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Ultraviolet-Visible Region Spectroscopy (UV-vis). From the SEM images, it was found that the composite presented a random, three-dimensional arrangement and filled the entire cellulose nanofibril network. By assays of antimicrobial activity, MIC showed a value of 1.5 µg/mL and bactericidal effect. The death curve test found that the agent had a bacteriostatic effect with 1 hour of action and in 3 hours bacterial growth ceased. The formulated gel exhibited great potential for application as a bactericide, at low concentrations of the active being proposed as an alternative for the treatment and control of infections caused by *P. aeruginosa* using silver nanoparticles as an antimicrobial agent.

**Key words:** biopolymers; *pseudomonas aeruginosa*; nano silver; bactericide.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	– Estrutura química da cadeia de celulose.....	15
<b>Figura 2</b>	– Regiões cristalinas e regiões amorfas na cadeia de celulose .....	16
<b>Figura 3</b>	– Ilustração dos métodos utilizados na obtenção de nanopartículas.....	19
<b>Figura 4</b>	– Estrutura química do ácido hialurônico .....	24
<b>Figura 5</b>	– Imagens da MEV. Nanocelulose pura (A e C) e compósito formado com nanocelulose e ácido hialurônico (B e D).....	37
<b>Figura 6</b>	– Espectro de FT-IR. Nanocelulose pura (A) e compósito formado com nanocelulose e ácido hialurônico (B).....	38
<b>Figura 7</b>	– Curva de DSC. Nanocelulose pura (A) e compósito formado com nanocelulose e ácido hialurônico (B).....	39
<b>Figura 8</b>	– Espectro de UV-vis das AgNPs sintetizadas com AgNO <sub>3</sub> e arginina em solução alcalina. (A) encarte da solução de AgNPs sintetizada com arginina: KOH como agente redutor obtido a 90°C .....	41
<b>Figura 9</b>	– Espectro das amostras obtidas após titulação de arginina e KOH contra soluções de AgNO <sub>3</sub> em diferentes temperaturas.....	42
<b>Figura 10</b>	– Espalhabilidade (mm <sup>2</sup> ) da formulação do gel .....	44
<b>Figura 11</b>	– Resultado do teste de Difusão em disco. Amostras da solução de arginina (Arg) e da solução de nanopartículas de prata (AgNPs).....	45
<b>Figura 12</b>	– Curva do tempo de morte para a suscetibilidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à solução de AgNPs .....	46
<b>Figura 13</b>	– Imagem do gel constituído (Forma farmacêutica final).....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs	Nanopartículas de prata
AH	Ácido hialurônico
Arg	Arginina
CB	Celulose bacteriana
ENFC	Eletrofiliação de nanofibras de celulose
MFC	Microfibras de celulose
NCC	Nanocristais de celulose
NFC	Nanofibras de celulose
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FT-IR	Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHA	Ágar Muller-Hinton
MHB	Caldo Muller-Hinton
CIM	Concentração inibitória mínima
NCCLS	Comitê Nacional de Análises Laboratoriais
nm	Nanômetro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-vis	Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1	CELULOSE .....	15
2.2	NANOCELULOSE .....	17
2.2.1	Métodos <i>Top-Down</i> e <i>Bottom-Up</i> .....	18
2.3	NANOCELULOSE DE ORIGEM VEGETAL .....	19
2.4	HIDROGÉIS DERIVADOS DE CELULOSE .....	22
2.5	ÁCIDO HIALURONICO .....	23
2.6	NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
3.1	OBJETIVO GERAL .....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1	PREPARO DO GEL DE NANOCELULOSE .....	29
4.2	PREPARO DO GEL DE ÁCIDO HIALURONICO .....	29
4.3	SÍNTESE DAS NANOPARTICULAS DE PRATA .....	29
4.3.1	Correlação entre Temperatura e Formação de Nanopartículas .....	30
4.4	PREPARO DA FORMA FARMACÊUTICA FINAL – GEL .....	30
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE PRATA, ÁCIDO HIALURÔNICO E DE PRATA .....	31
4.5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	31
4.5.2	Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) .....	31
4.5.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	31
4.5.4	Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis) .....	32
4.5.5	Distribuição e Tamanho de Partículas .....	32
4.6	CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL DO GEL .....	32
4.6.1	Análise de Cor e Odor .....	32
4.6.2	Análise de pH .....	32
4.6.3	Análise de Aparência .....	33

4.6.4	Aspectos Morfológicos e Centrifugação .....	33
4.6.5	Análise de Densidade.....	33
4.6.6	Espalhabilidade .....	33
4.7	TESTE DE ATIVIDADES ANTIMICROBIANA .....	34
4.7.1	Cepa Bacteriana .....	34
4.7.2	Teste de Difusão em Disco.....	34
4.7.3	Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	34
4.7.4	Tempo de Morte Bacteriana ( <i>Time Kill</i> ) .....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE PRATA, ÁCIDO HIALURÔNICO E DE PRATA .....	36
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	36
5.1.2	Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) .	37
5.1.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	39
5.1.4	Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-vis) .....	40
5.1.4.1	Correlação entre Temperatura e Formação de Nanopartículas .....	42
4.1.5	Distribuição e Tamanho de Partículas.....	42
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL DO GEL.....	43
5.2.1	Análise de Cor e Odor .....	43
5.2.2	Análise de Aparência.....	43
5.2.3	Aspectos Morfológicos e Centrifugação .....	43
5.2.4	Análise de pH .....	43
5.2.5	Análise de Densidade.....	43
5.2.6	Espalhabilidade .....	43
5.3	TESTE DE ATIVIDADES ANTIMICROBIANA .....	44
5.3.1	Teste de Difusão em Disco.....	44
5.3.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	45
5.3.3	Tempo de Morte Bacteriana ( <i>Time Kill</i> ) .....	46
5.4	FORMA FARMACÊUTICA FINAL .....	47
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>

<b>ANEXOS</b> .....	57
ANEXO A – Silver nanoparticles synthesized under alkaline arginine and its antibacterial activity .....	57
ANEXO B – Depósito de patente – Título: Gel de nanocelulose com ácido hialurônico e nanopartículas de prata com propriedades antimicrobianas .....	72

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e uso de biomateriais nanoparticulados é uma tecnologia revolucionária em diversas áreas. A possibilidade de se obter um material com diferentes mecanismos de ação, apenas manipulando suas propriedades como tamanho, forma e estrutura cristalográfica, permite-se obter uma superfície extremamente mais reativa, afetando diretamente suas propriedades ópticas, magnéticas, catalíticas e antimicrobianas.

A nanocelulose é um dos biopolímeros mais estudados. Devido as propriedades químicas da sua cadeia molecular, estrutura que pode ser rearranjada, a nanocelulose realiza fortes interações com as moléculas de outros compostos associados a ela, produzindo novos materiais. Matrizes à base de nanocelulose são ideais para aplicações em tecidos biológicos. Devido suas características de ser biocompatível e não imunogênica, a nanocelulose possibilita seu uso como nanocompósitos, e pode ser aprimorada quando tornada híbrida.

O nanocompósito constituído da junção entre nanocelulose e ácido hialurônico, forma uma rede hidrofílica capaz de reter grandes quantidades de água, se tornando semelhante aos tecidos biológicos e com capacidade de incorporar agentes com finalidade específicas, dando origem a eficientes sistemas de liberação.

Estudos mostram que as nanopartículas metálicas como as de prata atraem, há milênios, significativo interesse por suas propriedades funcionais, principalmente relacionadas a atividade antimicrobiana. A prata em nanoescala, exibe um conjunto diversificado de mecanismos de ação de forma aprimorada, devido ao aumento da sua área de superfície e potencial de alto alcance, apresentando amplo espectro contra várias cepas de bactérias e patógenos, com efeito de longa duração em baixas concentrações, o que limita relativamente a toxicidade da prata para as células humanas.

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de uma formulação tópica hidrofílica, com compostos na escala nanométrica, constituído por um sistema de liberação formado por nanocelulose com ácido hialurônico e tendo nanopartículas de prata como agente antimicrobiano.

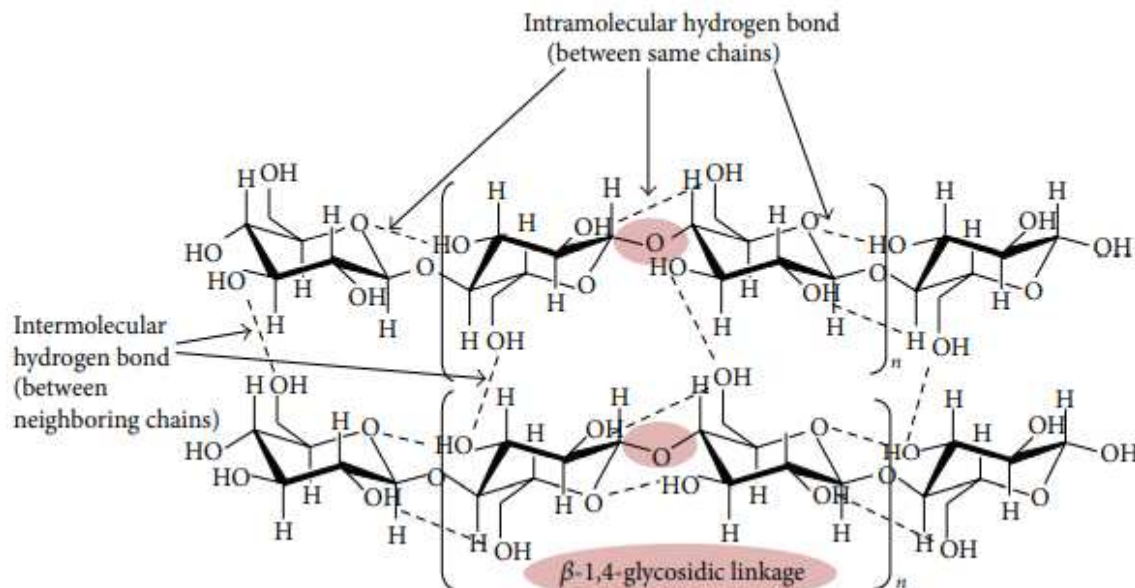
A composição se baseia em um gel, com propriedades interessantes para a finalidade do produto, como estabilidade, poder residual, fácil aplicação e elevada ação bactericida em baixas concentrações do agente

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CELULOSE

A celulose é um biopolímero renovável, biodegradável e de baixo custo, geralmente derivado de plantas lignocelulósicas, animais ou bactérias. É considerado o mais abundante biopolímero com estrutura de cadeia longa e linear, ligadas e reunidas em estruturas hierárquicas de microfibrilas, que lhe confere excelente resistência e rigidez (SHARMA et al., 2019)

Quimicamente, apresenta cadeia linear, composta por hidrogênio, oxigênio e carbono na forma de  $\beta$ -D-glucopiranoose (extremidade redutora), ligado por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (extremidade não redutora) que formam celobiose. Cada componente de glicose anidra tem um grupo de hidroxila primário e dois grupos hidroxila secundários em C6, e em C2 e C3, respectivamente (Figura 1) (CHOUDHURY et al., 2020).

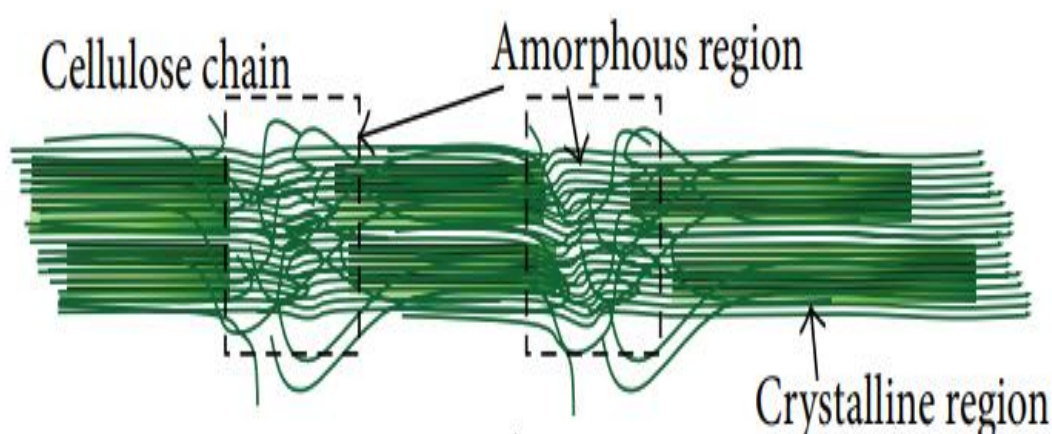


**Figura 1** – Estrutura química da cadeia de celulose

Fonte: LEE et al. (2014).

Nas fibras da planta, a intensa rede de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila de cadeias adjacentes faz com que a celulose se organize de forma hierárquica, na forma de microfibrilas que se agregam formando estruturas que são mantidas juntas para construir as fibras. As microfibrilas apresentam dimensões

nanométricas, com um diâmetro geral de cerca de 3-4 nm, e são compostos de regiões cristalinas altamente ordenadas e regiões amorfas desordenadas (Figura 2). As regiões cristalinas são regiões em que as cadeias de celulose estão ordenadas, o que lhe exerce rigidez e força, enquanto o arranjo desordenado (“emaranhado”) formado na região amorfa, confere flexibilidade ao material (AMORIM et al., 2020; CHOUDHURY et al., 2020; FRAZIER et al., 2020).



**Figura 2** – Regiões cristalinas e regiões amorfas presentes na cadeia de celulose.  
Fonte: LEE et al. (2014).

Plantas e algas são as principais fontes naturais de materiais lignocelulósicos, visto serem os constituintes de suas paredes celulares, além disso, há materiais lignocelulósicos abundantemente disponíveis na natureza na forma de madeiras, fibras vegetais e gramíneas, compostos por cerca de 35-50% de celulose, 10–25% de lignina e 20–35% de hemiceluloses (CHOUDHURY et al., 2020).

Com uma produção anual estimada em 1.014 toneladas, e com maioria de origem vegetal, a celulose é amplamente utilizada para a produção industrial. A possibilidade de a celulose se converter em materiais nanoescala (nanocelulose) através de vários métodos físico-químicos, possibilitou para as comunidades científicas explorarem propriedades e aplicações potenciais desses nanomateriais. Nos últimos 10 anos, avanços significativos foram obtidos na produção de biopolímeros a base de celulose, com buscas a novas utilizações. O desenvolvimento de processos ecológicos e sustentáveis voltados ao uso da celulose, vem movendo pesquisas na tentativa de reduzir a dependência de recursos fósseis como o petróleo,

visto que, apesar dos derivados de petróleo possuírem um custo baixo, não são biodegradáveis (AMORIM et al., 2020; CHOUDHURY et al., 2020; SHARMA et al., 2019).

A ampla disponibilidade da celulose e suas excelentes propriedades mecânicas e de biodegradabilidade, sem apresentar efeitos adversos na saúde e ao ambiente (considerados biopolímeros não imunogênicos), fazem com que a celulose e seus derivados nanoparticulados apresentem potencialidade de aplicação nas áreas fármaco-químicas e de saúde, por meio do desenvolvimento de hidrogéis, aerogel, adsorventes e biomateriais/formulações para a engenharia biomédica e tecidual (CHOI et al., 2020; FRAZIER et al., 2020; SHARMA et al., 2019).

## **2.2 NANOCELULOSE**

A nanocelulose é um dos materiais verdes mais promissores dos tempos modernos devido às suas significantes propriedades de baixa densidade, não abrasividade, combustibilidade, não toxicidade, renovabilidade e abundância. Ainda, as nanoceluloses apresentam baixo custo quando comparado a outros polímeros sintéticos (BACAKOVA et al, 2019; SHARMA et al., 2019).

A estrutura química de todas as celuloses e nanocelulose são iguais, podendo variar nas propriedades físico-químicas e reológicas, dependendo do método de desintegração usado, extensão da degradação da celulose, fibra e comprimento da cadeia de celulose (grau de polimerização), cristalinidade e fonte de matéria-prima lignocelulósica (AMORIM et al., 2020; CHOUDHURY et al., 2020; SHARMA et al., 2019).

Os nanomateriais de celulose podem ser obtidos por fontes vegetais, nanocristais de celulose (NCC), nanofibras de celulose (NFC) e microfibras de celulose (MFC), por via bacteriana (Nanocelulose Bacteriana - CB) e por Eletrofiação de nanofibras de celulose (ENFC) (CHOUDHURY et al., 2020).

### 2.2.1 Rotas de síntese de nanopartículas

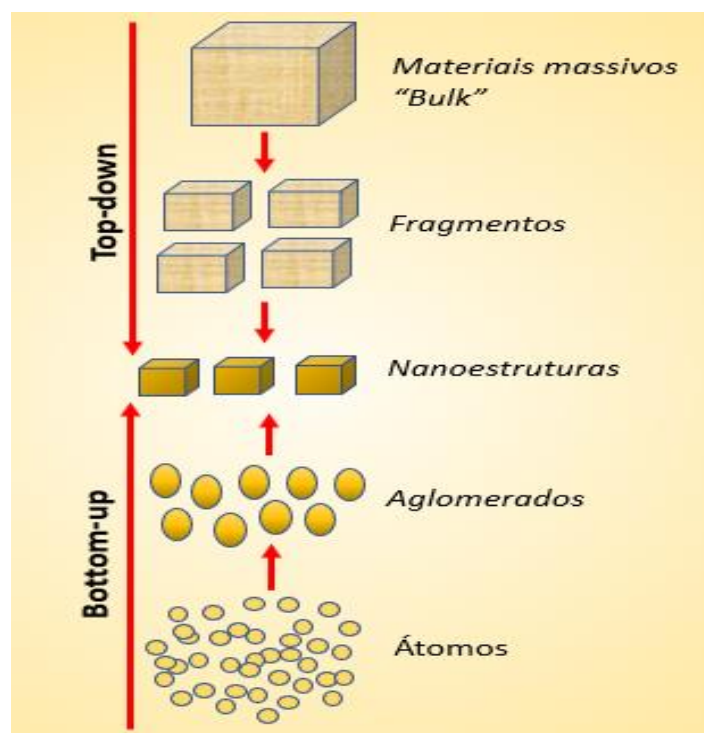
As rotas de síntese existentes para a obtenção de nanopartículas podem ser agrupadas em métodos do tipo *Top-Down* “de cima para baixo” ou do tipo *Bottom-up* “de baixo para cima”.

Os métodos *de* “cima para baixo” são utilizados em processos mecânicos, físicos, químicos ou enzimáticos para redução de escala de materiais massivos, denominados “*bulk*”, o que gera uma redução progressiva até que a nanoescala seja atingida. Pelo método “de baixo para cima” as nanopartículas são constituídas por agrupamentos de átomos ou moléculas individuais, formados a partir de processos de síntese química ou física (Figura 3) (MEDEIROS, 2019).

Os processos *bottom-up* apresentam vantagens em relação aos processos *top-down* visto apresentarem melhor controle do tamanho da partícula obtidas, sendo necessários aplicar menos energia cisalhante ou de produtos químicos. Ainda, o processo viabiliza a construção de nanoestruturas complexas, que dificilmente seriam reproduzidas por técnicas *top-down* (MEDEIROS, 2019).

Ao serem sintetizadas em meio líquido, as nanopartículas constituem sistemas coloidais dentro de um meio dispersante e têm sua estabilidade relacionada intimamente com as interações entre a fase dispersa e o meio. Os mecanismos de estabilização de nanopartículas são por fenômenos eletrostáticos ou estéricos e a escolha do estabilizante adequado é fundamental, pois contribuirá para a estabilidade, solubilidade, reatividade e até mesmo, no tamanho e formato das nanopartículas durante a síntese (FERNANDES, 2014; MEDEIROS, 2019).

NA estabilização eletrostática ocorre a interação entre moléculas carregadas na superfície de forma que as nanopartículas são repelidas. Na estabilização estérica, ocorre a adsorção de surfactantes ao seu redor das nanopartículas, as cadeias sobre sua superfície impedem a aproximação das partículas dispersas, evitando sua aglomeração (GARCIA, 2011).



**Figura 3** - Ilustração dos métodos utilizados na obtenção de nanopartículas.  
Fonte: Próprio autor.

### 2.3 NANOCELULOSE DE ORIGEM VEGETAL

Diferentes matérias-primas podem ser usadas para obter nanocristais, nanofibras e microfibras de celulose. Entre as fontes de matéria-prima, resíduos agroindustriais vegetais, se destacam e se mostram mais promissores, devido as grandes quantidades e renovabilidade (AMORIM et al., 2020).

A Nanocelulose vegetal apresenta propriedades vantajosas, como boa resistência mecânica e menor impacto ao meio ambiente. Possui baixo grau de cristalização quando comparada a outras celuloses obtidas de outras fontes, mas possui um grau alto de polimerização, o que tende a aumentar sua cristalinidade e sua resistência mecânica. O tamanho das nanopartículas dependerá de vários fatores, como a fonte de fibra, método de preparação, natureza, tempo, temperatura e a concentração de ácido usados na técnica de extração (AMORIM et al., 2020; BALEA et al., 2019).

Vários processos mecânicos, químicos ou de degradação enzimática podem ser utilizados na celulose vegetal para fragmentação de sua estrutura e obtenção com

espessura nanométrica (MEDEIROS, 2019).

Para a produção, a matéria-prima utilizada deve ser pré-tratada para remover os componentes não celulósicos, como a lignina e hemicelulose e as etapas de pré-tratamento mais comuns são moagem, polpação e branqueamento, além das etapas de pós-hidrólise dos nanocristais que são usados para remover o ácido residual por meio de centrifugação e diálise, resultando em suspensões aquosas. A purificação química envolve extração alcalina e branqueamento. Devido à sua estrutura hierárquica semicristalina, uma estratégia de desconstrução química ou mecânica de cima para baixo pode ser usada para extrair nanopartículas naturalmente (AMORIM et al., 2020).

As técnicas de modificação da nanocelulose, tanto de superfície quanto química, são utilizadas para introduzir porções carregadas ou hidrofóbicas, que reguladas na química da própria nanocelulose ou pela introdução de certos grupos funcionais em sua superfície, são capazes de transformar moléculas simples em misturas de polímeros mais complexas ou compósitos, aumentando significativamente seu potencial para uma ampla gama de aplicações e melhorando as propriedades mecânicas (AMORIM et al., 2020).

Os grupos hidroxilas podem ser modificados por grupos carboxílicos, sulfonatos, fosfatos, tiol, aminos e amidas para que ocorra a ligação do metal ou corante por meio de várias abordagens, entre elas enxerto, esterificação, eterificação, halogenação, ritmo oxidação, cationização, fosforilação, carboximetilação, sulfoetilação, sulfonação, aminoguanidina, ozonização e funcionalidade tiol (PHAN et al., 2021).

Morfologicamente, as nanoestruturas são divididas em nanofibrilas, nanofibras, nanocristais (*nanowhisker*), nanobastões e nanobolas e são obtidas de acordo com o tipo de matéria-prima (Tabela 1). Todas as nanoestruturas apresentam as importantes propriedades da celulose (AMORIM et al., 2020; BACAKOVA et al., 2019; SHARMA et al., 2019).

**Tabela 1.** Classificação Morfológica das estruturas de nanocelulose com respectivas origens.

<b>ESTRUTURAS</b>	<b>ORIGEM</b>
<b>Nanofibrilas</b>	<b>Derivados de madeira</b>
<b>Nanofibras</b>	<b>Eletrofiação – Acetato de celulose Isolado de abacaxi</b>
<b>Nanowhiskers</b>	<b>Pasta kraft de pinho Kenaf bast (Juta)</b>
<b>Nanocristais</b>	<b>Derivado do algodão</b>
<b>Nanorods</b>	<b>Derivado da grama</b>
<b>Nanoballs</b>	<b>Derivado de madeira</b>
<b>Nanoplaquetas</b>	<b>Derivado de agave</b>

**Fonte:** Adaptado de BACA KOVA et al. (2019).

As nanoceluloses de origem vegetal podem ser incorporadas em alguns compósitos com altas temperaturas, sem sofrer degradação. Nanofibras de celulose e nanocristais de celulose atraíram grande interesse como agentes de reforço para o desenvolvimento de nanocompósitos com matrizes poliméricas. Como em todos os materiais compósitos, as propriedades finais dependem da interação entre a matriz e os nanocarbonos. O caráter hidrofílico da celulose é o fator que contribui para o amplo uso de matrizes solúveis em água na produção de nanocompósitos baseados em nanocargas (AMORIM et al., 2020; BALEA et al., 2019).

## 2.4 HIDROGÉIS DERIVADOS DE CELULOSE

Os hidrogéis são matrizes poliméricas tridimensionais capazes de reter grandes quantidades de água, característica que os torna semelhantes aos tecidos biológicos. As ligações cruzadas físicas e químicas são fundamentais para a construção de uma rede hidrofílica na qual produtos e agentes também podem ser incorporados, dando origem a sistemas de liberação ou até mesmo a novos materiais. Hidrogéis são estudados com foco no desenvolvimento de materiais para serem aplicados em soluções biotecnológicas inovadoras (VALLE et al., 2017; WANG et al., 2020).

Os grupos funcionais  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH$ ,  $-OH$ ,  $-CONH_2$  e  $SO_3H$  são responsáveis pela propriedade hidrofílica dos hidrogéis e dos biopolímeros e a capacidade dos hidrogéis de incorporar unidades e estabelecer ligações de hidrogênio merecem atenção. Moléculas podem ser organizadas em fibras semelhantes a polímeros que se tornam emaranhadas e constituem uma matriz contínua que retém o solvente por tensão superficial. Uma matriz heterogênea pode ser obtida com agregação de superestrutura hierárquica e criar dimensões a partir do nanométrico à escala micrométrica (RELLEVE et al., 2021; VALLE et al., 2017).

Um hidrogel adequado para aplicações deve ser solúvel em meio aquoso e ter uma transição rápida sol-gel, sob condições fisiológicas e sem liberar subprodutos tóxicos ou prejudicar ao tecido circundante. Em geral, os hidrogéis são projetados com grupos funcionais sensíveis a estímulos externos como pH, temperatura e luz (VALLE et al., 2017).

A celulose, devido a suas propriedades, justifica o desenvolvimento de grande número de aplicações com hidrogéis. Quimicamente, a cadeia molecular da celulose pode ser visualizada como uma estrutura de conformação rígida que pode ser arranjada, dando origem a materiais fibrosos cristalinos e suas fortes interações de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares encontradas nas estruturas cristalinas, podem ser utilizadas para produzir os hidrogéis em matrizes à base da própria celulose ou para uso de compósitos incorporando nanocelulose (WANG et al., 2020).

Os compósitos são materiais constituídos por pelo menos duas fases, em que uma delas se dispersa e a outra é a matriz. Juntas formam uma rede tridimensional com propriedades únicas, diferente das propriedades das fases isoladas (MEDEIROS, 2019). Compósito com matriz de celulose na forma de hidrogel, são ideais para aplicações em tecidos e podem ser aprimoradas tornadas híbridas com outros

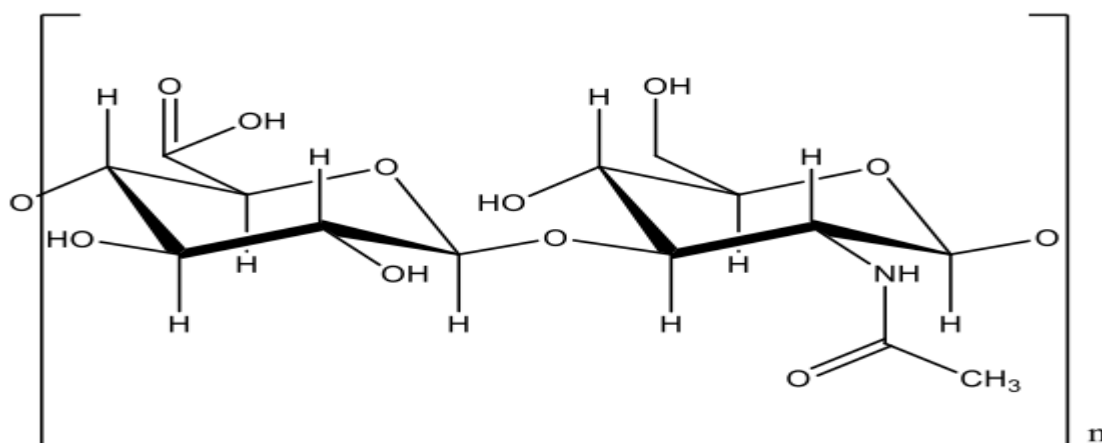
componentes como, por exemplo, o ácido hialurônico. Contudo, os hidrogéis à base de celulose têm como principal limitação a baixa solubilidade da celulose em água e na maioria dos solventes orgânicos devido à estrutura ligada por hidrogênio (VALLE et al., 2017; WANG et al., 2020).

Como solução para o problema da solubilidade, a celulose pode sofrer modificação química, pela conversão dos grupos hidroxilas em grupos éter e catiônico, porém, as propriedades finais podem ser alteradas negativamente. Pesquisas tem se concentrado na dissolução direta da celulose em solventes não tóxicos, como os sistemas aquosos alcali/ ureia, possibilitando a preparação de membranas e hidrogéis a partir desses meios (VALLE et al., 2017; WANG et al., 2020).

Os Hidrogéis podem ser preparados pela reticulação de soluções aquosas de éteres de celulose - Metilcelulose (MC), etilcelulose (EC), carboximetilcelulose de sódio (NaCMC) ou hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Dentre estes, Metilcelulose é ideal para a preparação de hidrogéis termorresponsivos devido ao seu equilíbrio hidrofóbico-hidrofílico, que dá origem a uma expansão das cadeias moleculares por pequenas mudanças de temperatura (VALLE et al., 2017).

## 2.5 ÁCIDO HIALURONICO

O Ácido Hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de ocorrência natural, composto de unidades de dissacarídeo repetidas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina (Figura 4). É um dos glicosaminoglicanos da matriz celular, podendo ser também encontrado na matriz extracelular, matriz pericelular e intracelular. Nos vertebrados, as maiores concentrações de AH são encontradas em tecidos conectivos, como a crista de frango e cartilagem nasal, no cordão umbilical e fluido sinovial. Tem a função de preencher os espaços entre as células, agindo como um componente estrutural. Comercialmente, o AH é produzido com base em dois processos principais, a extração de tecidos animais e por fermentação microbiana usando cepas bacterianas e apresentam a mesma estrutura química, podendo diferir apenas na massa molar (OLIVEIRA, 2017; RELLEVE et al., 2021).



**Figura 4** – Estrutura Química do Ácido Hialurônico  
 Fonte: OLIVEIRA (2017).

É um glicosaminoglicano aniônico biologicamente seguro e altamente compatível com vários tipos de tecido, com capacidade de infiltrar-se no estrato córneo e atingir células na derme, apesar de sua alta hidrofiliabilidade e grande tamanho molecular. O mecanismo exato da infiltração transdérmica do HA não é claramente entendido, porém, a infiltração por vias intercelulares lipídicas, devido à anfifilicidade, são amplamente pesquisadas e relatadas como sendo um carreador que pode ser topicamente usado para entrega às células na derme (KIM et al., 2020).

Os materiais à base de HA são ideais para a construção de hidrogéis e são usados como um único ingrediente ativo ou em combinação com outros ativos, sendo encontrado na maioria das formulações. Por ser encontrado como um componente endógeno, cria uma rede viscoelástica que preenche os espaços e por sua natureza hidrofílica, tem forte capacidade de ligação com a água, tendo um efeito de enchimento imediato. Além disso, o HA é altamente biocompatível, biodegradável e aumenta a fixação e proliferação celular (FONSECA et al., 2021; RELLEVE et al., 2021).

Os hidrogéis a base de nanocelulose e HA podem ser sintetizados de acordo com as necessidades dos tecidos e controlando as propriedades de densidade de reticulação, cadeias de estrutura, porções de superfície e grupos funcionais. Ao se utilizar mais de um polímero em uma rede de gel, há benefícios adicionais como o biomimetismo de componentes, controle de síntese, propriedades mecânicas e biológicas do gel, em comparação com o uso de um único biopolímero. Dessa forma,

a combinação da estrutura da nanocelulose com as características do HA cria uma ferramenta multifuncional ideal para formulações (FONSECA et al. 2021; JANARTHANAN et al., 2020).

Os compósitos constituídos, podem ainda ser ajustados com base na concentração, grau de metilação e concentração de sal, de modo que se crie condições fisiológicas mais adequadas para aplicação dos hidrogéis. A modificação química da celulose permite que a estrutura química seja ajustada para exibir características quanto a elasticidade, compressão, mecânica, força e viscosidade, alterando as propriedades térmicas e de resistência do material (FONSECA et al., 2021; RELLEVE et al., 2021).

## 2.6 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A prata, juntamente com o ouro e o cobre, corresponde aos primeiros metais descobertos pelo homem, sendo descoberto aproximadamente em 4000 a.C. Antes mesmo do entendimento de que os micróbios eram os agentes causadores das infecções, a prata teve sua ingestão empiricamente motivada para tratamento de doenças e infecções (aproximadamente 1.000 a.C), pois àquela época, sua eficácia contra infecções já era conhecida. Seu uso ocorreu nas mais variadas aplicações, desde recipientes para líquidos, moedas, suturas e soluções contra agentes microbianos (MEDEIROS, 2019).

Nanopartículas metálicas e semicondutoras possuem propriedades físicas e químicas dependentes de seu tamanho e forma. A redução do tamanho a dimensões nanométricas leva os materiais e possuem comportamento intermediário entre o *bulk* e o molecular. Outra propriedade relacionada com a diminuição dos tamanhos das partículas é o aumento da sua área superficial, o que melhora a eficiência em aplicações dependentes de sítios superficiais (OTUBO, 2005).

O uso da prata (Ag) em sua forma metálica ou em soluções de sais de prata (óxido, brometo, cloreto e iodeto) é bastante diversificada. O estudo da relação entre o tamanho da partícula e os efeitos sobre suas propriedades antimicrobianas se deram a partir de 1924, quando foram introduzidos estudos sobre a síntese e estabilização de coloides por processos eletrolíticos, capazes de obter partículas com dimensões entre 0,1 e 0,001  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Inúmeras técnicas foram estabelecidas para a síntese de AgNPs, como redução química, fotoquímica, eletroquímica, irradiação,

térmica, biológica e microemulsão. Entre eles, a redução química é o método mais adotado devido à sua abordagem concisa e direta (BUNDJAJA et al., 2021; MEDEIROS, 2019; SOFI et al., 2021).

Comparado à sua forma metálica pura, a Ag em nanoescala exibe uma ação antibacteriana aprimorada, devido ao aumento da sua área de superfície e potencial de alto alcance, com amplo espectro e efeito de longa duração contra vários microrganismos (BUNDJAJA et al., 2021; SOFI et al., 2021).

A busca por novos compostos utilizando nanopartículas metálicas para combater microrganismos, se baseia no fato de que a ação antimicrobiana das nanopartículas pode ocorrer por mecanismos diversificados. São capazes de inibir seletivamente as vias metabólicas, induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e matar as bactérias multirresistentes (DIAS et al., 2021; NISHIO, 2019).

Por apresentarem um conjunto diversificado de mecanismos de ação, a obtenção de resistência às nanopartículas pelos microrganismos torna-se muito difícil. As formulações com focos na escala nanométrica têm mostrado melhor eficácia que os fármacos convencionais por possibilitarem a entrega direcionada do agente aos locais de infecção com liberação do composto de forma continuada e controlada (DIAS et al., 2021).

O uso indiscriminado pelo seu uso medicinal, na forma de prata coloidal, deu origem à doença Argiria. Essa doença consiste na deposição acumulativa sobre a pele e em outros tecidos humanos e leva a alteração da pigmentação da pele, deixando-a na cor azul. Mesmo em casos de Argiria crônica, não há registros de alterações patológicas nos órgãos afetados ou alterações na fisiologia dos pacientes. A utilização medicinal da prata somente perdeu adesão após o surgimento dos antibióticos em 1940, motivada pela sua utilização na Segunda Guerra Mundial (MEDEIROS, 2019).

Estudos mostram que os íons  $Ag^+$ , liberados pelas nanopartículas (AgNPs), possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana em baixas concentrações, o que limita relativamente a toxicidade da prata iônica e metálica para as células humanas. A eficácia antimicrobiana está diretamente relacionada ao tamanho e a forma das nanopartículas e pelo fato de a prata possuir área superficial aprimorada e maior condutividade elétrica e térmica, a torna um excelente componente catalisador (BASTUS et al., 2014).

O resultado satisfatório da utilização de um hidrogel de nanocelulose com nanopartículas de prata (AgNPs) como agente antimicrobiano, envolve a dissolução

da cadeia de celulose e a formação de uma rede tridimensional via ligação cruzada, que permite a ligação de um grande número de AgNPs à superfície do gel. A tendência de as AgNPs formar agregados é um problema que pode diminuir sua eficiência, contudo, a integração das AgNPs à nanocelulose, impede a formação desses agregados, obtendo uma formulação com elevado potencial antimicrobiano (BUNDJAJA et al., 2021).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver gel de nanocelulose com ácido hialurônico incorporado com nanopartículas de prata com ação antibacteriana.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar gel de nanocelulose microfibrilada e gel de ácido hialurônico;
- Sintetizar nanopartículas de prata;
- Caracterizar as nanopartículas de celulose, ácido hialurônico e de prata;
- Desenvolver formulação tópica em gel (compósito), utilizando nanocelulose, ácido hialurônico e nanoprata;
- Caracterizar o gel tópico formulado;
- Avaliar a eficácia bactericida do gel utilizando cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PREPARO DO GEL DE NANOCELULOSE

A nanocelulose foi obtida comercialmente pré-ativada em pasta (2%) e certificada da marca Exilva<sup>®</sup>. A dispersão ocorreu em fase aquosa no início da etapa de processamento. Quando totalmente dispersa, a nanocelulose possui funcionalidade de gel tixotrópico, sendo necessário aplicar cisalhamento. A concentração do produto foi de 0,2 g/mL. Após dispersão foi adicionado Sorbato de Potássio como conservante na concentração de 0,02 g/mL.

Para um alto cisalhamento, utilizou-se de um homogeneizador estator-rotor de alta velocidade de agitação do tipo Ultra Turrax, a 10.000 rpm por cerca de 10 minutos.

### 4.2 PREPARO DO GEL DE ÁCIDO HIALURÔNICO

O ácido hialurônico foi preparado utilizando-se de ácido hialurônico comercial (Shandong Focuschem Biotech Co, Ltda) numa composição de suspensão (1%) e com concentração do produto de 0,1 g/mL. Inicialmente o produto foi diluído em água ultrapura e homogeneizado em estator-rotor de alta velocidade de agitação do tipo Ultra Turrax, em 10.000 rpm por aproximadamente 5 minutos, até consistir em gel.

### 4.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese para obtenção das nanopartículas de prata (AgNPs) foi realizada pelo método de redução química dos íons prata (Ag) em solução, utilizando o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (0,0618 mol/L) como agente precursor, a Arginina (Arg) (0,1236 mol/L) como agente redutor e o hidróxido de potássio (KOH) (0,309 mol/L) como agente carreador. A razão molar de  $[\text{AgNO}_3]:[\text{Arg}]:[\text{KOH}]$  é de 1:2:5.

Primeiramente, 20 ml de solução redutora foram preparadas dissolvendo, de forma concomitante, contendo de 0,41 a 0,45 g de Arg (0,1236 mol/L) e de 0,30 a 0,35 g KOH (0,309 mol/L) em água deionizada. Outra solução de 25 mL foi preparada dissolvendo de 0,20 a 0,30 g de  $\text{AgNO}_3$  (0,0618 mol/L) em água deionizada. A solução de Arg/KOH permaneceu em agitação magnética constante e aquecimento em balão volumétrico em temperatura de 90°C (SHANKAR, et al., 2015). A partir de então,

iniciou-se o processo de titulação da solução, com fluxo de 10 mL/h, por cerca de 120 minutos até atingir cor laranja avermelhado. O tamanho das AgNPs foi aferido pela absorvância plasmônica por UV-vis na faixa de 400 nm.

#### **4.3.1 Correlação entre temperatura e formação de nanopartículas.**

Para averiguar a influência da temperatura durante a síntese das nanopartículas, foi realizada uma curva crescente de temperatura. Cada síntese experimental ocorreu em temperatura constante e sob os parâmetros molares acima descritos no item 4.3 para produção das soluções. No entanto, a temperatura fora diferente entre sínteses, partindo de 10°C até 90°C, com intervalos de 20°C.

Como intuito comparativo entre metodologias de redução da prata, além do método de arginina aqui utilizado para síntese, realizou-se também o método de redução com citrato de sódio (GARCIA, 2011). Previamente foi preparado uma solução de nitrato de prata (61,8 mmol/L), onde 1 mL dessa solução foi diluída em 100 mL de água destilada. Em seguida, foi preparado uma solução dissolvendo 0,2730g de citrato de sódio tribásico (18,54 mmol/L) em 50mL de água destilada.

A solução redutora de citrato de sódio foi transferida para balão de fundo redondo, onde permaneceu sob agitação magnética e temperatura constante de 90°C. Foi titulada com nitrato de prata até atingir um volume de 20 mL e em seguida foi caracterizada por UV-vis.

#### **4.4 PREPARO DA FORMA FARMACÊUTICA FINAL – GEL**

O preparo do gel, em sua formulação final ocorreu em quatro etapas:

Etapa 1 - Primeiramente o gel de nanocelulose foi preparado conforme descrito pelo fornecedor. Diluiu-se aos poucos o total em gramas do composto nanocelulose (0,2 g/mL), mais o total em gramas do conservante sorbato de potássio (0,002 g/mL), adicionando-se o total de água sob agitação constante, através do emprego de um Ultra Turrax em velocidade de 10.000 rpm até formação de gel consistente.

Etapa 2 - Referiu-se à dissolução do ácido hialurônico. Diluiu-se aos poucos o total em gramas do ácido hialurônico (0,01 g/mL) em água sob agitação constante, através de um Ultra Turrax em velocidade de 10.000 rpm até formação de gel.

Etapa 3 - Na terceira etapa, ocorreu a homogeneização dos dois géis (etapa 1

e etapa 2) utilizando-se de Ultra Turrax a 10.000 rpm por aproximadamente 5 minutos, constituindo a matriz de liberação (nanobiocompósito).

Etapa 4 - Refere-se à incorporação do composto ativo (nanopartículas de prata) ao gel obtido na etapa 3 (matriz de liberação). Adicionou-se o volume total do composto ativo 2  $\mu\text{L}$  que foi homogeneizado de forma manual com auxílio de bastão de vidro.

#### **4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE NANOCELULOSE, ÁCIDO HIALURÔNICO E DE PRATA.**

##### **4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Uma pequena porção da amostra foi espalhada sobre lamínula (pedaço em torno de 1  $\text{cm}^2$ ) e passou por processo de secagem em sala com umidade e temperatura controladas em 20°C por 48 horas. A lamínula com a amostra foi fixada sobre "Stub" contendo fita de carbono dupla face. A amostra recebeu uma camada de ouro de aproximadamente 20 nm de espessura sobre a superfície por meio do equipamento Sputter Coater marca Bal-Tec, modelo SCD 050 e foi analisado em microscópio eletrônico marca Philips, modelo: Quanta 200.

##### **4.5.2 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)**

Uma porção da amostra (50 g) foi disposta em placa de Petri e submetida a secagem natural por 48 horas. Após secagem completa, houve a constituição de um filme que foi triturado e prensado por meio de prensa hidráulica, formou-se pastilhas com KBr e foram realizadas leituras de transmitância com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  na faixa de absorção de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Foi utilizado o espectrofotômetro de infravermelho da marca Bruker-Vertex 70, equipado com acessório ATR com cristal Gê 45°. As imagens foram processadas utilizando-se o software OriginPro 9.5.

##### **4.5.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As análises foram realizadas em um calorímetro Shimadzu DSC 60, no

intervalo de temperatura de 25 a 450°C, utilizando-se de cápsulas de alumínio seladas hermeticamente, com massa de amostras de aproximadamente 2 mg, razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50mL/min.

#### **4.5.4 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)**

Os espectros visíveis foram adquiridos com um espectrofotômetro marca Jenway 6705. Uma amostra da solução de AgNPs foi diluída em água deionizada na proporção de 1:10 (v/v) e submetida a análise espectral em temperatura ambiente na faixa de 200 a 600 nm com 0,1 nm de intervalo entre os pontos.

O alcance do diâmetro das nanopartículas formadas foi baseado na metodologia descrita por SOLOMON, et al 2007.

#### **4.5.5 Distribuição de tamanho de partículas**

A distribuição de tamanho de partícula (PSD) das AgNPs foi analisada por (Zeta-APS, Matec Applied Sciences, EUA). As medidas foram realizadas em amostra concentrada (3%), temperatura de 26°C por meio de atenuação acústica (dB/cm) vs. frequência sonora (1 a 100 MHz) de dispersão coloidal.

### **4.6 CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL DO GEL**

#### **4.6.1 Análise de cor e odor**

A análise de cor da formulação foi realizada por Colorimetria, através de comparação visual, sob condições de luz branca. A análise visual da cor da amostra foi realizada com 3,0 g da amostra acondicionada em vidro relógio, colocada sobre fundo branco e/ou preto.

O odor da amostra foi avaliado de forma olfativa direta.

#### **4.6.2 Análise do pH**

O pH foi determinado utilizando-se de pHmetro digital (Tecpron, Brasil) na temperatura ambiente ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ), calibrado com solução tampão (pH 4,0 e 7,0).

#### 4.6.3 Análise da aparência

A amostra foi acondicionada em vidro relógio e colocada sobre fundo preto. A avaliação foi de forma visual, a fim de avaliar as características macroscópicas para verificação de sinais de instabilidade.

#### 4.6.4 Estabilidade de longa duração (*Shelf life*)

Para o teste, três amostras representativas do gel foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em local seco e em temperatura ambiente pelo prazo de 1 ano (21/01/2021 a 21/01/2022). Não houve intercorrências e nem abertura dos frascos durante esse período (ANVISA, 2004).

#### 4.6.5 Análise da densidade

A densidade foi avaliada utilizando-se de picnômetro de vidro, com capacidade de 10 mL e temperatura monitorada em 25°C. A relação entre a massa da amostra e a massa da água, ambas a 25°C representam densidade específica da amostra ensaiada.

#### 4.6.6 Espalhabilidade

O teste foi baseado na capacidade de espalhabilidade da amostra quando submetida a uma pressão.

Para o teste, foram utilizadas placas de vidro sob papel milimetrado, onde 0,5 g da amostra foram colocados sobre a placa e em cima desta, foi acondicionada outra placa de vidro utilizando de pesos pré-determinados (2, 5 e 10 g) em intervalos de um minuto. Após os intervalos, o diâmetro de espalhamento da amostra foi aferido. Os cálculos seguiram a equação:

$$E_i = (d^2 \cdot \pi)$$

Onde:  $E_i$ : Espalhabilidade da amostra para um determinado peso em milímetro quadrado ( $\text{mm}^2$ );  $d$ : Diâmetro médio em milímetros (mm).

## 4.7 TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 4.7.1 Cepa bacteriana

Foi utilizada a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), pertencente à coleção bacteriana do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada (NIP3) do Departamento de Microbiologia/ Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As amostras bacterianas foram armazenadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) contendo 20% de glicerol, e mantidas a -80°C até o momento do uso.

A cepa padrão de *P. aeruginosa* foi utilizada por estar entre os principais patógenos causadores de infecções em lesões da pele, serem multirresistentes a antimicrobianos comuns e formador de biofilme.

### 4.7.2 Teste de Difusão em Disco

Para o teste foi utilizado o meio de cultura Ágar Müller-Hinton (MHA) em placas de Petri para crescimento microbiano. As bactérias crescidas foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) e a suspensão foi inoculada em placa com (MHA) utilizando uma haste flexível com ponta de algodão esterilizado. Discos de papel esterilizado contendo 10 µL da solução de AgNPs foram colocados na superfície da placa de ágar, e incubadas por 24 horas a 37°C.

### 4.7.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada por ensaio de microdiluição seriada em caldo utilizando microplacas de 96 poços, de acordo com o protocolo do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2015). A cepa *P. aeruginosa* (ATCC 9027) foi cultivada e suspendida de acordo com a escala de 0,5 McFarland, onde a suspensão bacteriana foi diluída em caldo Muller Hinton (MHB) para uma proporção de 1:100, inoculada com quantidade de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL, e as microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

#### **4.7.4 Determinação do Tempo de Morte (*Time Kill*)**

O potencial antimicrobiano do gel foi avaliado por curva de sobrevivência e morte microbiana e determinada de acordo *National Committee for Laboratory standards* (NCCLS,1999). A cepa *P. aeruginosa* (ATCC 9027) foi cultivada e suspendida de acordo com a escala de 0,5 McFarland, onde a suspensão bacteriana foi diluída em caldo MHB para uma proporção de 1:100 e inoculada com densidade de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL. O gel foi testado de acordo com a CIM previamente determinada em ensaio anterior e comparada com o controle bacteriano positivo.

A curva foi desenvolvida em triplicata com diferentes tempos de ação (0, 1, 2, 3 e 4 horas), onde alíquotas de cultura bacteriana diluídas foram transferidas para uma placa com MHA, para quantificar o número de células viáveis ou UFC. A placa foi incubada em 37°C por 24 horas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE NANOCELULOSE, ÁCIDO HIALURÔNICO E DE PRATA

#### 5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada para verificar a morfologia das nanopartículas dos biopolímeros constituintes do gel, a distribuição das formas das fibras, porosidade, defeitos e determinar o diâmetro médio das nanopartículas.

A literatura relata que as Microfibrilas de celulose (MFC) são regiões com domínios cristalinos e amorfos, longos e flexíveis, com cerca de 20 nm de diâmetro e vários micrômetros de comprimento, resultantes da desintegração de fibras de celulose sob alto cisalhamento e forças de impacto. A nanocelulose geralmente apresenta uma estrutura tridimensional com a presença de pequenos poros, que quando da junção com AH tendem a se preencher (OLIVEIRA, 2017; SANTOS, 2016).

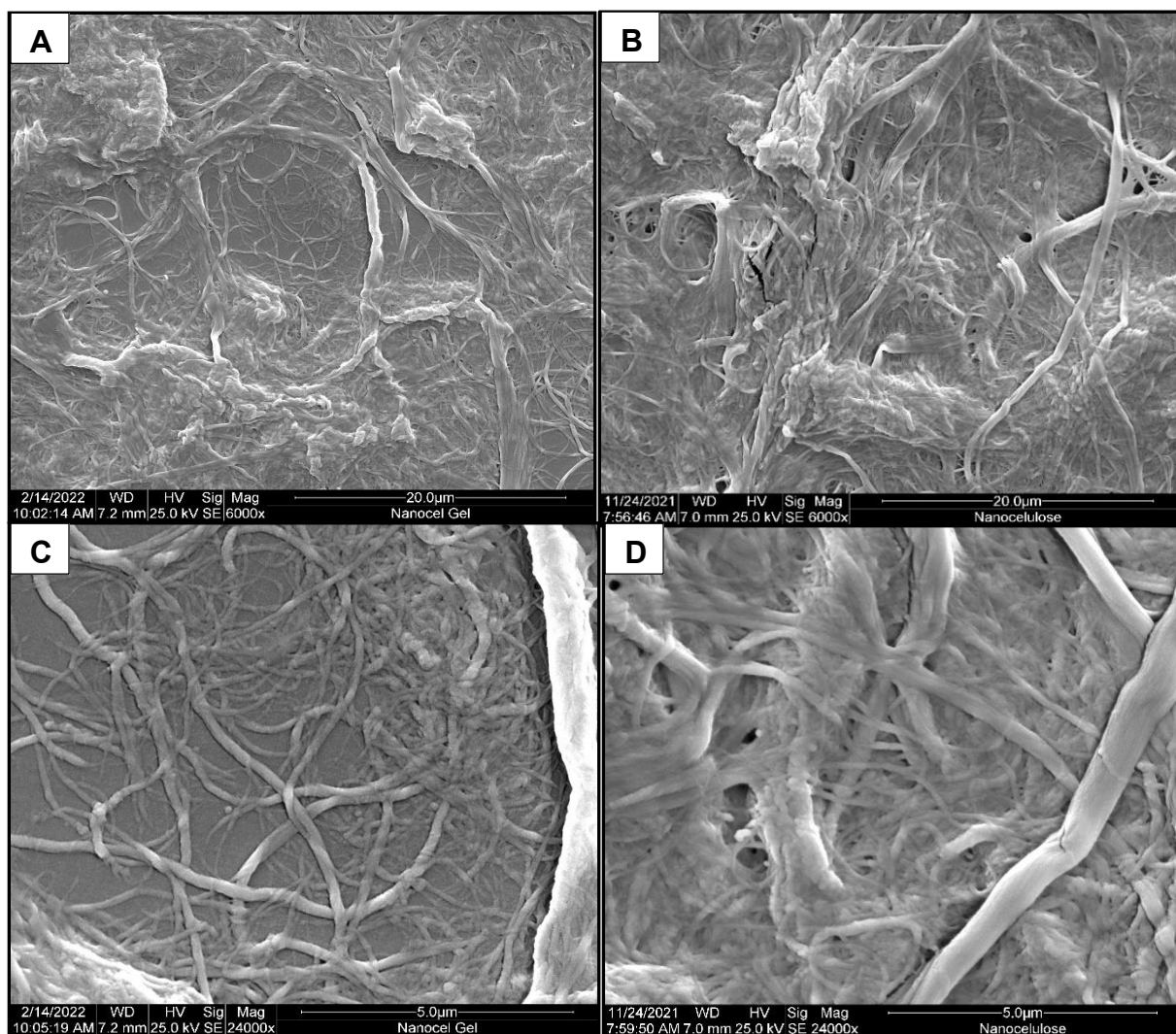
Neste trabalho utilizou-se de uma celulose microfibrilar comercial (Exilva<sup>®</sup>), não sendo possível especificar o tipo de tratamento feito para o desfibrilamento e sua consequente redução no diâmetro das fibras, como também a quais processos químicos as fibras foram submetidas.

Nas eletromicrografias (Figura 5), pode ser observada a característica morfológica das fibrilas de nanocelulose pura, imagens (A e C) e do compósito de nanocelulose com ácido hialurônico, imagens (B e D). As imagens exibem as fibrilas formando um arranjo randômico numa estrutura tridimensional com presença de pequenos poros.

Quando da comparação da nanocelulose pura com o compósito formado, é possível verificar que o compósito, imagens (B e D), se apresentam numa rede densa de tamanhos variados, com grande compactação nas microfibrilas, diminuindo a percepção de profundidade e preenchendo toda rede de nanofibrila da celulose. É possível observar ainda, fibrilas mais espessas que aparentam ser compostas por várias camadas, confirmando que a adição de AH proporcionou diferenças significativas na composição do gel.

A verificação do diâmetro médio nas fibras da nanocelulose pura foi de 103,67

nm, enquanto o diâmetro médio das fibras do compósito foi de 107,66 nm.



**Figura 5** – Imagens da MEV. Nanocelulose pura (A e C) e compósito formado com nanocelulose e ácido hialurônico (B e D).

### 5.1.2 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) do Gel

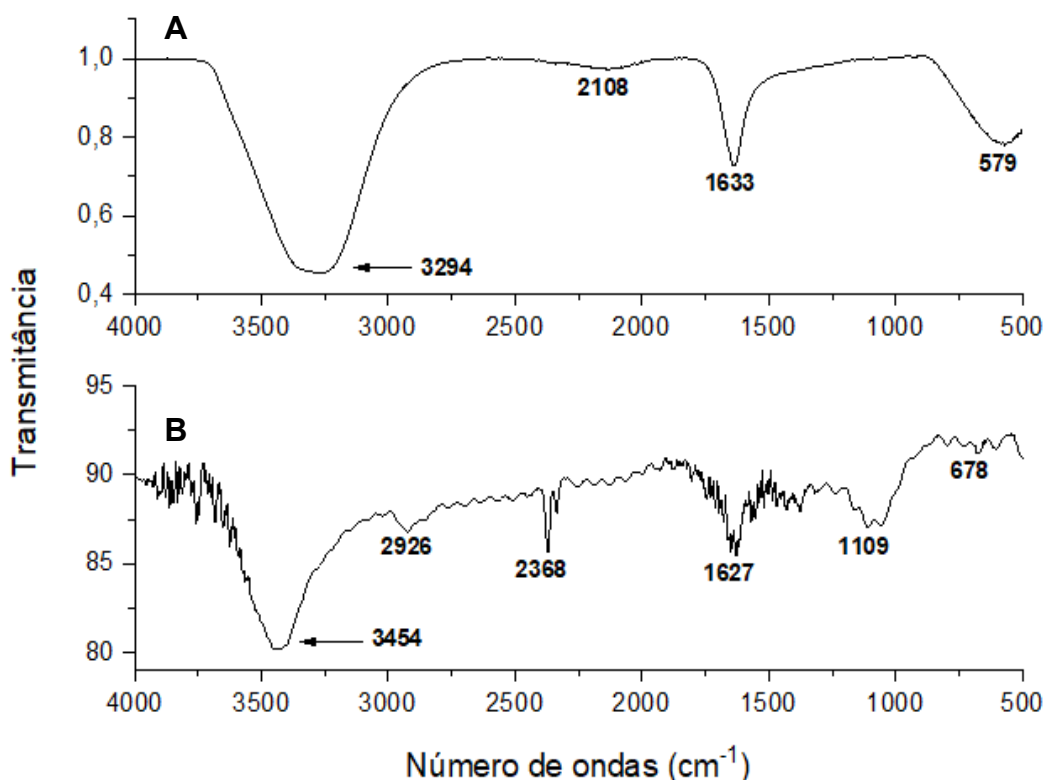
O compósito foi avaliado por FT-IR a fim de verificar a incorporação do ácido hialurônico nas fibrilas de nanocelulose.

Os espectros de materiais celulósicos normalmente apresentam banda de absorção na faixa de  $3350\text{ cm}^{-1}$ , relacionada a vibração das hidroxilas (-OH) e em  $2900\text{ cm}^{-1}$ , relacionados a vibrações carbono-hidrogênio (C-H),  $1650\text{ cm}^{-1}$  relacionados a deformação da água adsorvida,  $1110\text{ cm}^{-1}$  vibrações de álcoois

primários e secundários (C-O),  $663\text{ cm}^{-1}$  deformação fora do plano de (C-OH) (OLIVEIRA, 2017; SANTOS, 2017).

A Figura 6 apresenta bandas de absorção características da celulose que foram encontrados nos espectros do compósito. A incorporação do ácido hialurônico nas fibrilas de nanocelulose foi verificada pelo aparecimento de uma banda mais ampla exatamente em  $3431\text{ cm}^{-1}$ . Essa ampla faixa de absorção, comparada a banda de absorção característica da celulose, na faixa de  $3350\text{ cm}^{-1}$ , se atribui ao estiramento das ligações (OH e NH). A banda presente em  $2364\text{ cm}^{-1}$  relaciona-se a vibrações de (C-H). A banda de  $1621\text{ cm}^{-1}$  deve-se aos grupos (C=O) da amida e a presença de água intermolecular. Em  $1106\text{ cm}^{-1}$  há vibrações relacionadas a (C-O) e em  $677\text{ cm}^{-1}$  deformação fora do plano de (C-OH).

A presença e a integridade da junção dos biopolímeros, foi confirmada por meio de influências na composição química, que fora acompanhado pela mudança de bandas características.



**Figura 6** – Espectro de FT-IR. Nanocelulose pura (A) e compósito formado com nanocelulose e ácido hialurônico (B).

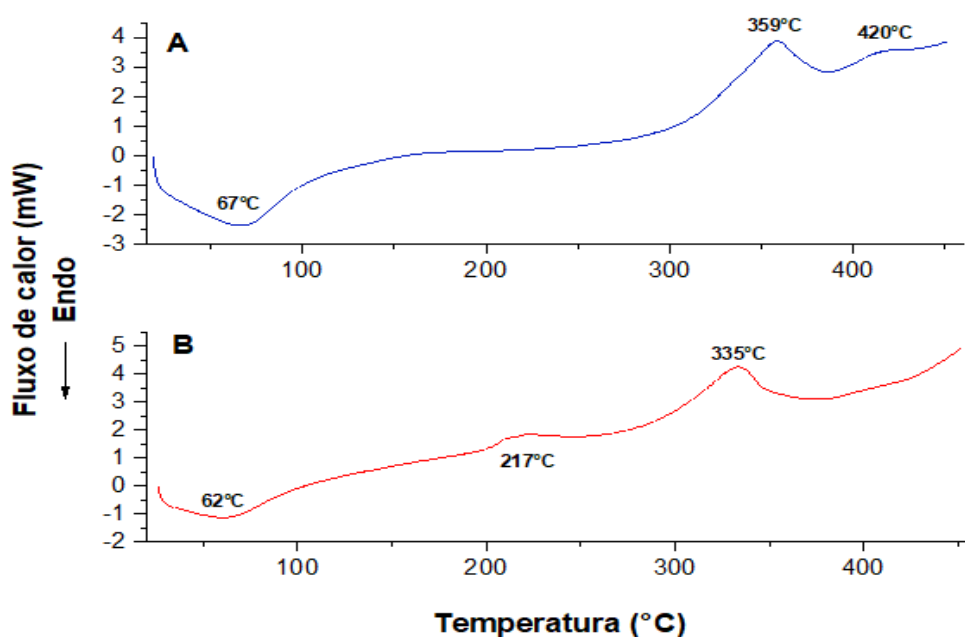
### 5.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para verificar as propriedades físicas da amostra baseando-se na variação de temperatura realizou-se análise de DSC.

Relatos da literatura trazem que a incorporação de nanocelulose em materiais, permite que a temperatura de cristalinidade e o pico de cristalização aumentem, sugerindo a boa afinidade desse biopolímero. As nanoceluloses ao se distribuírem homogeneamente, indicam aumento de área superficial, resultando em um material com maior região cristalina (GUIMARÃES, 2015; SEIXAS, 2019).

A degradação térmica pode ser estudada por meio da Figura 7. A curva DSC apresentou comportamento de substância higroscópica (capacidade de absorver água). Foi possível verificar um primeiro evento endotérmico intenso, em intervalo de temperatura de 70°C a 80°C, relacionado a degradação de compostos de baixa massa molar presentes na molécula do AH, como a perda de moléculas de água. Houve também a ocorrência de um segundo e terceiro evento, ambos exotérmicos. O segundo evento, que ocorre no intervalo de temperatura de 200°C e 220°C considera-se a perda de massa da amostra devido a clivagem das ligações, conduz a formação de CO<sub>2</sub>, água e outras substâncias derivadas de hidrocarbonetos. O terceiro evento, no intervalo de 310°C a 330°C, apresenta a perda de massa contínua da amostra.

A ocorrência dos picos mostrando um único processo de perda de massa da amostra para os biopolímeros, comprova a interação e a estabilidade térmica do compósito constituído.



**Figura 7**– Curva de DSC (Atmosfera N<sub>2</sub>, 50 mL/min). Nanocelulose pura (A) e compósito formado com nanocelulose e ácido hialurônico (B).

#### 5.1.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis).

A busca por processos e produtos químicos verdes e sustentáveis foi priorizado neste trabalho. As AgNPs foram produzidas reduzindo os íons de prata em solução utilizando AgNO<sub>3</sub> como agente precursor e o aminoácido arginina como agente redutor associado ao hidróxido de potássio como carreador.

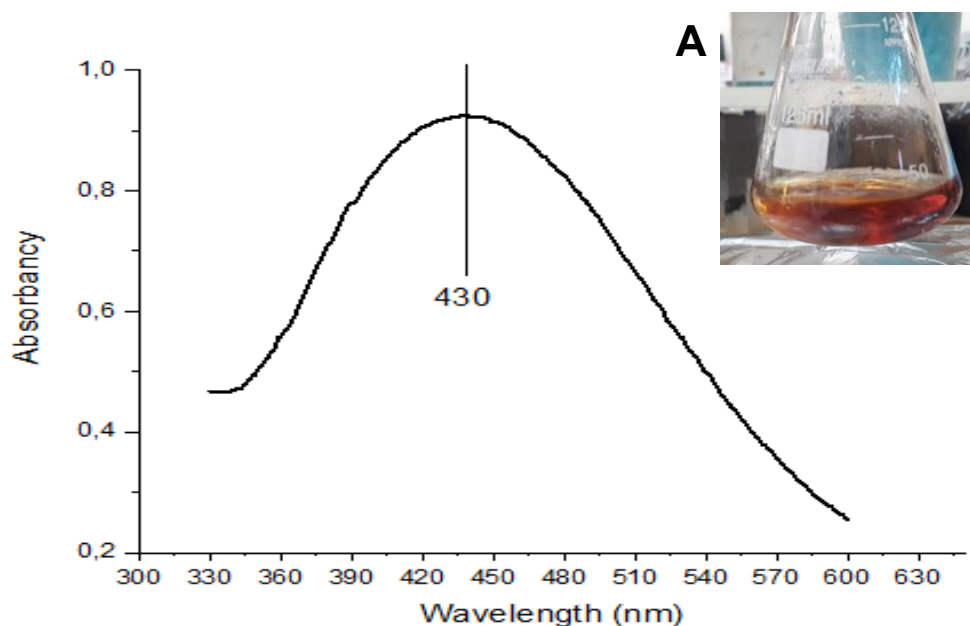
A eficácia da síntese das AgNPs utilizando aminoácidos foi anteriormente descrita por Shankar e Rhim, que utilizaram triptofano e tirosina para obter nanopartículas de prata e posteriormente as incorporaram em ágar que apresentou atividade bactericida. A arginina, juntamente com os fatores fisiológicos, apresenta interação inorgânica com metais, atuando como base de Lewis devido aos pares de elétrons livres nos grupos amina e carboxila, permitindo que ela se ligue a orbitais não preenchidos de metais de transição, originando complexos metálicos. Este processo metálico apresenta altos valores de afinidade e sua entalpia de ligação de forma neutra é de -80,5 kcal.mol<sup>-1</sup> a 298 k, e energia livre de -70,3 kcal.mol<sup>-1</sup>, ambos números destacados (TAMER et al., 2002).

Shoeib e cols. mostraram que a ligação é formada pela interação do nitrogênio terminal, o segundo com o oxigênio carboxílico e o nitrogênio amida (TAMER et al., 2002). Assim, a interação entre a arginina e o íon Ag origina uma estrutura molecular, bactericida, estável no tempo, com baixa toxicidade inerente e risco reduzido de responsabilidade ambiental.

A solução coloidal de AgNPs foi preparada para reduzir o AgNO<sub>3</sub> em uma solução aquosa com uma solução também aquosa de arginina e hidróxido de potássio. A temperatura na qual foi realizada a titulação e a reação redutora foi escolhida após testar o processo na faixa de 10°C a 90°C, sendo que a última apresentou coloração laranja escuro. Em temperaturas amenas, nenhuma mudança na cor foi observada e apenas a 90°C o laranja escuro foi observado.

A Figura 8 apresenta os aspectos típicos de absorção de UV da solução de AgNPs sintetizada. O pico de absorção característico em aproximadamente 430 nm, pode estar relacionado a partículas de tamanho de 50 a 60 nm, uma relação entre o

pico de absorção plasmônica e a dimensão da partícula (MULFINGER et al., 2007).



**Figura 8** - Espectro de UV-Vis das AgNPs sintetizadas com  $\text{AgNO}_3$  e arginina em solução alcalina. **(A)** O encarte mostra a solução de AgNPs sintetizada com Arginina: KOH como agente redutor obtido a  $90^\circ\text{C}$ .

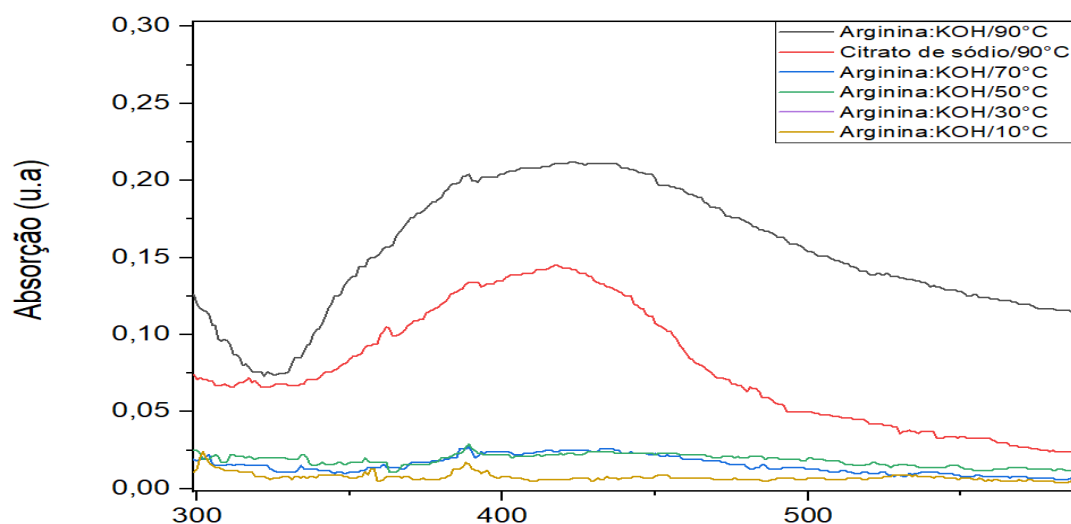
A forma e o tamanho das nanopartículas foram os principais fatores que elevaram a faixa espectral de ressonância e o comprimento de onda correspondente, assim como a massa efetiva, a densidade eletrônica e a interação com agentes estabilizadores. Quanto maior a partícula, maiores os comprimentos de onda de absorção óptica (BRAUSE et al., 2002).

O espectro UV-Vis das AgNPs sintetizadas com Arginina: KOH: $\text{AgNO}_3$  a  $90^\circ\text{C}$ , com apenas uma banda de ressonância de superfície plasmônica, revela a forma esferoide e a ausência de partículas anisotrópicas. A ampla faixa de comprimentos de onda, o centro do pico de absorção e sua intensidade estão correlacionados com o tamanho; a taxa de cobertura da superfície e o tamanho são inversamente correlacionados. Em taxas de cobertura de superfície mais altas, a ordem de longo alcance aparece com a formação de estruturas ordenadas. Tipicamente a ressonância do comprimento de onda plasmônica em 400 a 450 nm apresenta valores próximos a aproximadamente 27% para estruturas esferoides de aproximadamente 50 nm de largura (BAI et al., 2017; MANAI et al., 2016).

#### 5.1.4.1 Correlação entre temperatura e formação de nanopartículas.

Não foi observada alteração na cor das amostras sintetizadas em temperaturas amenas, nem nanopartículas foram observadas nos espectros UV-Vis, Figura 9. As exceções foram nas sínteses ocorridas a 90°C, utilizando arginina alcalina ou citrato como agentes redutores que apresentaram característica laranja escuro, solução translúcida, geralmente atribuída a AgNPs (ALMAQUER et al., 2019; LA SPINA et al., 2020). Uma solução de citrato de sódio foi utilizada como agente redutor, a 90°C, apresentando um espectro de absorção semelhante ao da Arginina: KOH na mesma temperatura.

Esta temperatura está no limite para a água como solvente, próxima do ponto de ebulição, mas ainda amigável ambientalmente e sustentável do ponto de vista industrial, o trabalho nesta temperatura é plausível (NATSUKI, HASHIMOTO, 2015).



**Figura 9** - Espectro das amostras obtidas após titulação de Arginina e KOH contra soluções de  $\text{AgNO}_3$  em diferentes temperaturas.

#### 5.1.5 Distribuição de tamanho de partículas

As medidas de PSD mostraram a formação de AgNPs com tamanho médio de 57,88 nm, o que está de acordo com o observado anteriormente pelos espectros UV-Vis.

## **5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL DO GEL**

### **5.2.1 Análise de cor e odor**

O gel apresentou coloração branca e a amostra foi classificada como normal, sem alteração.

O odor da amostra foi avaliado de forma olfativa direta. A amostra foi classificada como normal, sem alteração, apresentando odor característico das matérias-primas utilizadas.

### **5.2.2 Análise da Aparência**

A avaliação visual não apresentou ocorrência de separação de fases, de precipitação e de turvação, indicou estabilidade inicial da amostra ensaiada, sendo classificada como normal, estável e homogêneo.

### **5.2.3 Estabilidade de longa duração (*Shelf life*)**

Os resultados de estabilidade mostraram que as amostras mantiveram as mesmas características de quando armazenadas, não apresentando alterações e separação de fases.

As amostras foram classificadas como normais e sem alterações.

### **5.2.4 Análise do pH**

Os valores de pH obtidos foram iguais a pH 5,8 de média, próximo a neutralidade. Os valores são satisfatórios para utilização e importantes para a estabilidade do produto.

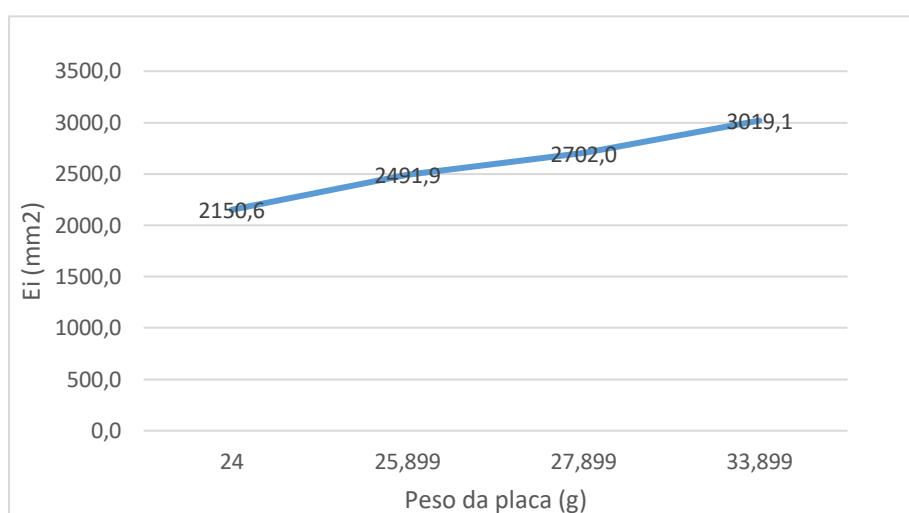
### **5.2.5 Análise da densidade**

A formulação apresentou densidade de 1,0424 g/cm<sup>3</sup>, próximo da densidade da água de 1,0000 g/cm<sup>3</sup>.

### **5.2.6 Espalhabilidade**

A espalhabilidade máxima para a formulação alcançou 3019,1 mm<sup>2</sup>, Figura 10.

Os resultados mostraram que a formulação obteve aumento do perfil de espalhabilidade, sendo considerado de fácil aplicação e demonstrando que os componentes incorporados representam um papel essencial na determinação da eficácia e aceitação do produto, visto que a espalhabilidade afeta as propriedades de aplicação do gel.

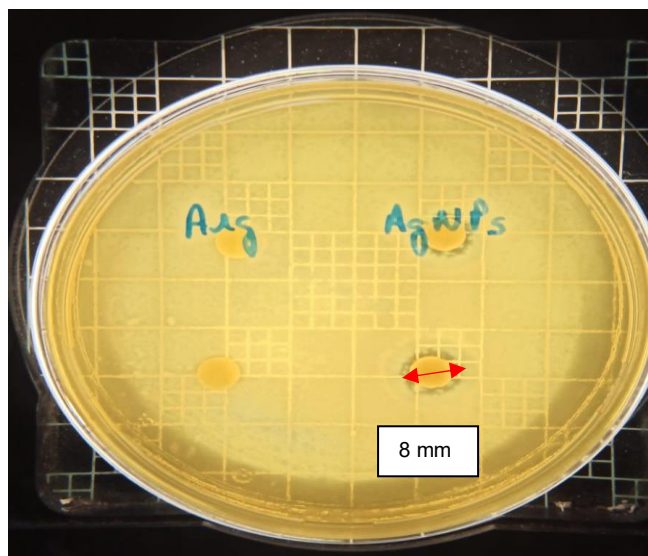


**Figura 10** - Espalhabilidade (mm<sup>2</sup>) da formulação do gel.

### 5.3 TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

#### 5.3.1 Teste de Difusão em Disco

O teste de Disco-difusão em ágar mostrou que o processo sintético com Arginina alcalina consegue produzir AgNPs com atividade antimicrobiana, testado contra *P. aeruginosa*. Os resultados observados na Figura 11 demonstram a atividade antimicrobiana ao redor do disco previamente embebido com soluções de AgNPs, eliminando as bactérias e gerando um halo de inibição com aproximadamente 8 mm de diâmetro.



**Figura 11** - Resultado do teste de Difusão em Disco. Amostras de solução de Arginina (Arg) e de solução de nanopartículas de prata (AgNPs).  
Fonte: Próprio autor.

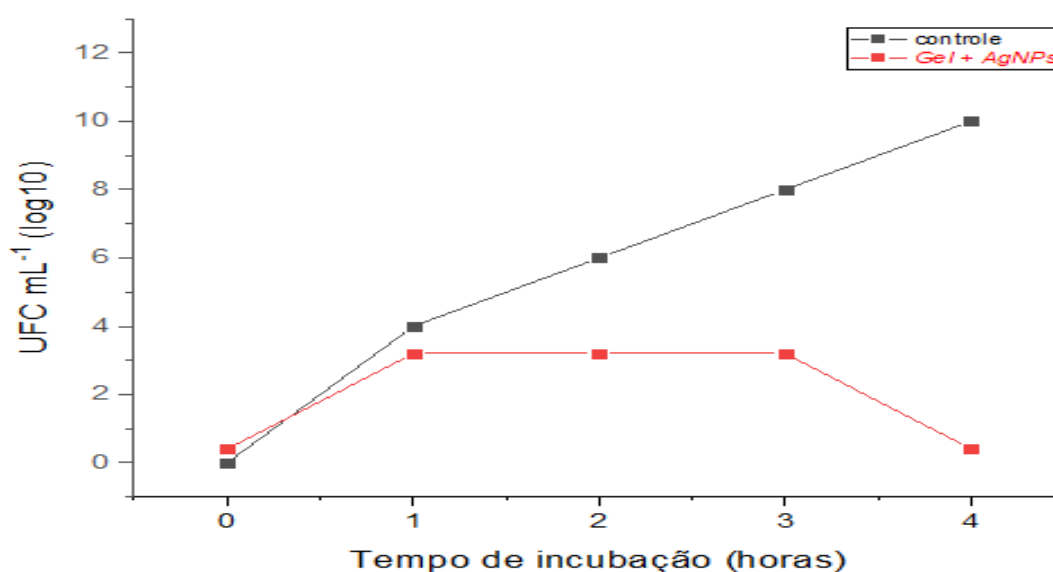
A limitação deste ensaio está relacionada à difusão do composto no meio como o impedimento que o ágar impõe, bem como o volume ativo (FLANAGAN, STECK, 2017). A arginina é o mais alcalino dos 20 aminoácidos biológicos e *P.aeruginosa* é suscetível às alterações de pH provocados no meio, que afetam o desempenho no desenvolvimento do biofilme bacteriano e inclusive pode interferir em doenças como fibrose cística nos pulmões onde o pH é ácido (LIN et al., 2021). A arginina como carreador de prata nanoparticulada, mostra-se uma interessante alternativa terapêutica, como que foi visto nos resultados obtidos no teste de disco-difusão.

### 5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A menor concentração capaz de matar a bactéria foi de 1,5 µg/mL, o que pode ser considerado altamente eficaz contra *P. aeruginosa*. Esse resultado está de acordo com a CIM de outros autores, na faixa de 1,406 a 5,625 µg/mL para as AgNPs (LIAO et al., 2019).

### 5.3.3 Determinação do Tempo de Morte (*Time Kill*)

O ensaio de tempo de morte, Figura 12, mostra que expostos às AgNPs a partir de 1 hora, o gel mostrou efeito bacteriostático e após 3 horas, toda a população de *P. aeruginosa* foi erradicada, o que corresponde a uma eficácia bactericida de 99,999%. A atividade bactericida permaneceu por todo o tempo de execução do experimento, 24 horas, ou seja, isso significa que as AgNPs têm um efeito prolongado.



**Figura 12-** Curva do tempo de morte à suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* a solução de AgNPs.

Fonte: Próprio autor.

*P. aeruginosa* é amplamente conhecida por sua associação com altas taxas de infecção, por sua variedade de mecanismos de resistência intrínseca, produção de biofilme e transferência de genes de resistência e plasmídeos (SALOMONI et al., 2017). Esta cepa adquire mecanismos adicionais para desenvolver resistência por meio de mutações e aquisição de fatores, como  $\beta$ -lactamases (classe A e D de Ambler), Cefalosporinases (enzimas AmpC), Metallo- $\beta$ -lactamases, bombas de efluxo, Fluoroquinolonas, perdas de porina, proteção LPS de aminoglicosídeos (BARANI et al., 2021; LAMBERT 2002; MOYNE et al., 2021).

O efeito antibacteriano das AgNPs está correlacionado com a dimensão das partículas, quanto menor o diâmetro, mais eficiente é a ação antimicrobiana (FENG,

et al, 2000). A correlação das dimensões das AgNPs é vinculada a sua permeabilidade às membranas bacterianas, onde partículas menores são mais eficazes como agentes antibacterianos (CHOI, et al, 2008). Nanopartículas na faixa entre 20 e 80 nm apresentam atividade antimicrobiana (BUNDJAJA et al., 2021; MEDEIROS, 2019; SOFI et al., 2021).

Sabe-se que os AgNPs possuem um amplo espectro de atividade bactericida, ligando-se à membrana celular e aumentando a permeabilidade, devido às alterações estruturais que resultam ao final por promoverem a lise celular. As AgNPs induzem a ruptura da membrana, criando brechas para a ingestão de Ag dentro da célula, apesar da eventual resistência à perda de porina adquirida (DAKAL et al., 2016).

#### 5.4 FORMA FARMACÊUTICA FINAL

A Figura 13, apresenta a forma farmacêutica final. A composição tópica em gel englobou o compósito de nanocelulose com ácido hialurônico, no qual foi incorporado nanopartículas de prata, sorbato de potássio e água purificada como veículo da formulação.



**Figura 13** – Imagem do gel constituído (forma farmacêutica final).

A formulação é proposta como alternativa para o controle de infecções bacterianas.

O gel apresenta propriedades interessantes para a finalidade do produto, como estabilidade, poder residual, fácil aplicação e elevada ação bactericida.

Os resultados obtidos neste trabalho, geraram um artigo científico e o depósito

de uma patente, os quais se encontram em anexo.

**Anexo A - Artigo:** Silver nanoparticles synthesized under alkaline arginine and its antibacterial activity.

**Anexo B - Depósito de patente** – Título: Gel de nanocelulose com ácido hialurônico e nanopartículas de prata com propriedades antimicrobianas.

## 6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a forma farmacêutica desenvolvida contendo nanocelulose, ácido hialurônico e sorbato de potássio, constituiu um gel tópico hidrofílico com eficiência no carregamento de nanopartículas de prata.

A síntese para obter as AgNPs utilizando uma solução alcalina de Arginina como agente redutor de  $\text{AgNO}_3$  mostrou-se satisfatória, usando água como solvente e reagentes sustentáveis com impacto ambiental praticamente baixo.

O produto (gel) conferiu alta eficiência bactericida em baixas concentrações do agente.

A partir dos resultados do presente trabalho, pode-se sugerir que o gel formulado apresenta grande potencial para ser utilizado como alternativa terapêutica no controle e tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, em humanos e outros animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, J. D. P., SOUZA, K. C., DUARTE, C. R., DA SILVA DUARTE, I., ASSIS SALES RIBEIRO, F., SILVA, G. S., FARIAS, P. M. A., STINGL, A; COSTA, A. F. S., VINHAS, G. M. & SARUBBO, L. A. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**. V. 18, p. 851–869, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00989-9>
- ARNOLD Jr. H. L., ODOM, R. B., JAMES, W. D. **A pele: estrutura básica e função: doenças básicas da pele de Andrews**. Dermatologia Clínica, p. 1-14, 1994.
- AZEVEDO, R. B. Microscopia eletrônica. In: DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C., MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de Nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora. p. 89-108, 2006.
- BARUD, H. S. **“Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana”**, Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil, 2006.
- BEZERRA, A. V. A. **“Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Biocida de Nanopartículas de Prata em Filmes de Poliestireno”**, TCC de Graduação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.
- BUNDJAJA, V., SANTOSO, S. P., ANGKAWIJAYA, A. E., YULIANA, M., SOETAREDJO, F. E., ISMADJI, S., AYUCITRA, A., GUNARTO, C., JU, Y. H., & HO, M. H. Fabrication of cellulose carbamate hydrogel-dressing with rarasaponin surfactant for enhancing adsorption of silver nanoparticles and antibacterial activity. **Materials Science and Engineering**. v.118, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111542>
- BUTYLINA, S., GENG, S., LAATIKAINEN, K., & OKSMAN, K. Cellulose Nanocomposite Hydrogels: From Formulation to Material Properties. **Frontiers in Chemistry**. V 8, p. 1–11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00655>
- CARVALHO, J. P. F., SILVA, A. C. Q., BASTOS, V., OLIVEIRA, H., PINTO, R. J. B.; SILVESTRE, A. J. D., VILELA, C. & FREIRE, C. S. R. Nanocellulose-based patches loaded with hyaluronic acid and diclofenac towards aphthous stomatitis treatment. **Nanomaterials**. v.10, 2020. <https://doi.org/10.3390/nano10040628>

- CHOU DHURY, R. R., SAHOO, S. K., & GOHIL, J. M. Potential of bioinspired cellulose nanomaterials and nanocomposite membranes thereof for water treatment and fuel cell applications. **Cellulose**. v. 27, p. 6719–6746, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03253-z>
- CLARO, P., de CAMPOS, A., CORREA, A., RODRIGUES, V., LUCHESI, B., SILVA, L., TONOLI, G., MATTOSO, L., & MARCONCINI, J. Curaua and eucalyptus nanofiber films by continuous casting: mixture of cellulose nanocrystals and nanofibrils. **Cellulose**, v. 26, p. 2453–2470, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02280-9>
- CLSI (THE CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests of bacteria that grow aerobically**, document M07-A10—tenth Edition. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.
- DIAS, B.P., CASTRO, E. M., GONÇALVES, R.R.L., OLIVEIRA, D.S., FERREIRA, T.H., SILVA, B.M. A nanotecnologia no Brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana. **Química Nova**, v. 44, p. 1084-1092, 2021. [doi.org/10.21577/0100-4042.20170743](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170743)
- DIMIC-MISIC, K., MALONEY, T., & GANE, P. Effect of fibril length, aspect ratio and surface charge on ultralow shear-induced structuring in micro and nanofibrillated cellulose aqueous suspensions. **Cellulose**. v. 25, p.117–136, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1584-3>
- DUARTE, É. B., ANDRADE, F. K., LIMA, H. L. S., NASCIMENTO, E. S. do, CARNEIRO, M. J. M., BORGES, M. de F., LUZ, E. P. C. G., CHAGAS, B. S. das, & ROSA, M. de F. **Celulose bacteriana: propriedades, meios fermentativos e aplicações**. Embrapa Agroindústria Tropical. v.186, p.1–37, 2019.
- DURÁN, N., ROLIM, W., DURÁN, M., FÁVARO, W., & SEABRA, A. Nanotoxicologia De Nanopartículas De Prata: Toxicidade Em Animais E Humanos. **Química Nova**, v. 42, p. 206–213. 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170318>
- DURÁN, N., DURÁN, M., JESUS, M.B., SEABRA, A.B., FÁVARO, W.J., NAKAZATO, G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v 12, p. 789-799, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>
- DUFFOUR, C., ZAKARI, S., IMOROU, I. T., THOMAS, O. A. B., DJAOUGA, M., AROUNA, O., SYLLA, D., NEWTON, A. C., HILL, R. A., ECHEVERRIA, C., GOLICHER, D., BERNAYAS, J. M., CAYUELA, L., HINSLEY, S. A., TAPIA J, BOUAZZA, S., LEBAUT, S., KHALKI, Y. EI, GILLE, E., MACHINES, S. V. Title. **Progress in Physical Geography**. v.14, p. 450, 2017. <https://doi.org/10.1177/0309133309346882>

- ELAYARAJA, S., LIU, G., ZAGORSEK, K., MABROK, M., JI, M., YE, Z., ZHU, S., & RODKHUM, C. TEMPO-oxidized biodegradable bacterial cellulose (BBC) membrane coated with biologically-synthesized silver nanoparticles (AgNPs) as a potential antimicrobial agent in aquaculture (In vitro). **Aquaculture**. V. 530, p. 735- 746, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735746>
- FERNANDES, P. E. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Viçosa, MG, 2014.
- FISCHER, M. R., GARCIA, M. C. F., NOGUEIRA, A. L., PORTO, L. M., SCHNEIDER, A. L. dos S., & PEZZIN, A. P. T. Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos. **Revista Materia**. V. 22, 2017. <https://doi.org/10.1590/s1517-707620170005.0270>
- FONSECA, D. F. S., VILELA, C., PINTO, R. J. B., BASTOS, V., OLIVEIRA, H., CATARINO, J., FAÍSCA, P., ROSADO, C., SILVESTRE, A. J. D., & FREIRE, C. S. R. Bacterial nanocellulose-hyaluronic acid microneedle patches for skin applications: In vitro and in vivo evaluation. **Materials Science and Engineering**. 118, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111350>
- FRAZIER, T., ALARCON, A., WU, X., MOHIUDDIN, O. A., MOTHERWELL, J. M., CARLSSON, A. H., CHRISTY, R. J., EDWARDS, J. V., MACKIN, R. T., PREVOST, N., GLOSTER, E., ZHANG, Q., WANG, G., HAYES, D. J., & GIMBLE, J. M. Clinical translational potential in skin wound regeneration for adipose-derived, blood-derived, and cellulose materials: Cells, exosomes, and hydrogels. **Biomolecules**. v. 10, p.1–21, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10101373>
- GARCIA, M. V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2011.
- GUIMARÃES, M. **Desenvolvimento de nanopartículas de poli (n-abutilcianoacrilato) com zidovudina revestidas por ácido hialurônico para veiculação em gel de uso transdérmico**. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo/SP, 2015.
- GODINHO, J. F., BERTI, F. V., MÜLLER, D., et al., “Incorporation of Aloe vera extracts into nanocellulose during biosynthesis”. **Celullose**. v. 23, p. 545 - 555, 2016.
- HE, Y., LI, H., FEI, X., & PENG, L. Carboxymethyl cellulose/cellulose nanocrystals immobilized silver nanoparticles as an effective coating to improve barrier and antibacterial properties of paper for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**. V.252, 2021.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>

- JANARTHANAN, G., SHIN, H. S., KIM, I. G., JI, P., CHUNG, E. J., LEE, C., & NOH, I. Self-crosslinking hyaluronic acid-carboxymethylcellulose hydrogel enhances multilayered 3D-printed construct shape integrity and mechanical stability for soft tissue engineering. **Biofabrication**. v.12, 2020. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aba2f7>
- KIM, H., LEE, S., & KI, C. S. Modular formation of hyaluronic acid/ $\beta$ -glucan hybrid nanogels for topical dermal delivery targeting skin dendritic cells. **Carbohydrate Polymers**. V. 252, p. 117-132, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117132>
- LEE HV, HAMID SBA, ZAIN SK (2014) Conversão da biomassa lignocelulósica para nanocelulose: estrutura e processo químico. **The Scientific World Journal**. p. 1-20, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/631013>
- LET, A., PAULA, D. B., SILVA, D. F., MERENCIO, R. M., EM, A., ROBERTO, D. M., INTEGRADAS, F., & FERREIRA, R. **Revista saúde & ciência**. v. 8, p. 95–99, 2019.
- LIAO,S., ZHANG,Y., PAN,X., ZHU, F., JIANG,C., LIU, Q., CHENG, Z., DAI, G., WU, G. WANG, L., CHEN, L. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Nanomedicine**. v. 14, p.1469–1487, 2019.
- LUDWICKA, K., KACZMAREK, M., & BIALKOWSKA, A. Bacterial nanocellulose - a biobased polymer for active and intelligent food packaging applications: Recent advances and developments. **Polymers**. v. 12, p.1–23, 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12102209>
- MEDEIROS, C.H.S. **Estudo das Propriedades Antimicrobianas de Filmes de Nanocelulose e Nanopartículas de Prata**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP, 2019.
- MONTANHEIRO, T. L. do A., RIBAS, R. G., MONTAGNA, L. S., MENEZES, B. R. C. de, SCHATKOSKI, V. M., RODRIGUES, K. F., & THIM, G. P. A brief review concerning the latest advances in the influence of nanoparticle reinforcement into polymeric-matrix biomaterials. **Journal of Biomaterials Science**, V. 31, p. 1869–1893, 2020. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1781527>
- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). **M26A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents**. M26.1. v.19, n.18, Wayne, PA, USA,1999.
- OLIVEIRA, S.A. **Isolamento e Purificação de Ácido Hialurônico da Crista de Frango e Incorporação em Membranas de Celulose Bacteriana** .

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR, 2017.

- ONYIANTA, A. J., O'ROURKE, D., SUN D., POPESCU, C. M., & DORRIS, M. High aspect ratio cellulose nanofibrils from macroalgae *Laminaria hyperborea* cellulose extract via a zero-waste low energy process. **Cellulose**. v. 27, p.7997–8010, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03223-5>
- OTUBO, L. **Técnicas de caracterização de nanopartículas metálicas funcionalizadas**. Exame Geral de Qualificação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 2005.
- PAIVA, W.K.V. **Produção, Caracterização e Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro do Acido Hialuronico produzido por *Streptococcus zooepidemicus* CCT 7546**. TCC de Graduação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte/RN, 2019.
- PESSOA, V.S. ***Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiologia e Resistência a Antimicrobianos em Hospital Universitário do Sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2013.
- PETTIGNANO, A., LEGUY, J., HEUX, L., JEAN, B., CHARLOT, A., & FLEURY, E. Multifunctionalization of cellulose microfibrils through a cascade pathway entailing the sustainable Passerini multi-component reaction. **Green Chemistry**, v. 22, p. 7059–7069, 2020. <https://doi.org/10.1039/d0gc02532a>
- PHAM, T. T. H., VADANAN, S. V., & LIM, S. Enhanced rheological properties and conductivity of bacterial cellulose hydrogels and aerogels through complexation with metal ions and PEDOT/PSS. **Cellulose**. v. 27, p. 8075–8086, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03284-6>
- PHAN, D. N., KHAN, M. Q., NGUYEN, N. T., PHAN, T. T., ULLAH, A., KHATRI, M., KIEN, N. N., & KIM, I. S. A review on the fabrication of several carbohydrate polymers into nanofibrous structures using electrospinning for removal of metal ions and dyes. **Carbohydrate Polymers**. v. 252, p.117-175, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117175>
- RAMOS, M. M., dos S. MORAIS, E., da S. SENA, I., LIMA, A. L., de OLIVEIRA, F. R., de FREITAS, C. M., FERNANDES, C. P., de CARVALHO, J. C. T., & Ferreira, I. M. Silver nanoparticle from whole cells of the fungi *Trichoderma* spp. isolated from Brazilian Amazon. **Biotechnology Letters**. v. 42, p. 833–843, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02819-y>
- RATHINAMOORTHY, R. & KIRUBA, T. **Bacterial Cellulose - A Sustainable Alternative Material for Footwear and Leather Products**. In: Textile Science ad Clothing Technolgt. Springer Singapore. p. 91-121, 2020.

[https://doi.org/10.1007/978-981-15-6296-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6296-9_5)

- RELLEVE, L. S., GALLARDO, A. K. R., TECSON, M. G., & LUNA, J. A. A. Biocompatible hydrogels of carboxymethyl hyaluronic acid prepared by radiation-induced crosslinking. **Radiation Physics and Chemistry**.v. 179, p. 109-194, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.109194>
- SAMYN, P., BARHOUM, A., OHLUND, T., & DUFRESNE, A. Review: nanoparticles and nanostructured materials in papermaking. **Journal of Materials Science**. v. 53, p.146–184, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1525-4>
- SANTOS, F.C. **Nanocompósito de acetato de celulose com nanocelulose obtida a partir do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes/RJ, 2016.
- SANTOS, I.A.L., NOGUEIRA, J.M.R., MENDONÇA, F.C.R. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **RBAC**. v.47, p. 5-12, 2015.
- SEIXAS, M.V.S. **Obtenção de nanocelulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar e incorporação de EVA**. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de São Paulo. São Paulo/SP, 2019.
- SHANKAR, S., RHIM, J. W. Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films. **Carbohydrate Polymers**. v. 130, p. 353-363, 2015.
- SHARMA, A., THAKUR, M., BHATTACHARYA, M.,MANDAL, T., & GOSWAMI, S. Commercial application of cellulose nano-composites – A review. **Biotechnology Reports**. V. 21, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316>
- SINGH, A., KWANSA, A. L., KIM, H. S., WILLIAMS, J. T., YANG, H., Li, N. K., KUBICKI, J. D., ROBERTS, A. W., HAIGLER, C. H., & YINGLING, Y. G. In silico structure prediction of full-length cotton cellulose synthase protein (GhCESA1) and its hierarchical complexes. **Cellulose**. v. 27, p. 5597–5616, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03194-7>
- SOFI, H. S., AKRAM, T., SHABIR, N., VASITA, R., JADHAV, A. H., & SHEIKH, F. A. Regenerated cellulose nanofibers from cellulose acetate: Incorporating hydroxyapatite (HAp) and silver (Ag) nanoparticles (NPs), as a scaffold for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering**. v.118, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111547>
- SOLOMON, S. D., BAHADORY, M., JEYARAJASINGAM, A. V. R, S. A., & BORITZ, C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education**. v. 84, p. 322, 2007. <https://doi.org/10.1021/ed084p322>

- SOUSA, W. F. de, SANTOS, C. A. dos, & SECKLER, M. M. **Separação Granulométrica De Nanopartículas De Prata Por Centrifugação**. p. 6138–6145, 2015. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-1644-18251-179282>
- TORRES, R.; USALL, J.; TEIXIDO, N. et al. Liquid formulation of the biocontrol agente cândida sake by modifying water activity or adding protectants. **Journal of Applied Microbiology**. v.94, p.330-339, 2003.
- VENTURA, C., PINTO, F., LOURENÇO, A. F., FERREIRA, P. J. T., LOURO, H., & Silva, M. J. On the toxicity of cellulose nanocrystals and nanofibrils in animal and cellular models. In **Cellulose**. vol. 27, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03176-9>
- WANG, X., WANG, Q., & XU, C. Nanocellulose-based inks for 3d bioprinting: Key aspects in research development and challenging perspectives in applications—a mini review. **Bioengineering**. 2020. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7020040>
- ZHU, Q., YAO, Q., SUN, J., CHEN, H., XU, W., LIU, J., & WANG, Q. Stimuli induced cellulose nanomaterials alignment and its emerging applications: A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 230, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115609>

# ANEXOS

## ANEXO A ARTIGO CIENTÍFICO

### **Silver nanoparticles synthesized under alkaline arginine and its antibacterial activity.**

Mirian Modesto<sup>1</sup>, Gabriel Jonathan Sousa Andrade<sup>1</sup>, Isabella Martins Lourenço<sup>3</sup>, Amedea Barozzi Seabra<sup>3</sup>, Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>2</sup>, César Augusto Tischer<sup>1</sup>, Gerson Nakazato<sup>2</sup>. \*

- 1- Biochemistry and Biotechnology Department, Exact Sciences Center-CCE, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
- 2- Microbiology Department, Biological Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.
- 3- Center for Natural and Human Sciences (CCNH), Federal University of ABC (UFABC), Santo André, São Paulo, Brazil, CP 09210-580

\* Correspondent Author: Gerson Nakazato, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Londrina State University, University Campus, CEP 86055-990, Londrina, PR, Brazil, Phone: +55(43) 3371-4396, Fax: +55 (43) 3371-4788, CP 6001, e-mail: gnakazato@uel.br

#### **Abstract**

Multiresistant bacteria imposes a public health challenge globally, that impose the development of new drugs or alternative to regular therapies. Nanoparticles it's being used as antimicrobials, most metals, i.e., silver, gold and iron, that had shown consistent results. The main goal of this study was the silver nanoparticle synthesis (AgNPs) using arginine as a reducing agent and characterizing its antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. The silver nanoparticles were synthesized under a mixture a 1:2:5 molar ratio of [AgNO<sub>3</sub>]: [Arg]: [KOH]. The presence and size of the nanoparticles were observed by UV spectroscopy and Dynamic Light Scattering, which showed be 50-60 nm in diameter; the APS measure was 57.88 nm. The antibacterial activity was evaluated using agar disk-diffusion and time-kill bioassays. The AgNPs showed bactericide effect with minimum inhibitory concentration (MIC) of 1.5 µg/mL against *P. aeruginosa*. After 3 h on the nanoparticles, all bacterial population was killed. These results show the potential of this nanoparticle, produced under mild conditions to be used as an antimicrobial drug.

## 1 INTRODUCTION

The Multidrug-Resistant Bacteria (MDR) are a global public health concern that is leading to the development of new drugs and protocols bypassing the mechanisms that give them their multidrug resistance [1].

The antibacterial activity of the metallic compounds, mainly silver and gold, interfere with protein 3D structure disrupting the S-S bonds. Nanoparticles of these metals show higher effectiveness and lower toxicity in comparison with the ionic silver and gold particles, given by the high surface/volume ratio given by the reduced size [2,3]. It leads to the blocking of metabolic pathways such as respiratory chains, transport mechanisms, DNA denaturation and leakage of cellular contents. This wide aftermath prevents microorganisms to develop resistance against AgNPs [4]. The Ag<sup>+</sup> nanoparticles antimicrobial wide spectra at a low concentration lower too the toxicity to the mammalian cells [3].

The antimicrobial effectiveness of the AgNPs is linked to the size and shape of the nanoparticles [8], entailing to the synthetic process the main chore to get a well-resolved morphology where the desired activity is achieved [5,6,7]. Chemical and physical mechanisms that produce AgNPs with different surface properties, shapes, including rod, triangle, round, octahedral, polyhedral, and others, consequently impacting in the range of applications [8].

The reducing agent and stabilizer control the process, and this way controls the size and shape of the AgNPs [9]. Sodium citrate, sodium borohydride, dimethylformamide, triethanolamine and hydrazine can be used as electron donors to the reductive process and nanoparticle production [10,11]. The point that cannot be unnoticeable is that some of these reducing agents are harmful, and replacements for green sustainable chemistry are the goal of many researchers [12,13].

The biologically active amino acids are good environmentally friend compounds, suitable for green chemistry. Arginine shows inorganic interaction with metals, acting as a Lewis base with free pairs of electrons on the amine and carboxyl groups, allowing the linkage with non-occupied transition metals orbitals, producing the metallic complex. [14,15,16].

The metallic complex given by the Arg/Ag<sup>+</sup> is remarkably strong, with high binding energy [17] leading to a molecular structure that potentially has a good shelf time, bactericide, biocompatible e with a very low environmental impact [17, 18, 19,

20].

Thus, the goal of this work was to synthesize silver nanoparticles using arginine as a reducing agent and evaluate their antibacterial activity against the gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), which is frequently associated to burn wounds.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 GENERAL

The silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ), Potassium hydroxide (KOH) and Arginine (Arg) were bought from Sigma-Aldrich®.

For the bioassays, the strain used was *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, stored on Brain Heart Infusion (BHI) (Difco®), in 20% glycerol (Sigma-Aldrich®) at  $-80^\circ\text{C}$ .

### 2.2 SILVER NANOPARTICLES, AGNPS, SYNTHESIS

The AgPNs were prepared by titration of the  $\text{AgNO}_3$  solution against the reducing solution. The concentration of the source of silver ions,  $\text{AgNO}_3$ , was 0.0618 mol/L; for Arginine 0.1236 mol/L as the reducing agent, and potassium hydroxide (KOH, 0.309 mol/L) as a carrier. The molar ratio was 1:2:5,  $[\text{AgNO}_3]: [\text{Arg}]: [\text{KOH}]$ .

The reducing solution was prepared dissolving, i.g., 0.4305 g of Arginine and 0.3466 g of KOH in 20 mL of deionized water. For the silver ion solution, 0.2610 g of  $\text{AgNO}_3$  was dissolved in 25 mL of deionized water, then kept stirred at  $90^\circ\text{C}$ .

The former reducing solution was titrated against the  $\text{AgNO}_3$  solution dropped using a syringe pump at the flux at 10 mL/h, under stirring and at different temperatures from 10 to  $90^\circ\text{C}$ , with  $20^\circ\text{C}$  steps. The process was ended after the change of the colour to orange. The presence of the AgNPs was confirmed by the plasmonic resonance of the nanoparticles at 400 nm using UV-Vis spectrophotometry.

## 2.3 NANOPARTICLES CHARACTERIZATION

### 2.3.1 UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY

The ultraviolet spectra of the AgNPs samples were carried out on a Jenway 6705 UV Vis spectrophotometer (Jenway) at room temperature diluting samples 1:10 (v/v). The spectra were generated by scanning samples on quartz cuvettes ranging from 200 to 600 nm, with 0.1 nm of resolution.

### 2.3.2 PARTICLE SIZE DISTRIBUTION

The particle size distribution (PSD) of AgNPs was analyzed by (Zeta-APS, Matec Applied Sciences, USA). Measurements were performed in concentrated sample (3%), temperature of 26°C by means of acoustic attenuation (dB/cm) vs. sound frequency (1 to 100 MHz) of colloidal dispersion.

## 2.4 DISK DIFFUSION TEST

The qualitative analysis of the antibacterial effect of the synthesized AgNPs was observed by disk diffusion in water on agar Müller-Hinton (MHA) [20]. A formerly prepared bacterial saline suspension (0.85% NaCl), with 0.5 of cell count density on the McFarland scale ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL<sup>-1</sup>) was inoculated on MHA Petri plates.

Paper disks, previously sterilized, with 10 µL of the AgNPs (130 µg/mL) was placed on the described plates above; four disks per plate, equidistantly distributed. After 18 to 24h at 37°C, on a microbiological oven, the radius of the inhibition zone was measured and registered in millimetres.

## 2.5 THE DETERMINATION OF THE MIC

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the synthesized AgNPs was carried out using the protocols of the *Clinical Laboratory Standard Institute* [21]. The *P. aeruginosa* was grown and suspended to 0.5 cell count density on McFarland scale, then diluted on Müller-Hinton broth (MHB) to 1:100, giving a bacterial concentration of  $1.5 \times 10^6$  FCU/mL<sup>-1</sup>.

The microdilution assay was realized on 96-well microplates (Corning®) on grading concentrations of the AgNPs previously diluted in MHB. The bacteria were added in each, then incubated in a microbiological oven for 24h at 37°C. The sample that shows the lower turbidity at the unaided eye corresponds to the MIC. This essay

was carried run on triplicate, parallely with negative control (only bacteria, no AgNPs) and only solvent (AgNPs free).

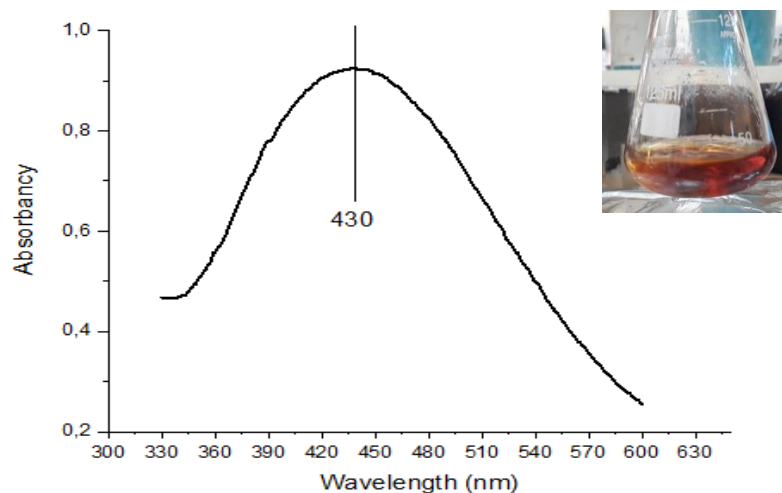
## **2.6 TIME-KILL ASSAY**

The time-kill assay followed the NCCLS standard protocols [22]. Bacterial strains formerly grown on MHA to 0.5 on the McFarland scale were diluted 1:100 in Müller-Hinton broth, MHB, to the concentration of  $1.5 \times 10^6$  FCU/mL. Thus, was transferred to microtubes, at which each AgNPs were added at their respective MIC. This experiment was run in triplicate with incubation times of 1, 2, 3, and 4 hours; the aliquots for each time were diluted and transferred to MHA plates, incubated at 37 °C for 24h, to determine the bacterial concentration in FCU/mL. The logarithmic curve for the bacterial population (FCU) was constructed in the function of the time of incubation (time-kill).

## **3 RESULTS**

### **3.1 THE AGNPs SYNTHESIS AND ITS CORRELATION WITH TEMPERATURE**

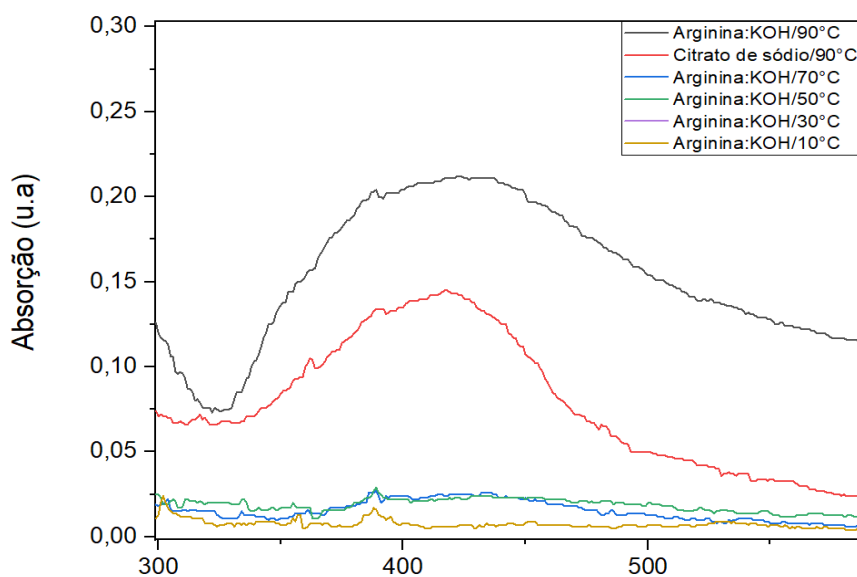
The colloidal solution of AgNPs was prepared to reduce  $\text{AgNO}_3$  on an aqueous solution with an also aqueous solution of arginine and potassium hydroxide. The temperature in which the titration and reducing reaction was carried out was chosen after testing the process in a range from 10°C to 90°C, and the last one showed a lasting dark orange color. At mild temperatures, no change in the color was observed and only at 90°C did the dark orange an absorption curve was observed that could be attributed to AgNPs, FIGURA 1.



**FIGURA 1.** UV-Vis absorption scanning spectrum of the AgNPs synthesized with  $\text{AgNO}_3$  and arginine in alkaline solution. The insert shows the AgNPs sample synthesized with Arginine: KOH as a reducing agent obtained at  $90^\circ\text{C}$ .

No change in the color of the samples synthesized at mild temperatures, nor nanoparticles was observed on the UV-Vis spectra, FIGURA 2, the exceptions were the ones at  $90^\circ\text{C}$ , using alkaline arginine or citrate as reducing agents that shown characteristic dark orange translucent solution, usually attributed to AgNPs [23,24]. A solution of sodium citrate was used as a reducing agent, at  $90^\circ\text{C}$ , showing a similar absorption spectrum to the Arginine: KOH at the same temperature.

This temperature is on the edge for the water as a solvent, near to the boiling point, but still green-friendly and sustainable and from the industrial point of view, work at these temperatures is plausible [25].



**FIGURA 2.** Spectra of the samples obtained after titration of Arginine and KOH against  $\text{AgNO}_3$  solutions at different temperatures.

### 3.2 CHARACTERIZATION OF THE AgNPs BY UV-VIS SPECTROSCOPY

The product color solution, dark orange, analyzed on UV-Vis shows the spectra absorption with the peak at 430 nm, FIGURA 1, lead up by the plasmonic resonance as a result of the geometry and distances between the nanoparticles. Umpteen authors describe the relations of the wavelength of the plasmonic resonance absorption with the size and shape of the silver nanoparticle [26,27,28]. The observed peak at 430 nm is related by many of them as a spheroid nanoparticle with 40 nm wide in diameter; otherwise, the spectra of non-spherical nanoparticles, discs and triangular, present as well red-shifted colors and multiple peaks due to the anisotropy [26].

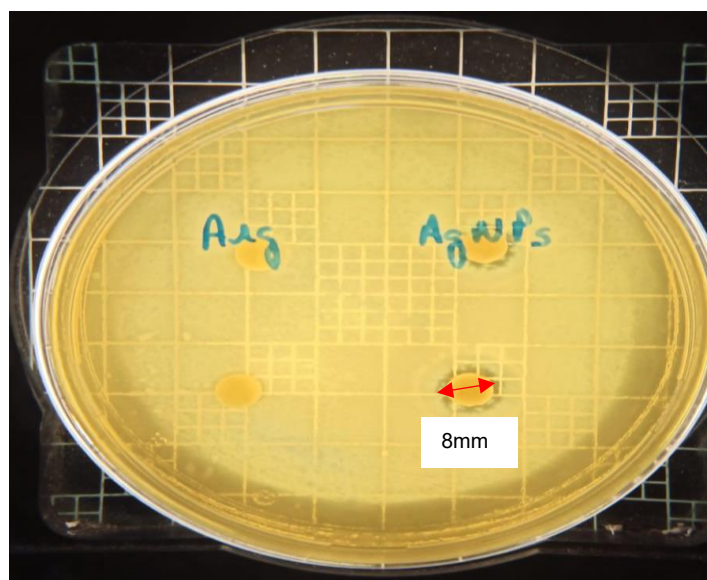
PSD measurements showed the formation of AgNPs with an average size of 57.88 nm, which is in agreement with what was previously observed by the UV-Vis spectra.

### 3.3 ANTIBACTERIAL ACTIVITY

#### 3.3.1 Disk diffusion test

The Disk Diffusion test has shown that the synthetic process with alkaline Arginine succeeds to produce antimicrobial AgNPs, testing it against *P. aeruginosa*. The results observed in **Erro! Fonte de referência não encontrada.** demonstrate the antimicrobial activity, killing bacteria generating an inhibition hale with 8 mm in diameter around the disk previously embedded with AgNPs solutions.

The limitation of this assay is related to the diffusion of the compound on the media as the preclude that agar imposes, as well the active volume [29]. Arginine is the most alkaline of the 20 biological amino acids, and *P. aeruginosa* is susceptible to the pH changes that it causes on the medium, which play a role in bacterial biofilm development and for diseases such as cystic fibrosis in lungs where the pH is acidic [30]. The arginine as a carrier for nanoparticulated silver seems to be a good therapeutical alternative, which was seen in results obtained from the diffusion test.



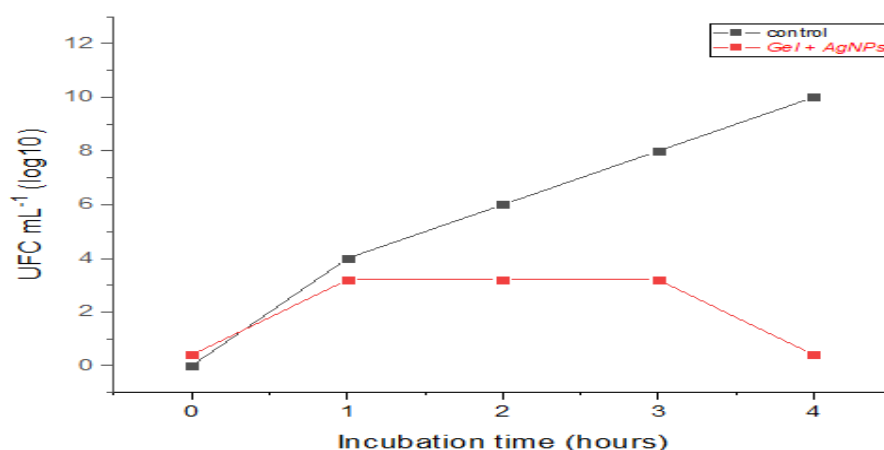
**FIGURA 3.** Result of the disk diffusion test, performed in duplicate for samples of arginine solution (Arg) and solution of silver nanoparticles (AgNPs).

### 3.3.2 Minimum Inhibitory Concentration

The lower concentration able to kill the bacteria was 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which can be considered highly effective against *P. aeruginosa*. This result is in agreement with obtained by other authors that describe MIC in a range of 1.406 to 5.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [18].

### 3.3.3 Time kill essay

The time-kill assay, 0, shows that exposed to AgNPs, after 3 h, all the *P. aeruginosa* population was eradicated, which corresponds to bactericide effectiveness of 99.9999%. The bactericide activity last for all the running time of the experiment, 24h, in other words, that means that the AgNPs have a prolonged effect.



Time Kill essay of the susceptibility of *P. aeruginosa* ATCC (9027) to the AgNPs synthesized with AgNO<sub>3</sub>: Arg: KOH.

#### 4 DISCUSSION

The search for green and sustainable chemical processes and products drove this work. The AgNPs were produced reducing the silver ions in solution using AgNO<sub>3</sub> as precursor agent and the amino acid arginine as a reducing agent associated with potassium hydroxide as a carrier.

The synthesis effectiveness of the AgNPs using amino acids was previously described by Shankar and Rhim [31], that have used tryptophane and tyrosin to obtain silver nanoparticles, incorporated in agar they showed bactericide activity. The arginine, along with the physiological factors, shows inorganic interaction with metals, acting as Lewis base due to the free pairs of electrons on the amine and carboxyl groups, allowing it to link with non-filled orbitals transition metals, leading to metallic complexes. This metallic process show high-affinity values and its neutral form linkage enthalpy is -80.5 kcal.mol<sup>-1</sup> at 298 k, and free energy of -70.3 kcal.mol<sup>-1</sup>, both outstanding numbers [17].

Shoeib and cols. has shown that the linkage is formed by the interaction of the terminal nitrogen, the second with the carboxyl oxygen, and the amide nitrogen [17]. Thus, the interaction between arginine and the ion Ag lay to a molecular structure, bactericide, time stable, with inherent low toxicity and reduced risk of environmental liability.

The proposed synthesis had proven to be successful when the color dark orange, or reddish- orange, was achieved. The characteristic absorption peak at ~430

nm, as was previously described can be related to particles sized 50 to 60 nm, a well-covered relation between the plasmonic absorption peak and the particle dimension [32].

The shape and size of the nanoparticles were the main factors that raise the spectral range of resonance and the correspondent wavelength, likewise the effective mass, electronic density and the interaction with stabilizer agents. The bigger the particle is, the higher the wavelengths of optic absorption [33].

The antibacterial effect of the AgNPs is correlated with the particle dimension, the higher the diameter, the wicker the activity [5]. Choi and cols. [34] correlates the AgNPs dimensions and its permeability to bacterial membranes, that smaller particles are more effective as antibacterial agents. Nanoparticles in the range between 20 – 80 nm present antimicrobial activity [35,36,37]

The UV-Vis spectrum of the AgNPs synthesized with Arginine: KOH: AgNO<sub>3</sub> at 90°C, with only one plasmon surface resonance band discloses the spheroid shape and the absence of anisotropic particles. The wide range of wavelengths, the center of the absorption peak and its intensity are correlated with size; the surface coverage rate and size are inversely correlated. At higher surface coverage rates long-range order appears with the formation of ordered structures. Typically the plasmon wavelength resonance at 400 to 450 nm presents values close to ~27% for ~50 nm wide spheroid structures [38,39].

*P. aeruginosa* is widely known for its association with high infection rates, for its variety of mechanisms for intrinsic resistance, biofilm production, and carrying resistance genes and plasmids [20]. This strain acquires additional mechanisms to develop resistance through mutations and acquisition of mobile genetic elements, such as  $\beta$ -lactamases (Ambler's class A and D), Cephalosporinase (AmpC enzymes), Metallo- $\beta$ -lactamases, efflux pumps (fluoroquinolones), porine loss, LPS protection from aminoglycosides [40,41,42].

Is known that AgPNs have a wide spectrum of bactericide activity, linking at the cellular membrane and increasing the permeability, due to structural changes that result at the end promote the cellular lysis. The AgNPs induct the membrane break out, creating breaches to the intake of Ag inside the cell despite the eventual acquired porine loss resistance [43].

## 5 CONCLUSION

This work presents the synthesis of AgNPs using an alkaline solution of Arginine as a reducing agent for AgNO<sub>3</sub>, at 90°C using titration as a technical procedure. The product was characterized by UV-Vis and Dynamic Light Scattering.

The bioassays - Disk-diffusion test, MIC and killer-time - shown that thus produced AgNPs are effective against *P. aeruginosa*, granting for this product the proof of efficiency as bactericide produced using water as the solvent and sustainable reagents with virtually low environmental impact.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The Authors would like to thank the Nacional Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

## REFERENCES

- [1] Irahal, I.N., Azzahra, F.L., Hmimid, F., Guenaou, I., Diawara, I., Kettani-Halabi, M., Fahde, S., Ouafik, L., Bourhim., N. Identification of the chemical composition of six essential oils with mass spectroscopy and evaluation of their antibacterial and antioxidant potential. J. Flavour Fragrance. 2021. 36 (4): 465-476. doi.org/10.1002/ffj.3657
- [2] Arab, F. E. **Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e prata em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.** Dissertação de Mestrado. Universidade federal de São carlos. São carlos/SP. 2018
- [3] Brasil, M.S.L. **Atividade antimicrobiana da combinação de nanopartículas de prata, quitosana e antibióticos avaliada por ensaios de concentração inibitória mínima e espectroscopia SERS.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG. 2017.
- [4] Mlalila, N., Swai, H., Hilonga, A., & Kadam, D. (2016). Antimicrobial dependence of silver nanoparticles on surface plasmon resonance bands against in *Escherichia coli*. **Nanotechnology, Science and Applications.** 2016. 10:1-9. <https://doi.org/10.2147/NSA.S123681>
- [5] Feng, Q.L.; Wu, J.; Chen, G.Q.; Cui, F.Z.; Kim, T.N.; Kim, J.O. A mechanistic study

of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2000. 52 (4): 662-668.

[6] Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M.; Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007. 1712-1720.

[7] Tran, Q.H.; Nguyen, V.Q.; Le, A.T.; Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications, and perspectives. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**. 2013. 4: 1-20.

[8] Lee, S. H., & Jun, B.-H. (2019). Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. 20(4): 865. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>

[9] Bastus, N.G.; Merkoci, F.; Piella, J.; Puentes, V. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. **Chem. Mater.** 2014. 26: 2836–2846. [dx.doi.org/10.1021/cm500316k](https://doi.org/10.1021/cm500316k)

[10] Sudipa Panigrahi, Soumen Basu, Snigdhamayee Praharaj, Surojit Pande, Subhra Jana, Anjali Pal, Sujit Kumar Ghosh, and, & Tarasankar Pal. *Synthesis and Size-Selective Catalysis by Supported Gold Nanoparticles: Study on Heterogeneous and Homogeneous Catalytic Process*. **Phys. Chem. C**. 2007. 111, (12): 4596-4605. <https://doi.org/10.1021/JP067554U>

[11] Tolaymat, T. M., el Badawy, A. M., Genaidy, A., Scheckel, K. G., Luxton, T. P., & Suidan, M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. **Science of The Total Environment**. 2010. 408 (5): 999–1006. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2009.11.003>

[12] Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; e Lin, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Institute of Technology**. 2008. 154: 83 – 96.

[13] Boselt, I.; Wilke, T. e Waitz, T. School Experiments on the Biototoxicity of Metal and Metal Oxide Nanoparticles. **New Perspective in Science Education**. Conference International. 4. Disponível em: [conference.pixel-online.net](http://conference.pixel-online.net). Acesso em: jan.2021.

[14] Almeida, E.S. **Biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata por *Fusarium oxysporum***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/ SC, 2016.

[15] Justus, B. **Síntese verde, caracterização e avaliação citotóxica de nanopartículas de prata e ouro funcionalizadas para o potencial tratamento de leucemia mieloide crônica**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa/PR, 2020.

[16] Martins, N. E. **Caracterização e avaliação de atividades biológicas de extratos de *Hibiscus sabsariffa* L. e de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí. Parnaíba/PI, 2018.

- [17] Tamer Shoeib, K. W. Michael Siu, and, & Hopkinson\*, A. C. *Silver Ion Binding Energies of Amino Acids: Use of Theory to Assess the Validity of Experimental Silver Ion Basicities Obtained from the Kinetic Method*. **J. Phys. Chem.** 2002. 106 (25): 6121-6128. <https://doi.org/10.1021/JP013662Z>
- [18] Liao,S., Zhang,Y., Pan,X., Zhu, F., Jiang,C., Liu, Q., Cheng, Z., DAI, G., Wu, G., Wang, L., Chen, L. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Nanomedicine**. 2019. 14:1469–1487.
- [19] Sitarek, P. et al. Potential Synergistic Action of Bioactive Compounds from Plant Extracts against Skin Infecting Microorganisms, **Int. J. Mol. Sci.** 2020. 21(14): 5105. [doi.org/10.3390/ijms21145105](https://doi.org/10.3390/ijms21145105)
- [20] Salomoni, R.; Léo, P.; Montemor, A.F; Rinaldi, B.G.; Rodrigues, M.F.A. Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. Nanotechnology, **Science and Applications**. 2017.10: 115–121.
- [21] CLSI (THE CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests of bacteria that grow aerobically**, document M07-A10—tenth Edition. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.
- [22] NCCLS. **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents**. 1999.
- [23] Almaquer, F. E. P., Ricacho, J. S. Y., & Ronquillo, R. L. G. Simple and rapid colorimetric sensing of Ni(II) ions in tap water based on the aggregation of citrate-stabilized silver nanoparticles. **Sustainable Environment Research**. 2019. 29(1). <https://doi.org/10.1186/s42834-019-0026-3>
- [24] la Spina, R., Mehn, D., Fumagalli, F., Rossi, F., Gilliland, D., Holland, M., & Reniero, F. Synthesis of citrate-stabilized silver nanoparticles modified by thermal and ph preconditioned tannic acid. **Nanomaterials**. 2020. 10(10): 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano10102031>
- [25] Natsuki, T., & Hashimoto, Y. A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. **International Journal of Materials Science and Applications**. 2015. 4(5): 325–332. <https://doi.org/10.11648/j.ijmsa.20150405.17>
- [26] Khurana, K., & Jaggi, N. Localized Surface Plasmonic Properties of Au and Ag Nanoparticles for Sensors: a Review. **Plasmonics**. 2021. 16(4): 981–999. <https://doi.org/10.1007/s11468-021-01381-1>
- [27] Mekshun, A. v., Moritaka, S. S., Kondorskii, A. D., & Lebedev, V. S. Comparative Analysis of Optical Spectra of Plasmonic Nanoparticles of Different Geometrical Shapes. **Bulletin of the Lebedev Physics Institute**. 2020. 47(9): 276–279. <https://doi.org/10.3103/S1068335620090031>
- [28] Mock, J. J., Barbic, M., & Smith, D. R. Shape effects in plasmon resonance of

individual colloidal silver nanoparticles ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN. *J. Chem. Phys.* 2002. 116: 6755. <https://doi.org/10.1063/1.1462610>

[29] Flanagan, J. N., & Steck, T. R. The Relationship Between Agar Thickness and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Indian Journal of Microbiology*. 2017. 57(4): 503–506. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0683-z>

[30] Lin, Q., Pilewski, J. M., & Di, Y. P. Acidic Microenvironment Determines Antibiotic Susceptibility and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. 2021. 12: 3459. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.747834>

[31] Shankar, S.; Rhim, J. W. Tocopherol-mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial PBAT/silver nanoparticles composite films. *LWT - Food Science and Technology*. 2016. 72: 149–156.

[32] Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. v., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*. 2007. 84(2): 322. <https://doi.org/10.1021/ed084p322>

[33] Brause, R., Möltgen, H., & Kleinermanns, K. Characterization of laser-ablated and chemically reduced silver colloids in aqueous solution by UV/VIS spectroscopy and STM/SEM microscopy. *Applied Physics B: Lasers and Optics*. 2002. 75(6–7): 711–716. <https://doi.org/10.1007/s00340-002-1024-3>

[34] Choi, O., Deng, K. K., Kim, N.-J., Ross, L., Surampalli, R. Y., & Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*. 2008. 42(12): 3066–3074. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2008.02.021>

[35] Sofi, H. S., Akram, T., Shabir, N., Vasita, R., Jadhav, A. H., & Sheikh F. A. Regenerated cellulose nanofibers from cellulose acetate: Incorporating hydroxyapatite (HAp) and silver (Ag) nanoparticles (NPs), as a scaffold for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering*. 2021.118:111547. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111547>

[36] Medeiros, C.H.S. **Estudo das Propriedades Antimicrobianas de Filmes de Nanocelulose e Nanopartículas de Prata**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP, 2019.

[37] Bundjaja, V., Santoso, S. P., Angkawijaya, A. E., Yuliana, M., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., Ayucitra, A., Gunarto, C., Ju, Y. H., & HO, M. H. Fabrication of cellulose carbamate hydrogel-dressing with rarasaponin surfactant for enhancing adsorption of silver nanoparticles and antibacterial activity. *Materials Science and Engineering*. 2021. 118: 111542 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111542>

[38] Bai, Y., Yan, L., Wang, J., Su, L., Chen, N., & Tan, Z. Highly reproducible and uniform SERS substrates based on Ag nanoparticles with optimized size and gap. *Photonics and Nanostructures - Fundamentals and Applications*. 2017. 23: 58–63. <https://doi.org/10.1016/J.PHOTONICS.2016.12.002>

[39] Manai, L., Dridi Rezgui, B., Benabderrahmane Zaghouani, R., Barakel, D.,

Torchio, P., Palais, O., & Bessais, B. Tuning of Light Trapping and Surface Plasmon Resonance in Silver Nanoparticles/c-Si Structures for Solar Cells. *Plasmonics*. 2016. 11(5): 1273–1277. <https://doi.org/10.1007/s11468-015-0171-4>

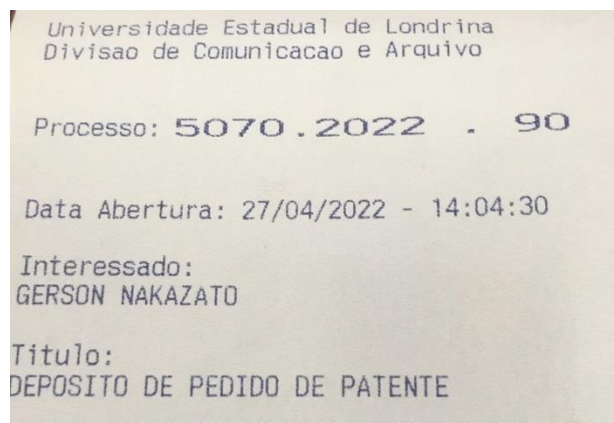
[40] Barani, M., Zeeshan, M., Kalantar-Neyestanaki, D., Farooq, M. A., Rahdar, A., Jha, N. K., Sargazi, S., Gupta, P. K., & Thakur, V. K. Nanomaterials in the Management of Gram-Negative Bacterial Infections. *Nanomaterials*. 2021. 11(10): 2535. <https://doi.org/10.3390/nano11102535>

[41] Lambert, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2002. 95(Suppl 41): 22–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216271>

[42] Moyne, O., Castelli, F., Bicout, D. J., Boccard, J., Camara, B., Cournoyer, B., Faudry, E., Terrier, S., Hannani, D., Huot-Marchand, S., Léger, C., Maurin, M., Ngo, T.-D., Plazy, C., Quinn, R. A., Attree, I., Fenaille, F., Toussaint, B., & le Gouëllec, A. Metatypes of *Pseudomonas aeruginosa* Correlate with Antibiotic Resistance, Virulence and Clinical Outcome in Cystic Fibrosis Chronic Infections. *Metabolites*. 2021. 11(2): 63. <https://doi.org/10.3390/metabo11020063>

[43] Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*. 2016. 7: 1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>

## ANEXO B PATENTE DE INVENÇÃO



### RELATÓRIO DESCRITIVO

## **GEL DE NANOCELULOSE COM ÁCIDO HIALURÔNICO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS**

### CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção trata-se de um gel nanobiocompósito de liberação sustentada, tópico hidrofílico composto por nanocelulose, ácido hialurônico, sorbato de potássio e nanopartículas de prata como agente antimicrobiano.

[2] A presente invenção tem ação antimicrobiana para o tratamento e controle de infecções em humanos e em outros animais.

### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[3] Medicamentos antibióticos são a base no tratamento de infecções bacterianas, contudo, o crescente aumento de bactérias multirresistentes tornam os medicamentos ineficientes e geram limitações nos tratamentos. Ainda, quase todas as substâncias

antimicrobianas em altas concentrações apresentam efeitos adversos ao hospedeiro, como também ao ambiente.

[4] Estudos mostram que as nanopartículas metálicas como as de prata atraem, há milênios, significativo interesse por suas propriedades funcionais, principalmente relacionadas a atividade antimicrobiana. A prata em nanoescala, exibe um conjunto diversificado de mecanismos de ação de forma aprimorada, devido ao aumento da sua área de superfície e potencial de alto alcance, apresentando amplo espectro contra várias cepas de bactérias e patógenos, com efeito de longa duração em baixas concentrações, o que limita relativamente a toxicidade da prata para as células humanas e torna a aquisição de resistência microbiana às nanopartículas muito difícil.

[5] A nanocelulose é um dos biopolímeros mais estudados. Devido as propriedades químicas da sua cadeia molecular, estrutura que pode ser rearranjada, a nanocelulose realiza fortes interações com as moléculas de outros compostos associados a ela, produzindo novos materiais. Matrizes à base de nanocelulose são ideais para aplicações em tecidos, devido suas características de ser biocompatível e não imunogênica, a nanocelulose possibilita seu uso como nanobiocompósitos, e pode ser aprimorada quando tornada híbrida.

[6] O nanobiocompósito constituído da composição entre nanocelulose e ácido hialurônico, forma uma rede hidrofílica capaz de reter grandes quantidades de água, se tornando semelhante aos tecidos biológicos e com capacidade de incorporar agentes com finalidade específicas, dando origem a eficientes sistemas de liberação.

[7] A presente invenção é proposta como alternativa para o tratamento e controle de infecções usando nanopartículas de prata como agente antimicrobiano. Se apresenta numa formulação com compostos na escala nanométrica, constituído por um sistema de liberação formado por nanocelulose com ácido hialurônico.

[8] A composição desta invenção compreende um gel nanobiocompósito com propriedades interessantes para a finalidade do produto, como estabilidade, poder residual, fácil aplicação e elevada ação bactericida em baixas concentrações do agente.

[9] A patente KR20160085152A (KOREA ATOMIC ENERGY RES, 2016) intitulada “Composto de Hidrogel Compreendendo nanocelulose e método de fabricação dos mesmos” compreende a invenção de um material composto de hidrogel, constituído a partir de um polímero hidrofílico com uma estrutura tridimensional em forma de rede incluindo nanocelulose. A invenção se refere apenas a composição de estrutura de rede, compreendendo em um método diferente do proposto nesta invenção.

[10] A patente CN105665746A (CHANGZHOU DAAO NEW MAT TECH CO LTD, 2016) intitulada “Método para preparar nano-prata a partir de hidrogel de nanocelulose” revela um método para preparar nanopartículas de prata a partir de hidrogel nanocelulose. O método compreende a produção da nanocelulose a partir das fibras de bambu e posterior redução da prata onde íons desta são adsorvidos através da estrutura de rede interna do hidrogel. O método, mesmo apresentando os componentes nanocelulose e nanopartículas de prata, difere por completo dos objetivos finais ao qual a essa invenção foi proposta.

[11] A patente CN110483810A (UNIV GUANGXI, 2019) intitulada “Método de preparação de hidrogel de nanocelulose antibacteriano” revela um método de preparação de um hidrogel de nanocelulose antibacteriano. O método compreende etapas de oxidação da nanocelulose por TEMPO. O método difere do proposto desta invenção, uma vez que nesta não há oxidação das cadeias de nanocelulose.

[12] A patente CN110384655A (UNIV ZHEJIANG SCIENCE & TECH, 2019) intitulada “Método de preparação de hidrogel portador de drogas com alta biocompatibilidade”,

revela um método de preparação de um hidrogel carreador de drogas com alta biocompatibilidade. O método de preparação do hidrogel carreador de medicamentos com alta biocompatibilidade, integra em sua composição alginato de sódio e quitosana para entrega de indometacina. O método, mesmo realizando a liberação lenta e sendo biocompatível, não se assemelha ou se relaciona aos componentes desta invenção e ao que se propõem.

[13] Não foram encontradas patentes com processo igual ou semelhante ao descrito neste invento na busca em bancos de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[14] A presente invenção compreende uma composição tópica farmacêutica em gel que engloba o nanobiocompósito constituído pelos biopolímeros de nanocelulose e ácido hialurônico, e no qual é incorporado nanopartículas de prata como agente antimicrobiano. [15] O nanobiocompósito se apresenta na forma de uma rede tridimensional hidrofílica, semelhante aos tecidos biológicos, com elevada concentração de água e excelente capacidade de dispersão do agente.

[16] Vantagens: Ao se incorporar nanopartículas de prata ao nanobiocompósito, obtém-se uma formulação estável e eficaz para o tratamento de infecções causadas por cepas bacterianas, em baixas concentrações do agente, através da liberação direcionada aos locais de infecção de forma simples e controlada, limitando relativamente a toxicidade da prata para as células e tornando a aquisição de resistência microbiana às nanopartículas muito difícil.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[17] A presente invenção fornece uma composição tópica em gel que engloba o nanobiocompósito de nanocelulose com ácido hialurônico, no qual é incorporado nanopartículas de prata, sorbato de potássio como conservante e água purificada como veículo da formulação. Cada um dos adjuvantes presentes nesta composição pode ser encontrado comercialmente, não havendo entraves para o escalonamento deste sistema de liberação.

### **1 MÉTODO DE OBTENÇÃO DO COMPOSTO ATIVO**

#### **1.1 Produção das nanopartículas de prata**

[18] A síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) foi realizada pelo método de redução química dos íons prata (Ag) em solução, utilizando o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (0,0618 mol/L) como agente precursor, a Arginina (Arg) (0,1236 mol/L) como agente redutor e o hidróxido de potássio (KOH) (0,309 mol/L) como agente carreador. A razão molar de  $[\text{AgNO}_3]:[\text{Arg}]:[\text{KOH}]$  é de 1:2:5.

[19] Primeiramente, 20 ml de solução redutora são preparadas dissolvendo, de forma concomitante, contendo de 0,41 a 0,45 g de Arg (0,1236 mol/L) e de 0,30 a 0,35 g KOH (0,309 mol/L) em água deionizada. Outra solução de 25 mL é preparada dissolvendo de 0,20 a 0,30 g de  $\text{AgNO}_3$  (0,0618 mol/L) em água deionizada. A solução de Arg/KOH permanece em agitação magnética constante e aquecimento em balão volumétrico em temperatura de 90°C. A partir de então, inicia-se o processo de titulação da solução, com fluxo de 10 mL/h, por cerca de 120 minutos até atingir cor laranja avermelhado. O tamanho das AgNPs é aferido pela absorbância plasmônica por UV-vis na faixa de 400 nm. A imagem da solução sintetizada está apresentada na figura 1.

## **2 MÉTODO DE OBTENÇÃO DOS COMPONENTES DO COMPÓSITO**

### **2.1 Nanocelulose**

[20] A nanocelulose foi obtida comercialmente pré-ativada em pasta (2%). A dispersão ocorreu em fase aquosa no início da etapa de processamento. Quando totalmente dispersa, a nanocelulose possui funcionalidade de gel tixotrópico, por cisalhamento. A concentração do produto foi de 0,1 a 0,5 g/mL. Após dispersão foi adicionado Sorbato de Potássio como conservante na concentração de 0,001 a 0,003 g/mL. Para um alto cisalhamento, utilizou-se de um homogeneizador estator-rotor de alta velocidade de agitação a 10.000 rpm por cerca de 10 minutos.

### **2.2 Ácido hialurônico**

[21] O ácido hialurônico foi preparado utilizando-se de ácido hialurônico comercial numa composição de suspensão a 1%, na concentração do produto de 0,01 a 0,05 g/mL. Inicialmente o produto foi diluído em água ultrapura e homogeneizado em estator-rotor de alta velocidade de agitação, em 10.000 rpm por aproximadamente 5 minutos, até consistir em gel.

## **3 PREPARO DA FORMA FARMACÊUTICA FINAL - GEL**

[22] A presente invenção deve ser preparada em quatro etapas:

Etapa 1 - Primeiramente o gel de nanocelulose deve ser preparado conforme descrito pelo fornecedor. Dilui-se aos poucos o total em gramas do composto nanocelulose mais o total em gramas do conservante sorbato de potássio, adicionando-se o total de água sob agitação constante, através do emprego de um Ultra Turrax em velocidade de 10.000 rpm até formar gel consistente.

Etapa 2 - Refere-se à dissolução do ácido hialurônico no total em gramas do composto até obter gel.

Etapa 3 - Na terceira etapa, ocorre a homogeneização dos dois géis (etapa 1 e etapa 2) utilizando homogeneizador estator-rotor de alta velocidade de agitação a 10.000 rpm por aproximadamente 5 minutos, constituindo a matriz de liberação (nanobiocompósito).

Etapa 4 - Refere-se à incorporação do composto ativo (nanopartículas de prata) ao gel obtido na etapa 3 (matriz de liberação), adicionando o volume total do composto, de 1 a 5  $\mu\text{L}$  e homogeneizando de forma manual com auxílio de bastão de vidro. A imagem da Forma farmacêutica final do gel obtido está apresentada na figura 2.

## **4 CARACTERIAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE NANOCELULOSE, ÁCIDO HIALURÔNICO E DE PRATA**

### **4.1 Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)**

[23] A identificação das nanopartículas de prata foi realizada pela técnica de espectroscopia de UV-Vis. Amostras foram diluídas em água deionizada na razão de 1:10 (v/v) e submetidas a leituras de absorção em cubeta de vidro com caminho óptico de 10 mm. A espectroscopia envolveu a absorção da radiação ultravioleta/visível, na faixa de 200 a 600 nm pela espécie. O alcance do diâmetro das nanopartículas formadas foi baseado na metodologia descrita por SOLOMON, et al 2007. De acordo com o espectro de UV-Vis, as AgNPs sintetizadas apresentaram absorbância máxima em torno de 430 nm, que de acordo com a referência utilizada, corresponde ao tamanho de partícula entre 50-60 nm, seguindo a relação entre pico de absorção plasmônica e dimensão de nanopartícula. O espectro de absorção ultravioleta visível

das nanopartículas de prata (AgNPs) formadas está apresentado na figura 3.

#### **4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

[24] Para obter o tamanho, forma e arranjo das partículas de nanocelulose e de ácido hialurônico e a relação entre elas na escala nanométrica foi realizada análise por MEV. Verificou-se os níveis de alteração microfibrilar, a formação e a medida de espessura do filme constituído.

[25] Uma pequena porção da amostra foi espalhada sobre lamínula (pedaço em torno de 1 cm<sup>2</sup>) e passou por processo de secagem em sala com umidade e temperatura controladas em 20°C por 48 horas. A lamínula com a amostra foi fixada sobre "Stub" contendo fita de carbono dupla face. A amostra recebeu uma camada de ouro de aproximadamente 20 nm de espessura sobre a superfície por meio do equipamento Sputter Coater marca Bal-Tec, modelo SCD 050 e analisado em microscópio eletrônico marca Philips, modelo: Quanta 200.

[26] Como resultado, foi possível observar um arranjo randômico numa estrutura tridimensional com presença de pequenos poros na forma de uma rede de tamanhos variados, com grande compactação nas microfibrilas, diminuindo a percepção de profundidade e preenchendo toda rede de nanofibrila da celulose. Foi possível observar ainda, fibrilas mais espessas que aparentam ser compostas por várias camadas, confirmando que a adição de AH proporcionou diferenças significativas na composição do gel.

#### **4.3 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)**

[27] Para comprovar a formação de compósito entre os dois biopolímeros (nanocelulose e ácido hialurônico), realizou-se análise de FT-IR. Para análise, 50 g do gel foi disposto em placa de Petri e submetido a secagem natural por 48 horas.

Após secagem completa, houve a constituição de um filme que foi triturado e prensado por meio de prensa hidráulica, formou-se pastilhas com KBr e foram realizadas leituras de transmitância com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  na faixa de absorção de 4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Foi utilizado o espectrofotômetro de infravermelho da marca Shimadzu, modelo IR PRESTIGE-21. As imagens foram processadas utilizando-se o software OriginPro 9.5. Como resultado, confirmou-se a presença e a integridade da junção dos biopolímeros, por meio de influências na composição química, que fora acompanhado pela mudança de bandas características. O gráfico de FT-IR com as bandas características está apresentado na figura 4

#### **4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

[28] Para verificar as propriedades físicas relativas ao comportamento sob variação de temperatura realizou-se análise de Calorimetria de varredura diferencial (DSC). O termograma de DSC apresentou comportamento de substância higroscópica considerando o evento endotérmico intenso, em intervalo de temperatura entre  $70^{\circ}\text{C}$  e  $80^{\circ}\text{C}$ , relacionado a perda de água. Houve também a ocorrência de dois eventos exotérmicos, um no intervalo de temperatura de  $200^{\circ}\text{C}$  e  $220^{\circ}\text{C}$  e outro no intervalo de  $310^{\circ}\text{C}$  a  $330^{\circ}\text{C}$ . A ocorrência desses picos próximos se relaciona a mistura de nanocelulose com ácido hialurônico, comprovando a interação e a estabilidade térmica e posterior degradação de cada biopolímero. O gráfico de DSC com eventos obtidos está apresentado na figura 5.

## **5 CARACTERIZAÇÃO DO GEL FORMULADO**

### **5.1 Análise de cor**

[29] A análise de cor da formulação foi realizada por Colorimetria, através de comparação visual, sob condições de luz branca. A análise visual da cor da amostra

foi realizada com 3,0 g da amostra acondicionada em vidro relógio, colocada sobre fundo branco e/ou preto. O gel apresentou coloração branca e a amostra foi classificada como normal, sem alteração.

## **5.2 Análise de Odor**

[30] O odor da amostra foi avaliado de forma olfativa direta. A amostra foi classificada como normal, sem alteração, apresentando odor característico das matérias-primas utilizadas.

## **5.3 Análise da Aparência**

[31] A amostra foi acondicionada em vidro relógio e colocada sobre fundo preto. A avaliação foi de forma visual, a fim de avaliar as características macroscópicas para verificação de sinais de instabilidade. A não ocorrência de separação de fases, de precipitação e de turvação, indicou estabilidade inicial da amostra ensaiada, sendo classificada como normal, estável e homogêneo

## **5.4 Aspecto Morfológico e Centrifugação**

[32] Para análise do Tempo de Prateleira, amostras do gel foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em local seco e em temperatura ambiente pelo prazo de 1 ano (21/01/2021 a 21/01/2022). Não houve intercorrências e nem abertura dos frascos durante esse período. Ao fim, todas as amostras mantiveram as mesmas características de quando armazenadas, não apresentando alterações e separação de fases.

[33] Para comprovar a estabilidade e a hidrofiliabilidade do gel, foram realizadas análise morfológica por centrifugação. Foram utilizados 5 g da amostra em tubos de ensaios cônicos, graduados e plásticos e a Centrífuga. A amostra foi centrifugada (Centrífuga

Baby I Fanem 206-BL) em 2.800 rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os resultados mostraram separação de fase entre os biopolímeros constituintes do bionanocompósito e a água. Este fator, comparado ao teste de prateleira, comprova a característica de hidrofiliabilidade do sistema de liberação constituído, com capacidade de absorver e reter elevada quantidade de água. As amostras foram classificadas como normais e sem alterações. A imagem do teste de centrifugação está apresentada na figura 6.

### **5.5 Análise do pH**

[34] O pH foi determinado utilizando-se de pHmetro digital (Tecpron, Brasil) na temperatura ambiente ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ), calibrado com solução tampão (pH 4,0 e 7,0). Os valores obtidos foram iguais a pH 5,8 de média, próximo a neutralidade. Os valores são satisfatórios para utilização e importantes para a estabilidade do produto.

### **5.6 Análise da densidade**

[35] A densidade foi avaliada utilizando picnômetro de vidro, com capacidade de 10 mL e temperatura monitorada em  $25^\circ\text{C}$ . A relação entre a massa da amostra e a massa da água, ambas a  $25^\circ\text{C}$  representam densidade específica da amostra ensaiada. A formulação apresentou densidade de  $1,0424 \text{ g/cm}^3$ , próximo da densidade da água de  $1,0000 \text{ g/cm}^3$ .

### **5.7 Espalhabilidade**

[36] A espalhabilidade máxima para a formulação alcançou  $3019,1 \text{ mm}^2$ . Os resultados mostraram que a formulação obteve aumento do perfil de espalhabilidade, demonstrando que os componentes incorporados representam um papel essencial na determinação da eficácia, visto que a espalhabilidade afeta as propriedades de

aplicação do gel. O gráfico de espalhabilidade está apresentada na figura 7.

## **6 TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

### **6.1 Cepa bacteriana**

[37] Foi utilizada a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), pertencentes à coleção bacteriana do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas (CCB), da Universidade Estadual de Londrina (UEL). As amostras bacterianas foram armazenadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) contendo 20% de glicerol, e mantidas a -80°C até o momento do uso.

### **6.1 Teste de Difusão em Ágar**

[38] Para o teste foi utilizado o meio de cultura Ágar Müller-Hinton em placas de Petri para crescimento microbiano. As bactérias crescidas foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) de acordo com a escala de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL e a suspensão foi inoculada em placa com ágar Muller-Hinton (MHA) utilizando haste flexível de algodão esterilizado. Discos de papel esterilizado contendo 10 µL da solução de AgNPs foram colocados na superfície da placa de ágar, e incubadas por 24 horas a 37°C. O resultado mostrou a formação de zona de inibição com a formação de um halo, o qual foi mensurado em 8 mm de diâmetro.

### **6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

[39] A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada por ensaio de microdiluição de caldo em microplacas de 96 poços de acordo com o protocolo do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2015). A cepa *Pseudomonas aeruginosa*

(ATCC 9027) foi cultivada e suspendida de acordo com a escala de 0,5 McFarland, onde a suspensão bacteriana foi diluída em caldo Muller Hinton para uma proporção de 1:100, inoculada com densidade de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL, e as microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. O resultado foi aferido de forma visual por meio da turbidez, e mostrou ação com um valor de MIC de 1,5 µg/mL.

### **6.3 Determinação do Tempo de Morte (*Time Kill*)**

[40] O potencial antimicrobiano do gel foi avaliado por curva de sobrevivência e morte microbiana e determinada de acordo *National Committee for Laboratory standards* (NCCLS). A cepa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foi cultivada e suspendida de acordo com a escala de 0,5 McFarland, onde a suspensão bacteriana foi diluída em caldo Muller Hinton para uma proporção de 1:100 e inoculada com densidade de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL. O gel foi testado de acordo com a CIM previamente determinada em ensaio anterior, e comparado com o controle bacteriano positivo.

[41] A curva foi desenvolvida em triplicata com diferentes tempos de ação (0, 1, 2, 3 e 4 horas), onde alíquotas de cultura bacteriana diluídas foram transferidas para uma placa com Ágar Muller Hinton, para quantificar o número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (UFC). A placa foi incubada em 37°C por 24 horas. O resultado mostrou após 24 horas de incubação, que a partir de 1 hora, o gel mostrou efeito bacteriostático e a partir de 3 horas, toda população bacteriana foi erradicada, apresentando efeito bactericida com eficiência de 99,999%. A curva do tempo de morte está apresentada na figura 8.

### **DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

Figura 1 – Apresenta a imagem da solução obtida após síntese das nanopartículas de prata (AgNPs)

Figura 2 – Apresenta a Forma farmacêutica final.

Figura 3 – Apresenta o gráfico do espectro de absorção ultravioleta visível das nanopartículas de prata (AgNPs) formadas, com pico em 430 nm.

Figura 4 – Apresenta o gráfico do espectro de FT-IR do compósito de nanocelulose com ácido hialurônico.

Figura 5 – Apresenta o gráfico das Curvas de DSC do compósito de nanocelulose com ácido hialurônico.

Figura 6 – Apresenta a imagem do teste de centrifugação realizado com amostra do gel após cumprimento do prazo de tempo de prateleira.

Figura 7 – Apresenta o gráfico com os resultados de espalhabilidade do gel.

Figura 8 – Apresenta a curva do tempo de morte (*Time Kill*), demonstrando a eficiência bactericida do gel.