



GIOVANY EDUARDO RODRIGUES DE MORAES

**Uso de resíduo da indústria de citrus no preparo de nanopartículas de prata
para utilização na formação de biopolímero multicomponente ativo**

Ilha Solteira – SP

2023

GIOVANY EDUARDO RODRIGUES DE MORAES

**Uso de resíduo da indústria de citrus no preparo de nanopartículas de prata
para utilização na formação de biopolímero multicomponente ativo**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Engenharia
de Ilha Solteira – Unesp como parte dos
requisitos para obtenção do título de
bacharelado.

Márcia Regina de Moura Aouada
Orientador

Sidney Souza dos Santos
Coorientador

Ilha solteira – SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

M828u Moraes, Giovany Eduardo Rodrigues de.
Uso de resíduo da indústria de citrus no preparo de nanopartículas de prata para utilização na formação de biopolímero multicomponente ativo / Giovany Eduardo Rodrigues de Moraes. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
44 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2023

Orientador: Márcia Regina de Moura Aouada

Co-orientador: Sidney Souza dos Santos

Inclui bibliografia

1. Celulose bacteriana. 2. Nanotecnologia. 3. Nanopartículas de prata. 4. Casca da laranja. 5. Síntese verde.



Amanda Sertori dos Santos

Bibliotecária - CRB/8-9061
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao
Usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Uso de resíduo da indústria de citrus no preparo de nanopartículas de prata para utilização na formação de biopolímero multicomponente ativo

GIOVANY EDUARDO RODRIGUES DE MORAES

REGULAMENTO SOBRE A AVALIAÇÃO:

ARTIGO 25º - § 2º A apresentação pública do trabalho de TCC deverá ser de no mínimo 20 (vinte) minutos e máximo de 40 (quarenta) minutos. Após um intervalo de 5 (cinco) minutos, haverá a arguição do Trabalho pelos examinadores. O tempo de arguição, será de até 15 (quinze) minutos para cada examinador, e até 15 (quinze) minutos o tempo para a resposta do(a) aluno(a) a cada examinador ou no caso de se optar pelo diálogo, o tempo conjunto entre examinador e acadêmico(a) será de no máximo 30 (trinta) minutos.

ARTIGO 24º - No julgamento do TCC, a banca examinadora deverá avaliar a apresentação oral, escrita e a defesa do trabalho durante a arguição. O conceito final será APROVADO ou REPROVADO.

COMISSÃO EXAMINADORA

1º EXAMINADOR (Orientador-Presidente)

Nome: Márcia Regina de Moura Aouada



Documento assinado digitalmente
MARCIA REGINA DE MOURA AOUADA
Data: 04/01/2024 15:35:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

2º EXAMINADOR Nome: Heloiza Ferreira Alves
Do Prado



Documento assinado digitalmente
HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO
Data: 04/01/2024 14:17:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

3º EXAMINADOR Nome: Fabricio Cerizza
Tanaka



Documento assinado digitalmente
FABRICIO CERIZZA TANAKA
Data: 04/01/2024 14:50:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

CONCEITO

(X) APROVADO

() REPROVADO

Ilha Solteira, 14 de Dezembro de 2023

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Cursos: Agronomia, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica, Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia.

Avenida Brasil Centro, 56 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil

pabx (18) 3743 1000 fax (18) 3742 2735 scom@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

“Nunca se esqueça de quem você é, porque é certo que o mundo não se lembrará. Faça disso sua força. Assim, não poderá ser nunca a sua fraqueza. Arme-se com esta lembrança, e ela nunca poderá ser usada para magoá-lo.”

George R. R. Martin

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Márcia Regina de Moura Aouada pela oportunidade, orientação e conhecimento fornecido, sem eles não conseguiria estar onde estou hoje.

Ao meu coorientador Me. Sidney Souza dos Santos, por sua ajuda no desenvolvimento e realização desse trabalho. Suas ideias e correções tornaram esse trabalho possível.

A todo grupo GCNH, pelo auxílio e contribuição para esse trabalho.

A minha mãe Gislaine Rodrigues da Silva Moraes e meu pai Valdinei Moraes da Cruz, por tornarem sempre meus sonhos possíveis, sem essa estrutura não chegaria onde estou.

A minha namorada Beatriz Santos Lopes, por todo apoio e incentivo durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Fauze Ahmad Aouada, pelo auxílio com equipamentos e conhecimentos gerais.

E a todos que me ajudaram direta e indiretamente no desenvolvimento desse trabalho, minha sincera gratidão.

Resumo

A celulose bacteriana (CB) tornou-se atrativa para o mercado devido às suas propriedades químicas únicas, como alta cristalinidade e biocompatibilidade. Sua obtenção vem da fermentação de bebidas feitas por culturas simbióticas de bactérias presentes que chamamos de scoby. A implementação de nanopartículas de prata (AgNPs) em CB nos permite aplicar este material em diversas áreas. Devido à propriedade antibacteriana das AgNPs, há um grande interesse em diversos setores, principalmente na área biomédica com tratamento de queimaduras e prevenção de infecções. O trabalho tem como principal objetivo sintetizar nanopartículas de prata por síntese verde utilizando o extrato vegetal da casca de *Citrus sinensis* (Laranja), e incorpora-las na superfície polimérica natural (CB). Após a produção e estabilização das AgNPs sob as condições de pH 9 em temperatura de 30°C, foram feitas caracterizações físico-químicas dessas nanoestruturas. Os resultados de DLS exibiram um tamanho médio de $56,1 \pm 2,1$ nm, com PDI de 0,410 e potencial zeta de -50,9mV. Isso sugere que as AgNPs produzidas são estáveis e com populações de tamanhos moderadamente homogêneo. A incorporação foi feita através do processo de imersão da CB na dispersão coloidal. Em seguida foi feita imagens de MEV para verificar a mudança na estrutura após a incorporação das AgNPs. Para atestar uma possível incorporação foi feita análise de EDS da membrana, onde indicou a presença de prata na região avaliada. As amostras de AgNPs-CB obtiveram resultados significativos em dois grupos de bactérias: *E. coli* (Gram-negativa) e *S. aureus* (Gram-positiva), mostrando-se aplicáveis como amostras com potencial antimicrobiana.

Palavras chave: Celulose bacteriana; nanotecnologia; nanopartículas de prata; casca da laranja; síntese verde.

Abstract

Bacterial cellulose (BC) has become attractive to the market due to its unique chemical properties, such as high crystallinity and biocompatibility. It is obtained from the fermentation of beverages made by symbiotic cultures of present bacteria, which we call scoby. The implementation of silver nanoparticles (AgNPs) in BC allows us to apply this material in several areas. Due to the antibacterial property of AgNPs, there is great interest in several sectors, mainly in the biomedical field for burn treatment and infection prevention. The main objective of the work is to synthesize silver nanoparticles through green synthesis using the plant extract from the peel of *Citrus sinensis* (Orange) and incorporate them into the natural polymeric surface (BC). After the production and stabilization of AgNPs, under conditions of pH 9 at a temperature of 30°C, characterization analyses of these nanostructures were carried out. DLS results exhibit an average size of 56.1 ± 2.1 nm, with a PDI of 0.410 and a zeta potential of -50.9 mV. This suggests that the AgNPs produced are stable and have a moderately homogeneous size distribution. The incorporation was done through the BC immersion process in the colloidal dispersion. Next, SEM images were taken to verify the change in structure after the incorporation of AgNPs. To confirm incorporation, EDS analysis of the membrane was carried out, where the presence of silver was confirmed. The AgNPs-CB samples obtained significant results on two groups of bacteria: *E. coli* (Gram-negative) and *S. aureus* (Gram-positive), proving to be applicable as potential antimicrobial samples.

Keywords: Bacterial cellulose; nanotechnology; silver nanoparticles; orange peel; green synthesis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AgNPs	Nanopartícula de prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
CB	Celulose bacteriana
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
EDS	Espectroscopia de raios x por energia dispersiva
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Mililitro
mV	Milivolt
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
NPs	Nanopartículas
PDI	Índice de polidispersividade
pH	Potencial hidrogeniônico
RPS	Ressonância de plasmon de superfície
µg	Micrograma
µL	Microlitros
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta e visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação estrutural dos flavonoides Hesperidina, Naringina e Rutina.

Figura 2 - Representação estrutural do terpenoide Limoneno

Figura 3 - Ilustração esquemática da oscilação do plasma em uma nanoesfera metálica

Figura 4 - Ação bactericida da prata em tecidos

Figura 5 - Processo de formação de AgNPs

Figura 6 - Estrutura química da celulose bacteriana

Figura 7 - Representação esquemática da ação das AgNPs sobre uma bactéria

Figura 8 - Imagens dos meios reacionais do extrato da casca da laranja, em temperatura ambiente e em diferentes períodos de tempos de reação: (A) 30 minutos e (B) 3 dias.

Figura 9 - Espectros eletrônicos UV-Vis da mistura de nitrato de prata e o extrato vegetal, em pH 9 e temperatura ambiente (30°C).

Figura 10 - Diâmetros hidrodinâmicos encontrados da amostra de AgNPs a partir da casca da laranja com o meio reacional em pH 9 e temperatura de 30 °C.

Figura 11 - Imagens de espectroscopia eletrônica de transmissão – MET das AgNPs a partir da casca da laranja.

Figura 12 - Espectro eletrônico UV-VIS com o decréscimo da banda no meio reacional, AgNPs (preta), AgNPs-CB com 1 dia de reação (vermelha) AgNPs-CB com 3 dias de reação (verde), AgNPs-CB com 5 dias de reação (azul escuro), AgNPs-CB com 7 dias de reação (azul claro).

Figura 13 - Mudança de coloração das membranas de CB com a incorporação das AgNPs com 1 dia (A), 7 dias (B) e comparativo de celulose antes da incorporação e depois dos 7 dias (C).

Figura 14 - (A) Micrografia das membranas de celulose bacteriana antes e depois da impregnação por AgNPs. (B) Análise de Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS).

Figura 15 - Halo de inibição contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 A laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	13
2.2 Nanopartículas de prata	15
2.3 Síntese biológica	18
2.4 Celulose bacteriana	20
2.5 Ação biocida em bactérias	22
3. OBJETIVO.....	24
3.1 Objetivos específicos:	24
4. METODOLOGIA	24
4.1 Obtenção do extrato vegetal.....	24
4.2 Obtenção das nanopartículas de prata.....	25
4.3 Caracterização da nanopartículas de prata.....	25
4.4 Produção da película inicial de celulose bacteriana a partir de kombucha comercial.....	26
4.5 Produção de membranas de celulose bacteriana a partir de película de partida	27
4.6 Produção dos compósitos de CB e AgNPs	27
4.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	27
4.8 Atividade antimicrobiana das AgNPs produzidas	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
6 CONCLUSÕES.....	37
7 REFERENCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

Devido ao uso indiscriminado de antibióticos, a resistência bacteriana tem se tornado o principal problema de saúde pública do século (KUMAR 2019; OLIVEIRA et al., 2020). O desenvolvimento dessa resistência é um processo natural, no entanto esse processo tem sido acelerado devido ao mau uso de fármacos (DE LIMA et al., 2022). Esse fenômeno gera consequências clínicas e econômicas devido ao aumento da mortalidade e hospitalizações prolongadas, gerando um aumento nos custos do tratamento (KUMAR 2019). Os problemas relacionados a resistência desses microrganismos podem causar um colapso na rede pública de saúde em curto tempo (MOG et al., 2020). Logo, novas formas de tratamento vêm sendo investigadas, com o objetivo de mitigar esse problema.

Diferente da celulose vegetal, a celulose bacteriana (CB) apresenta uma maior cristalinidade, maior capacidade hidrofílica e também melhor resistência mecânica quando em contato com água (LIN et al., 2020; SWINGLER et al., 2021). A CB é polímero natural produzida por um grupo de bactérias Gram-negativas pertencentes aos gêneros: *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Komagataeibacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina* (GORGIEVA & TRCEK 2019). Uma abordagem barata e eficaz para a obtenção de CB está associada a produção de uma bebida fermentada a partir de chás com açúcar e culturas simbióticas de bactérias e leveduras, comumente conhecidas como Scoby (TREVIÑO-GARZA et al., 2020).

A utilização de extrato vegetal para a síntese de nanopartículas de prata vem ganhando destaque por ser uma alternativa menos nociva ao meio ambiente. A redução e estabilização desses íons de prata são intermediadas pela combinação de biomoléculas presentes no extrato vegetal, como aminoácido, proteínas e polissacarídeos, além de metabólitos secundários como flavonoides, ácidos tânico e terpenoides (SINGH et al., 2016). A presença desses componentes redutores e estabilizantes influencia as características das AgNPs. Diferentes concentrações de biomoléculas e metabólitos secundários dão origem a diferentes formas e tamanhos de nanopartículas, e tais formas estão diretamente ligadas às suas potenciais aplicações (KUMAR et al., 2017; MEVA et al., 2019).

Paralelamente, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm chamado a atenção devido ao seu alto efeito inibitório em culturas bacterianas (BRUNA et al., 2021). A utilização de extrato vegetal para a síntese de AgNPs é um método que vem ganhando destaque por ser uma alternativa menos nociva ao meio ambiente (ALHARBI; ALSUBHI; FELIMBAN, 2022; CARSON et al., 2020). As biomoléculas e metabólitos secundários presentes no extrato vegetal como aminoácidos, proteínas, polissacarídeos transformam o íon prata em prata metálica através de uma reação de oxirredução. Estudos demonstram que o fruto possui uma alta concentração de compostos fenólicos, flavonoides entre outras biomoléculas que lhe proporciona um alto potencial antioxidante que pode ser usado para a redução do cátion prata (IJAZ; ZAFAR; IQBAL 2020).

Por ter um grande potencial bactericida a prata foi usada desde tempos antigos como uma ferramenta para o tratamento de várias infecções. Pesquisas recentes sugerem que as nanopartículas de prata (AgNPs) têm alta eficiência no tratamento e cicatrização de feridas (PALADINI & POLLINI 2019; NQAKALA et al., 2021). A incorporação desses nanomateriais em superfícies poliméricas naturais, como por exemplo a CB tem atraído a atenção de diversos pesquisadores. Devido à alta afinidade e adesão que as AgNPs têm com às membras biológicas, é possível vislumbrar inúmeras aplicações, entre elas a utilização desse compósito AgNPs-CB no tratamento de queimaduras (JIJI et al., 2020; SONG et al., 2021).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Laranja (*Citrus sinensis*)

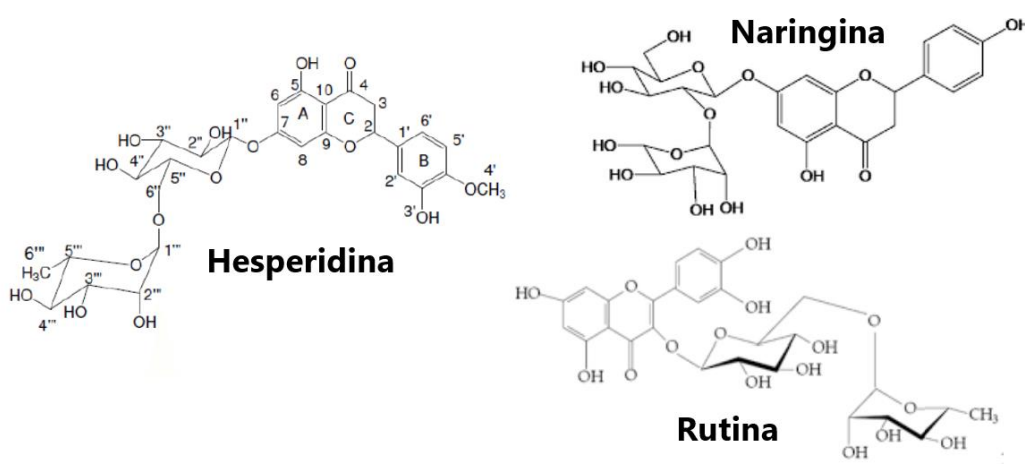
A laranja é apreciada por seu sabor cítrico refrescante, também é uma fonte rica em vitamina C e outros nutrientes essenciais. Seu fruto tem uma casca espessa e geralmente apresenta uma coloração que varia do amarelo ao alaranjado. As árvores de laranja atingem de 5 a 8 metros de altura, com folhas perenes e fragrantes. Esta planta versátil é cultivada em diversas regiões, desde pomares familiares até grandes plantações comerciais (LOHBAUER, 2021; ETEBU; NWAUZOMA, 2014).

Existem atualmente duas espécies popularmente conhecidas como laranja, cujos frutos são apreciados e amplamente consumidos em diversas regiões do mundo. A espécie *Citrus sinensis* tem seus frutos comercializados em várias partes do Brasil, enquanto a

Citrus aurantium, conhecida como laranja-amarga, também possui demanda significativa, especialmente na indústria de alimentos e na produção de óleos essenciais. A laranjeira (*Citrus*) é uma planta de fácil cultivo, adaptando-se bem a solos diversos e climas subtropicais (LOHBAUER, 2021; ETEBU; NWAUZOMA, 2014).

As biomoléculas antioxidantes presentes na laranja (desde a casca, até a semente) têm sido estudadas por sua capacidade redutora, sendo uma alternativa viável em síntese verde de nanopartículas (SINGH et al., 2016). Os fitoquímicos antioxidantes que predominam na casca da laranja são os flavonoides e terpenoides (SINGH et al., 2016; ETEBU; NWAUZOMA, 2014). Alguns flavonoides são comuns em frutas cítricas, como a laranja, incluindo a hesperidina, a naringina e a rutina (figura 1), são excelentes redutoras em rotas biológicas de nanopartículas (MIRANDA, 2013; ETEBU; NWAUZOMA, 2014).

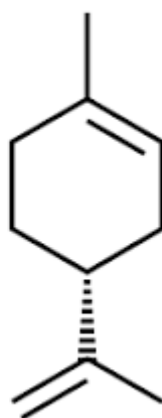
Figura 1 – Representação estrutural dos flavonoides Hesperidina, Naringina e Rutina.



Fonte: Adaptado de MIRANDA, 2013.

Terpenoides, por sua vez, são uma classe diversificada de compostos naturais encontrados em plantas, incluindo frutas cítricas (SAINI et al., 2022; ETEBU; NWAUZOMA, 2014). Limoneno (figura 2) é um exemplo de terpeno encontrado em abundância na casca de laranja (PIRES; RIBEIRO; MACHADO, 2018).

Figura 2 - Representação estrutural do terpenoide Limoneno



Fonte: Adaptado de <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.389747.html>.
Acessado em 11/11/2023.

Além de ser consumida *in natura*, a laranja é utilizada na produção de sucos, geleias, sorvetes e uma variedade de produtos alimentícios. Sua casca também é aproveitada na fabricação de óleos essenciais, amplamente utilizados na indústria de fragrâncias e cosméticos (GIWA; MUHAMMAD; GIWA, 2018). As propriedades medicinais da laranja têm sido exploradas ao longo da história, destacando-se o seu papel como uma fonte natural de antioxidantes e benefícios para a saúde (LOHBAUER, 2021).

2.2 Nanopartículas de prata

A utilização da prata remonta à antiguidade, onde civilizações como os egípcios, gregos e romanos reconheciam as propriedades antimicrobianas desse metal. A prata era usada para preservar alimentos, armazenar líquidos e até mesmo para tratar ferimentos (HUAIZHI; YUANTAO, 2001). Contudo, com a descoberta revolucionária dos

antibióticos na década de 1940, observou-se uma notável diminuição no uso de sais de prata para propósitos medicinais (ABDALLA; DADALTI, 2003). O nitrato de prata tinha seus méritos no tratamento de queimaduras e infecções, contudo ele possuía efeitos colaterais para o paciente que utilizasse em grande quantidade e a longo prazo. A reação mais comum encontrada é uma doença rara conhecida como argíria (HADRUP; SHARMA; LOESCHNER, 2018). Causada devido a interação excessiva de íons prata com o tecido epitelial, provocando uma coloração azulada ou acinzentada na localidade (HADRUP; SHARMA; LOESCHNER, 2018). Sua absorção pelas mucosas corporais está associada a outros efeitos adversos vistos em usuários, como o acumular nos tecidos do rim, fígado, baço, tecidos musculares, pele e córnea (VILA; MARCOS; HERNÁNDEZ, 2017).

No cenário atual há um grande esforço de pesquisadores à procura de agentes antibacterianos para o tratamento de uma variedade de doenças infecciosas causadas por bactérias patogênicas. O uso descontrolado de antibióticos resultou no aumento da resistência microbiana a medicamentos (também conhecidos como superbactérias), acarretando em uma diminuição significativa da eficácia do tratamento com antibióticos tradicionais (SINGH et al., 2020). Projeções futuras da OMS revelam que até o ano de 2050 são esperadas mais de 10 milhões de mortes anuais em virtude da ineficácia de quadros clínico através da aplicação de antibióticos (TALEBI et al., 2019). Com isso, há um esforço crescente na busca de novos fármacos que possam atuar contra esses patógenos resistentes às drogas atuais.

Nesse contexto, a prata tem se destacado em várias pesquisas na literatura, uma vez que possui uma extraordinária eficácia contra vários microrganismos (NAM et al., 2016; SINGH et al., 2020; WEI et al., 2015). Suas propriedades microbianas e alta estabilidade térmica oferecem variabilidade de aplicações. Dentre essas, no uso em cosméticos para a fabricação de cremes de pele e tecidos com propriedades bactericidas.

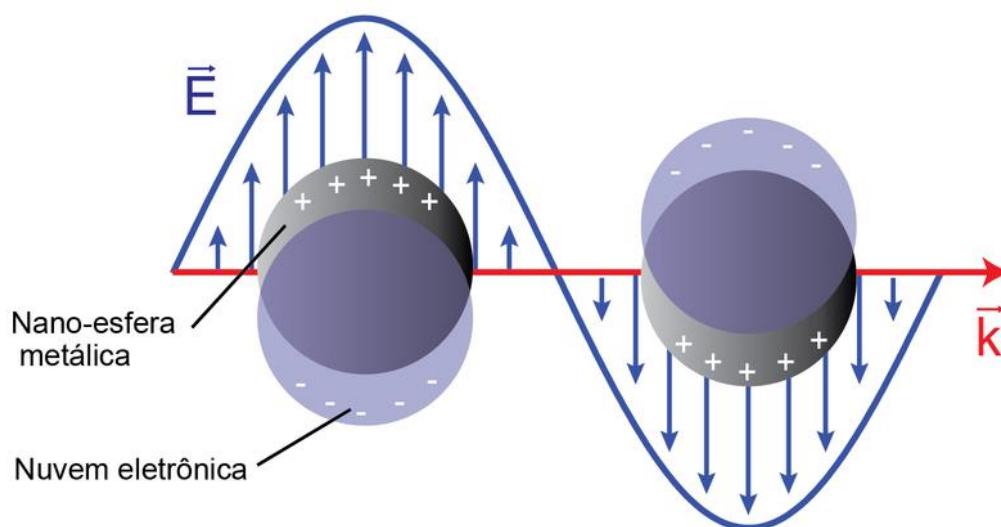
O mecanismo de atuação preciso das nanopartículas de prata (AgNPs) ainda não está completamente elucidado, porém, existem evidências que sugerem seu efeito através dano/rompimento da parede celular, inativação enzimática, desnaturação de proteínas e geração de espécies reativas de oxigênio intracelular, entre outras (ROY et al., 2019).

Entrando no âmbito das nanoescala, as características químicas e físicas dessas estruturas dependem principalmente do tamanho e da forma de seus fatores geométricos

(BHUI et al., 2009). Especificamente, esses fatores devem ser controlados com precisão para observar as propriedades únicas das nanoestruturas, bem como para alterar as propriedades químicas e físicas dessas estruturas conforme desejado (BHUI et al., 2009). Dentre as nanopartículas metálicas, algumas como as de prata, possuem banda de absorção característica intensa e evidenciada pelo método espectrofotométrico de absorção molecular nas regiões ultravioleta e visível (UV-Vis), isso é atribuído ao fenômeno de ressonância plasmon de superfície (RPS), o que não é observado em áreas maiores para um mesmo material (SANTOS et al., 2016).

A ressonância de plasmon de superfície (RPS) se manifesta por meio de ondas que percorrem toda a extensão da superfície do metal. As interações dos elétrons na banda de condução apresentam uma reação de maneira coordenada, oscilando em fase com a onda luminosa, conforme evidenciado (figura 3) (JIANG et al., 2017).

Figura 3 - Ilustração esquemática da oscilação do plasma em uma nanoesfera metálica



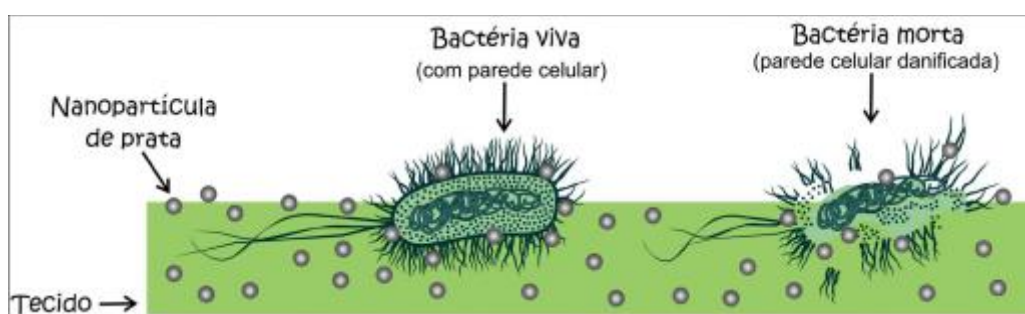
Fonte: Adaptado de <https://images.app.goo.gl/cuYyQZ7BCuJdV3j19>. Acessado em 17/11/2023.

Dentro da interação entre a oscilação da superfície carregada, e o campo eletromagnético da luz, representando a RPS, propriedades específicas, como a elevada sensibilidade levaria a alterações no índice de refração da superfície metálica. Contudo, devido às suas propriedades específicas, a prata facilita a propagação da onda plasmon de

superfície (AMIRJANI; FATMEHSARI, 2018). A espectroscopia UV-Vis emerge como um método economicamente acessível e eficiente para identificar a presença de nanopartículas, analisando tanto os valores de pico quanto de meia altura da banda RPS (JIANG et al., 2017; AMIRJANI; FATMEHSARI, 2018).

A Figura 4 ilustra a ação bactericida da prata no tecido, relatada no estudo citado a seguir. No estudo conduzido por PAL et al., 2007, foram examinadas as propriedades antibacterianas das nanopartículas de prata com diferentes formatos em relação à bactéria gram-negativa *Escherichia coli*.

Figura 4 – Ação bactericida da prata em tecidos



Fonte: Adaptado de GOMES; COSTA; MOHALLEM, 2016.

Os resultados indicaram que a aplicação de 100 µL de amostra contendo 6 µg de nanopartículas esféricas de prata resultou na quase completa prevenção do crescimento bacteriano. Por outro lado, o uso de quantidades superiores a 12,5 µg de prata (na forma de AgNO₃) demonstrou uma inibição total de 100% no crescimento bacteriano. Estes achados destacam a notável eficácia das nanopartículas de prata, especialmente as esféricas, contra a *Escherichia coli*, oferecendo perspectivas promissoras no desenvolvimento de estratégias antibacterianas.

2.3 Síntese biológica

A rota biológica de produção de nanopartículas apresenta vantagens frente à rota química convencional. As metodologias usuais necessitam de uma espécie redutora dos íons metálicos em solução e também de agentes estabilizadores das nanopartículas criadas que tem por finalidade evitar sua coalescência e separação de fases (BEYENE et al., 2017; AHMED et al., 2016). Já a rota biológica usualmente apresenta biomoléculas que

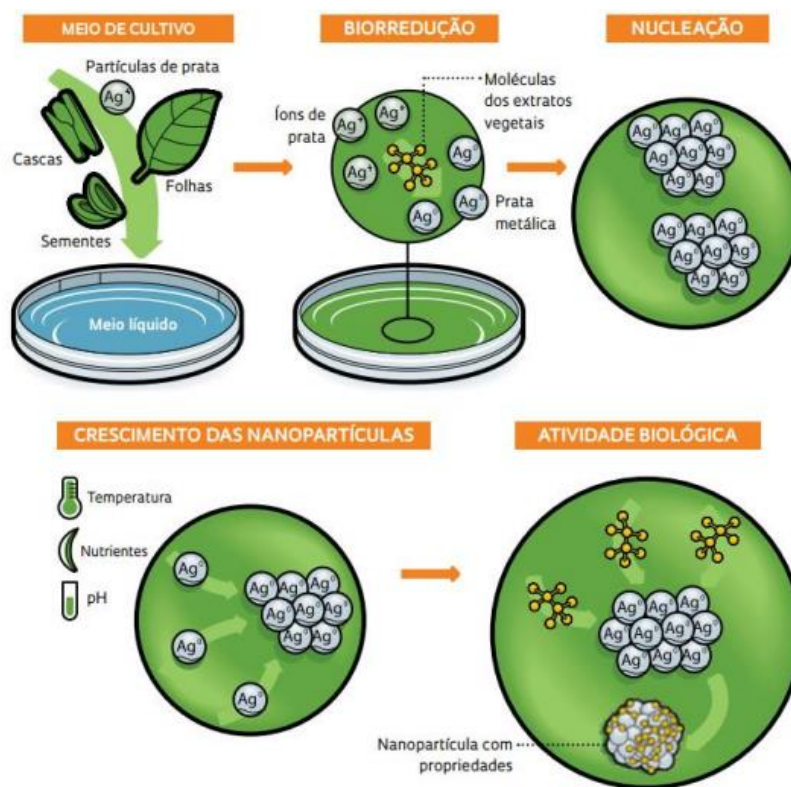
realizam esse papel estabilizador, tendo rendimento semelhante e quase sem impacto no meio ambiente em comparação com os métodos convencionais (BEYENE et al., 2017; AHMED et al., 2016).

A complexa composição fitoquímica de extratos vegetais não somente é capaz de reduzir os íons metálicos em solução, mas também se ligar quimicamente à superfície das nanopartículas produzidas, tornando-as mais estáveis, como representado na Figura 5 (AHMED et al., 2016). Adicionalmente, os extratos vegetais de espécies abundantes podem favorecer economicamente a produção de nanopartículas em larga escala, tornando essa proposta atrativa para o setor industrial.

A perspectiva promissora da síntese verde, mediada por plantas, emprega extratos provenientes de diversas partes da planta, como raízes, caule, cascas, folhas, flores, frutos e sementes, para conduzir a biossíntese de nanopartículas metálicas, com ênfase especial nas de prata. Esse procedimento resulta em uma ampla variedade de nanopartículas, tanto em termos de tamanho quanto de forma (HABIBULLAH; VIKTOROVA; RUMIL, 2021). Os extratos contêm uma riqueza de compostos orgânicos, englobando enzimas, alcaloides, terpenos, saponinas, flavonoides, taninos, compostos fenólicos, catequinas, e grupos funcionais de ácidos carboxílicos e cetonas, todos classificados como metabólitos naturalmente presentes nas plantas (AL-RUBAYE et al., 2020; HABIBULLAH; VIKTOROVA; RUMIL, 2021).

Compostos e grupos funcionais nos extratos, como flavonoides, alcaloides, taninos e saponinas, desempenham funções cruciais no processo de síntese. Agindo como agentes redutores na conversão de Ag^+ para Ag^0 , simultaneamente, exercem a função de estabilizadores durante a reação. Embora o mecanismo de reação proposto seja amplamente reconhecido, sua compreensão ainda carece de aprofundamento (KAABIPOUR; HEMMATI, 2021; XU et al., 2020).

Figura 5 – Processo de formação de AgNPs



Fonte: BONATTO; SILVA (2014).

A síntese verde de nanopartículas metálicas por meio de extratos vegetais pode ser influenciada por diversos parâmetros, tais como temperatura, tempo de síntese, pH, concentração de extrato e presença de sal metálico. A seleção da planta, a escolha da parte a ser utilizada e o método de extração dos compostos desempenham um papel crucial nesse processo (RAFIQUE et al., 2017).

2.4 Celulose bacteriana

O biopolímero mais comum na Terra é a celulose, que é produzida anualmente em surpreendentes $10^{11} \pm 10^{12}$ toneladas (KLEMM et al., 2004). Este polissacarídeo linear é composto por unidades de D-glicose que são conectadas por ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4), a unidade de repetição é a celobiose (LIU, et al., 2012). Os grupos hidroxila da celulose têm uma notável capacidade de se ligar ao hidrogênio, tanto interna quanto externamente. Essas interações extramoleculares acrescentam

estabilidade à cadeia, o que resulta na formação de fibras retas e fortes, com excepcional resistência à tração. Além disso, a celulose é impermeável a solventes, como a água, isso é atribuído às interações entre a molécula e as fibras celulósicas, que resultam na estabilidade única das fibras.

Em comparativo com a celulose vegetal a celulose bacteriana apresenta uma equivalência química. No entanto, ela pode ser obtida em uma forma de composição química pura, ou seja, sintetizada sem a presença de lignina, hemicelulose ou pectina. Estes componentes, que coexistem com a celulose nas plantas, requerem um processo de remoção para serem eliminados. Além disso, as propriedades físicas dessa celulose derivada são predominantemente influenciadas pelo tamanho das fibras, que são aproximadamente 100 vezes menores do que as fibras da celulose vegetal (JONAS; FARAH, 1998).

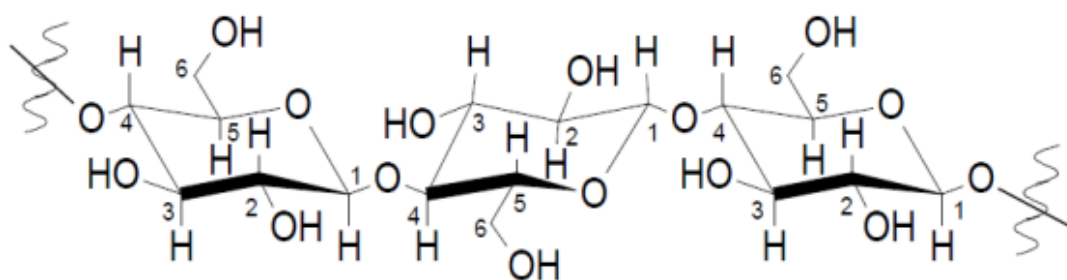
Paralelamente, a celulose bacteriana (CB) possui propriedades químicas únicas, como alto índice de cristalinidade, porosidade e biocompatibilidade (CHEN et al., 2018). Considerando a alta capacidade hidrofílica da matriz bacteriana, as AgNPs possuem excelente incorporação/imobilização nessas membranas, permitindo a formação de biofilmes biodegradáveis com capacidade de suprimir ou retardar o surgimento de colônias de fungos e bactérias em sua superfície (GUPTA et al., 2020; MORENA et al., 2019).

A imobilização dessas nanopartículas expande o seu leque de aplicações, especialmente na produção de superfícies microbiocidas (HOSSEINI et al., 2020). Nesse sentido, ressalta-se a relevância tecnológica da celulose bacteriana, obtida em um meio de cultura contendo os nutrientes e microrganismos adequados, na forma de biofilmes. Essas membranas poliméricas que podem chegar até alguns centímetros de espessura constituída por um emaranhado de fibras de celulose altamente hidratadas, de aspecto gelatinoso e que possui estrutura química idêntica à da celulose vegetal (CHEN et al., 2018). Contudo, a produção de CB requer condições de cultura significativamente rigorosas com relação à temperatura de incubação e concentração dos diferentes nutrientes, o que restringe a capacidade de grupos de pesquisa em fase de consolidação de realizar atividades de pesquisa envolvendo esse promissor material polimérico (TAPIAS et al., 2022).

Nos domínios da síntese biológica, a celulose bacteriana (CB) emerge graças às intrincadas rotas de biossíntese exploradas por diversas linhagens bacterianas, com destaque para a proeminente *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*). Recentemente, essa bactéria conquistou reconhecimento pela sua habilidade em produzir quantidades comerciais de celulose (MORMINO, 2002).

Apesar de compartilhar a estrutura química da celulose vegetal, distingue-se pela finura de suas fibras em escala nanométrica. Sua síntese ocorre à margem da lignina, hemicelulose e pectina, resultando numa substância de pureza superior, cristalinidade notável (entre 70 e 80%), elevado teor de água (superior a 90%) e uma resistência mecânica marcante. Além disso, a CB destaca-se como um polímero biodegradável, biocompatível, não tóxico e livre de potenciais alergias (BARUD, 2011).

Figura 6 – Estrutura química da celulose bacteriana



Fonte: Adaptado de DORES et al., 2017.

As propriedades químicas e estruturais distintivas da CB, com ênfase nas interações robustas entre os grupos hidroxila que conferem uma estrutura rígida e estável, a consagram como uma matriz hidrofílica ideal para a incorporação de metais (BARUD, 2011). Nesse contexto, a prata (Ag) surge como objeto de inúmeras pesquisas devido às suas propriedades bactericidas, desempenhando um papel crucial na prevenção de infecções e no tratamento de queimaduras (GUPTA et al., 2020; HOSSEINI et al., 2020).

2.5 Ação biocida em bactérias

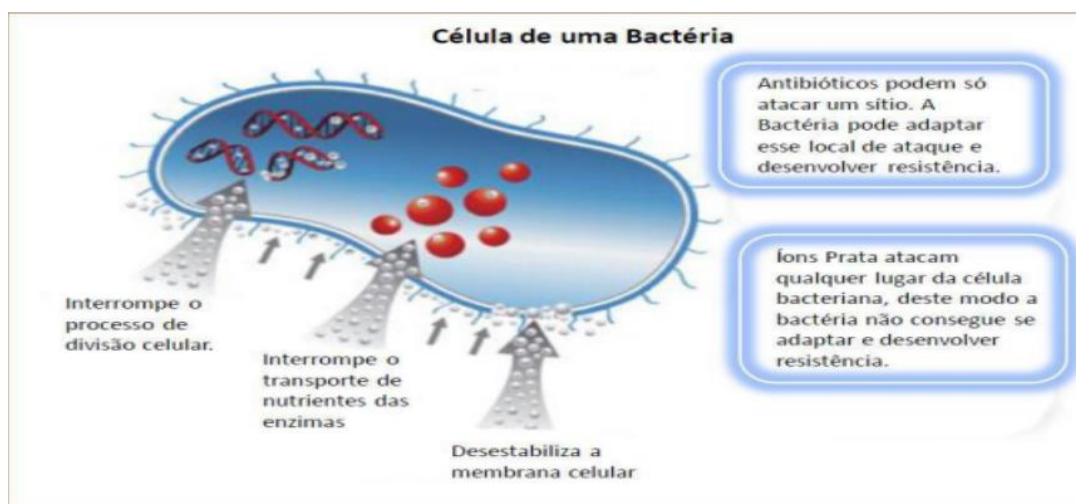
Os efeitos das nanopartículas de prata (AgNPs) ainda apresentam desafios para uma compreensão completa, mas seus efeitos inibitórios no crescimento e infectividade de micro-organismos são notáveis. A capacidade intrínseca dessas partículas em penetrar

membranas celulares é crucial, interferindo nos processos internos e superficiais dos micro-organismos (NAM et al., 2016; SINGH et al., 2020; WEI et al., 2015). A diminuta escala das AgNPs favorece sua penetração, comprometendo o funcionamento celular e desacelerando atividades vitais, potencialmente resultando em danos celulares (NAM et al., 2016; WEI et al., 2015).

Estudos indicam que a carga positiva do íon Ag^+ liberado pelas AgNPs após atravessarem as paredes celulares é fundamental para sua atividade antimicrobiana (KALWAR; SHAN, 2018; KODURU et al., 2018). Essa carga positiva cria uma atração eletrostática com as membranas celulares negativamente carregadas dos micro-organismos, impactando a permeabilidade seletiva e a respiração celular, eventualmente levando à morte celular (KALWAR; SHAN, 2018; KODURU et al., 2018).

Além disso, as nanopartículas de prata podem adentrar as células, interagindo com ligações dissulfeto em glicoproteínas/proteínas de micro-organismos, como vírus, bactérias e fungos (LARA et al., 2011; KHEZERLOU *et al*, 2018). Essa interação danosa com as proteínas afeta negativamente tanto o DNA, dificultando sua replicação, quanto o RNA, impossibilitando sua transcrição. A prata demonstra uma afinidade particular pelos elementos enxofre e fósforo, abundantes na membrana celular e no material genético. Essas modificações estruturais comprometem os processos bacterianos, potencialmente levando à morte celular (LARA et al., 2011; KHEZERLOU *et al*, 2018). A interação do íon prata com as células bacterianas é ilustrada de forma gráfica na Figura 7 destacando as múltiplas formas pelas quais as AgNPs impactam e prejudicam os micro-organismos

Figura 7 - Representação esquemática da ação das AgNPs sobre uma bactéria



3. OBJETIVO

O trabalho tem como principal objetivo sintetizar nanopartículas de prata por síntese verde utilizando o extrato vegetal da casca de *Citrus sinensis* (Laranja). Posteriormente incorporar as nanoestruturas na superfície polimérica natural (CB).

3.1 Objetivos específicos:

- Sintetizar nanopartículas de prata por síntese verde utilizando o extrato vegetal da casca de *Citrus sinensis* (Laranja)
- Monitoramento pelo Espectrofotômetro UV-Vis do crescimento da banda de ressonância plasmon das AgNPs;
- Análise de Dispersão de Luz Dinâmica (DLS) para medir o tamanho médio dessas AgNPs fornecendo dados da polidispersividade e estabilidade (potencial zeta) da dispersão de NPs;
- Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para obter imagens da morfologia das AgNPs sintetizadas, além de confirmar os dados de tamanho do DLS;
- Análise de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) para confirmar a existência de prata através da energia dispersa do material;
- Produção de membranas utilizando como meio de cultivo o chá verde comercial.
- Síntese e incorporação das nanopartículas em membranas de celulose bacteriana (ou em matrizes poliméricas compostas por celulose bacteriana) (AgNPS-CB).
- Monitoramento da inserção por meio do Espectrofotômetro UV-Vis.
- Ensaios microbiológicos em sistemas biológicos de dois grupos de bactérias *E. coli* e *S. aureus* (Gram-negativas e Gram-positivas) os resultados mostraram halo de inibição para os dois grupos.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção do extrato vegetal

Foi utilizado para esse experimento a casca da laranja (*Citrus sinensis*), obtido no mercado da cidade. Foi preparado seguindo os seguintes procedimentos: a casca foi pesada e colocada em um Becker com 400 ml de água deionizada, sendo aquecida durante 2 horas em uma temperatura média de 40 graus centígrados. Em seguida, a solução foi

filtrada com papel filtro para a retirada da casca e partículas remanescentes. O extrato foi dividido em três diluições 1:1 (5 ml de extrato da casca diluído em 5 ml de água deionizada), 1:2 (5 ml de extrato da casca diluído em 10 ml de água deionizada) e 1:4 (5 ml de extrato da casca diluído em 20 ml de água deionizada).

4.2 Obtenção das nanopartículas de prata

Após a preparação do extrato vegetais, 5 mL de alíquotas desses extratos nas condições 1:1, 1:2 e 1:4 foram combinadas com 50 mL de solução de 0,1 mmol L⁻¹ de nitrato de prata, de forma a totalizar em cada recipiente de reação 55 mL de volume de mistura. Logo após a mistura, o pH da solução de reação teve ajuste para os valores de 7 e 9 com auxílio de solução 0,05 mol L⁻¹ de NaOH. Cada mistura foi inicialmente mantida a temperatura ambiente em um béquer revestido com papel alumínio e sob agitação constante, com o agitador magnético durante as primeiras 24 horas de reação, sendo posteriormente deixadas na bancada em repouso em temperatura ambiente (30 °C). O monitoramento da formação de AgNPs foi feito com o espectrofotômetro UV-Vis, através do crescimento da banda plasmon localizada entre 350 e 500 nm. Entre intervalos de tempo regulares, alíquotas da mistura AgNO₃ / solução de extrato vegetal continuamente foram retiradas da mistura para o registro dos respectivos espectros UV-vis. Os tempos inicialmente estipulados para a coleta das alíquotas foram de 30 min e depois em 8 e 24 horas. Posteriormente, as medições aconteceram a cada 24 horas até o período de 9 dias.

4.3 Caracterização da nanopartículas de prata

A análise UV-VIS foi realizada em um equipamento Bel modelo UV-M51 utilizando água destilada como branco e faixa espectral de 190 a 750 nm para investigar a banda de ressonância plasmônica de superfície do meio reacional. Após a mistura dos extratos da polpa e das soluções de nitrato de prata seguido de ajuste do valor de pH, o meio foi analisado a cada 10 minutos na primeira hora e a cada 1 hora até 4 horas. Em seguida, o meio foi analisado a cada 12 horas nos primeiros 2 dias e, eventualmente, a cada 24 horas por 21 dias.

A análise do diâmetro hidrodinâmico e do potencial Zeta das dispersões produzidas foram realizadas utilizando o equipamento Malvern modelo Zetasizer

NanoZS utilizando um laser de hélio-neônio (4 mW) operando em 633 nm de comprimento de onda e empregando o ângulo de coleta do feixe luminoso a 173°. Antes das leituras, as amostras foram diluídas com água deionizada. Foram feitas três réplicas de cada amostra em modo automático a 25 °C. Já as medidas de potencial zeta foram realizadas três vezes em modo manual utilizando uma célula de eletroforese capilar modelo DTS-1070 em cada réplica.

Para análise de MET inicialmente, 2 µL das amostras de AgNPs, diluídas com água na proporção de 1/10, foram depositados sobre telas de cobre de 200 malhas (Electron Microscopy Sciences, EUA) revestidas por uma camada fina de Formvar. Após 24 horas de secagem em condições ambientais (25°C), as amostras foram analisadas no INL - International Iberian Nanotechnology Laboratory, located in Braga (Norte de Portugal) utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (JEM-1011, Jeol, Japão) operado a 100 kV.

As concentrações totais de Ag foram determinadas usando um ICP-OES Agilent Technologies Vertical Dual View 5100 (Tóquio, Japão). O SP-ICPMS foi realizado com um ICPMS Agilent Technologies modelo 7500c baseado em quadrupolo (Tóquio, Japão) equipado com um sistema de reação octapolo (ORS) as amostras foram dispersas em 13 mL de solução (5 mL água regia + 8 mL de H₂O). O tratamento dos dados do SP-ICPMS foi realizado utilizando uma planilha do Microsoft Excel em laboratório. A separação do sinal correspondente aos AgNPs do Ag⁺ foi realizada empregando o algoritmo iterativo baseado em 5 vezes o desvio padrão, mais a média de todos os pontos de dados, obtidos na análise.

4.4 Produção da película inicial de celulose bacteriana a partir de kombucha comercial

Em um recipiente de 500 mL previamente esterilizado com água a 100 °C foram adicionados 350 mL de kombucha obtida do comércio e na abertura desse recipiente foi colocado um tule preso por um elástico, sendo que esse sistema ficou fora da geladeira por 24 horas. Na sequência, foram adicionados à kombucha comercial 100 mL de chá adoçado previamente preparado, consistindo na infusão de 5 g de sacos de chá preto e/ou verde em água filtrada previamente fervida e posteriormente adoçada com 50 g açúcar orgânico. Após a mistura desses líquidos no recipiente de 500 mL, o mesmo foi recoberto

novamente com tecido de algodão e ficou em repouso de 7 a 10 dias a temperatura ambiente. Passado o período de fermentação, na região próxima à superfície do recipiente formou um biofilme da colônia Scoby (película de partida), que serviu de matriz para a propagação de novos biofilmes em recipientes de maior quantidade. A fração líquida (kombucha de laboratório 1) foi utilizada como parte do meio de reação para produzir membranas de tamanhos maiores.

4.5 Produção de membranas de celulose bacteriana a partir de película de partida

Em um béquer de 1,5 L foram adicionados 100 g de açúcar orgânico, 10 g de chá preto e/ou verde, acrescido de 800 mL de água filtrada fervida. Em seguida, foi necessário que o recipiente fique tampado e em repouso por 10 minutos, para que haja a infusão. Feito isso, o chá foi coado e colocado em um recipiente maior, com capacidade para 3 L, acrescido de 500 mL de água filtrada gelada, além de 500 mL de kombucha de laboratório e Scoby preparados na etapa anterior. O recipiente foi recoberto com um tecido de algodão preso a um elástico e colocado em um ambiente arejado pelo período de 7 a 21 dias, de acordo com o desenvolvimento das membranas de CB. A fração líquida (kombucha de laboratório 2) oriunda desse processo foi utilizada como parte do meio de reação para produzir mais membranas.

4.6 Produção dos nanocompósitos de CB e AgNPs

Nas dispersões de AgNPs previamente preparadas empregando o extrato vegetal (volume total de 110 mL) datadas de 7 dias do início do contato entre os reagentes, membranas de dimensões 1x1 cm², foram inseridas individualmente em béqueres distintos. Essas misturas foram agitadas continuamente por um período de 24 horas e parte do meio líquido foi periodicamente avaliada pela técnica UV-Vis para observação na alteração da intensidade da banda plasmon das AgNPs. Esses experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 Microscopia eletrônica de varredura

Microscopia eletrônica de varredura (MEV, Nova 130 NanoSEM 200, Holanda). As imagens foram gravadas digitalmente utilizando uma câmera CCD UltraScan® 4000

(Oneview, Gatan, EUA). O MEV foi realizado com tensão de aceleração de 10 a 15 kV. Antes de serem analisadas, todas as amostras foram montadas em stubs de alumínio com fita adesiva de carbono e revestidas com ouro (espessura de cerca de 10 nm).

4.8 Atividade antimicrobiana das AgNPs produzidas

Os testes microbiológicos foram realizados utilizando a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25992) e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) através do procedimento de difusão em ágar para determinar as zonas de inibição. Antes da análise, os materiais foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

As bactérias foram inicialmente cultivadas durante 24 horas antes da inoculação em infusão cérebro coração (BHI) para *Staphylococcus aureus* e caldo *Escherichia coli* (EC). O meio de ágar nutriente foi preparado utilizando 36 g de ágar Muller-Hinton em 1000 mL de água destilada e aproximadamente 50 mL do conteúdo foram transferidos para cada placa de Petri, que foi posteriormente deixada em repouso a 37 °C em estufa de laboratório.

As culturas de bactérias foram previamente diluídas com solução salina (0,85% de NaCl) até o valor de absorbância de 0,04 a 600 nm e, então, transferidas para as placas de Petri utilizando swabs estéreis. Eventualmente, as membranas contendo AgNPs-CB e 20 mg de amoxicilina com concentração de 150 mg/ml em papel de filtro (controle positivo), foram adicionadas na placa e deixada em repouso a 37 °C por 24 horas em um forno de laboratório antes da análise das zonas de inibição. Todas as experiências foram realizadas em triplicata.

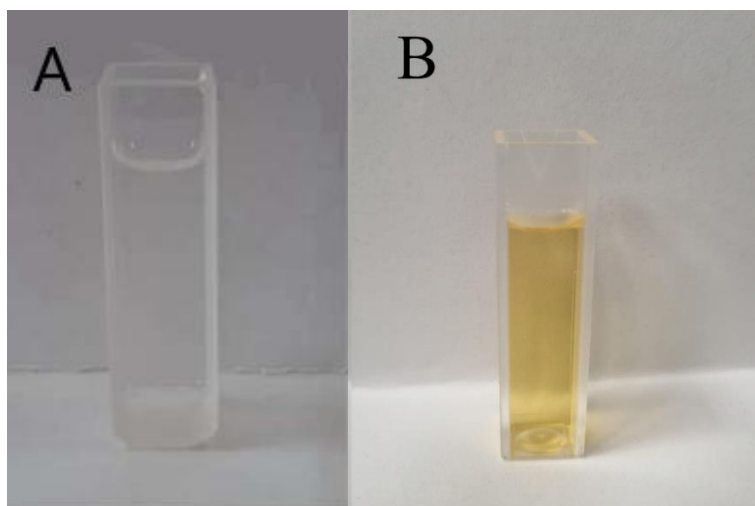
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A formação de AgNPs foi bem-sucedida considerando a mudança gradual de coloração. Como visto na literatura, as AgNPs emitem uma coloração que varia do

castanho ao marrom em solução aquosa devido à excitação das vibrações dos elétrons de ressonância plasmon de superfície (WANG et al., 2018).

Na figura (8) é possível visualizar a mudança de coloração da mistura de AgNO_3 e extrato vegetal. Com o progresso da reação observa-se a modificação da cor passando de incolor para castanho em apenas 3 dias de reação. Essa mudança visual sugere que está havendo a formação de AgNPs e o aumento gradual de sua concentração com o passar do tempo de reação (JAIN; MEHATA, 2017; CARSON et al., 2020). Tal mudança de coloração é oriunda da interação da luz com as AgNPs que resulta na oscilação coletivas dos elétrons da banda de condução desses átomos metálicos, esse fenômeno é conhecido como ressonância plasmon de superfície (RPS) (JAIN; MEHATA, 2017; WANG et al., 2018).

Figura 8 - Imagens dos meios reacionais do extrato da casca da laranja, em temperatura ambiente e em diferentes períodos de tempos de reação: (A) 30 minutos e (B) 3 dias.



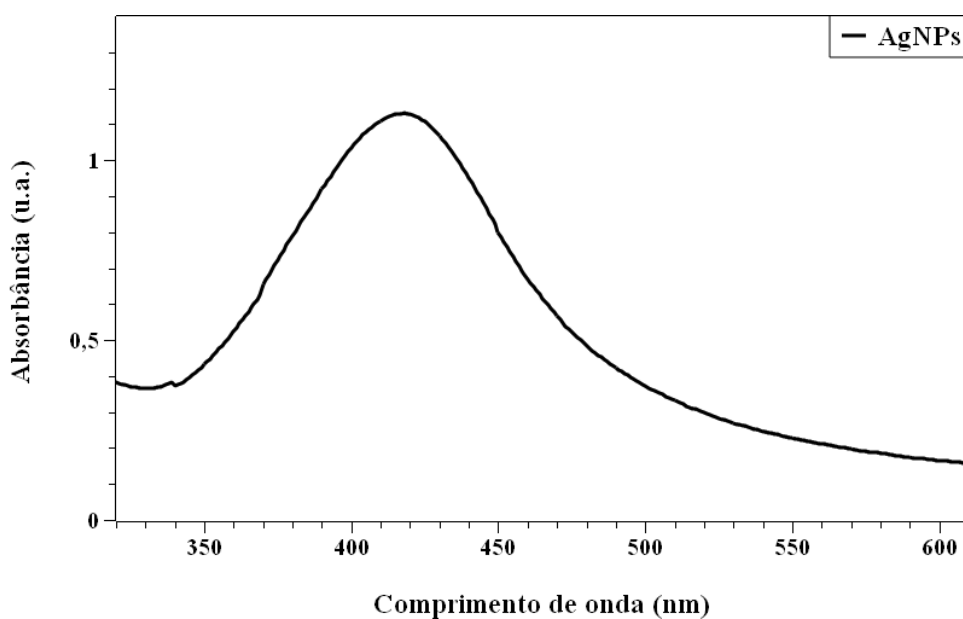
Fonte: o autor

O espectro de AgNPs observada na figura (9) foi monitorada com o auxílio da espectroscopia UV-VIS apresentando um pico máximo no sétimo dia de reação. Durante o experimento foi utilizada uma concentração de 1:2 (5 ml de extrato diluída em 10 ml de água) com o meio reacional em pH 9. A temperatura foi ajustada para 30° C antes da mistura e foi mantida até as primeiras 8 horas de reação. Depois de 7 dias de monitoramento foi possível observar o ápice de absorbância do meio reacional, atingindo 1,18 u.a, próximo dos 420nm de comprimento de onda.

Os resultados sugerem que a redução da prata ocorreu majoritariamente por conta das biomoléculas presente no extrato vegetal da casca da laranja. Os compostos

fitoquímicos são representados em sua grande maioria por compostos fenólicos, flavonoides (hesperidina, naringina e rutina) e terpenoides (limoneno). Tais biomoléculas também tem a função de estabilizantes devido suas capacidades tensoativas (HUSSAIN, et al., 2019).

Figura 9 - Espectros eletrônicos UV-Vis da mistura de nitrato de prata e o extrato vegetal, em pH 9 e temperatura ambiente (30°C).



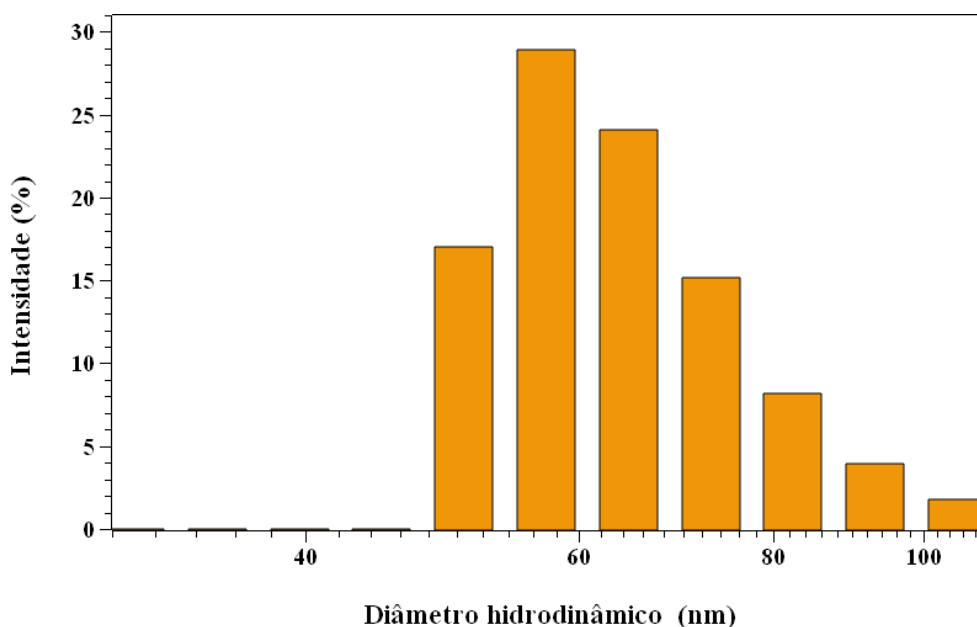
Fonte: o autor

O método DLS permite observar o padrão de intensidade da luz que é espalhada em um ângulo específico em um volume iluminado pré-determinado. Esta descrição física permite identificar o tamanho das partículas suspensas na água e o seu grau de polidispersidade (BHATTACHARJEE, 2016). Na figura (10) observa-se a distribuição de tamanho das AgNPs referente a amostra sintetizada a partir do extrato da casca da laranja, em meio alcalino (pH 9) e temperatura de 30°C. A maioria das AgNPs biosintetizadas possuem tamanho médio de $56,1 \pm 2,1$ nm. Esse tamanho observado na figura (10) pode estar diretamente relacionada a quantidade de biomoléculas disponíveis no meio reacional, por serem os responsáveis pela estabilização da Ag^+ e agregação das mesmas, formando algo semelhante a uma capsula protetora (DEMURTAS; PERRY, 2014; NIDHIJA, R. et al, 2013). A baixa variação da polidispersividade pode estar interligada também a temperatura em que foi realizado o experimento, permitindo que

biomoléculas sensíveis a essa variação de temperatura não se degradassem (KIM, 2017; INNIS et al., 2011).

Quando acrescentamos calor em uma reação em grande parte esperamos que ela acelere seus processos de síntese. Entretanto em alguns casos como no trabalho atual, o fator temperatura pode acabar afetando em muito os resultados. Em alguns trabalhos que utilizaram temperaturas de 40 e 50°C, notaram uma distribuição bimodal de seus tamanhos de AgNPs, ocorrendo em grande parte pela aceleração da reação e também uma degradação térmica de algumas biomoléculas muito importante, como os compostos fenólicos (KIM, 2017; INNS *et al.*, 2011).

Figura 10 – Diâmetros hidrodinâmicos encontrados da amostra de AgNPs a partir da casca da laranja com o meio reacional em pH 9 e temperatura de 30 °C.



Fonte: o autor

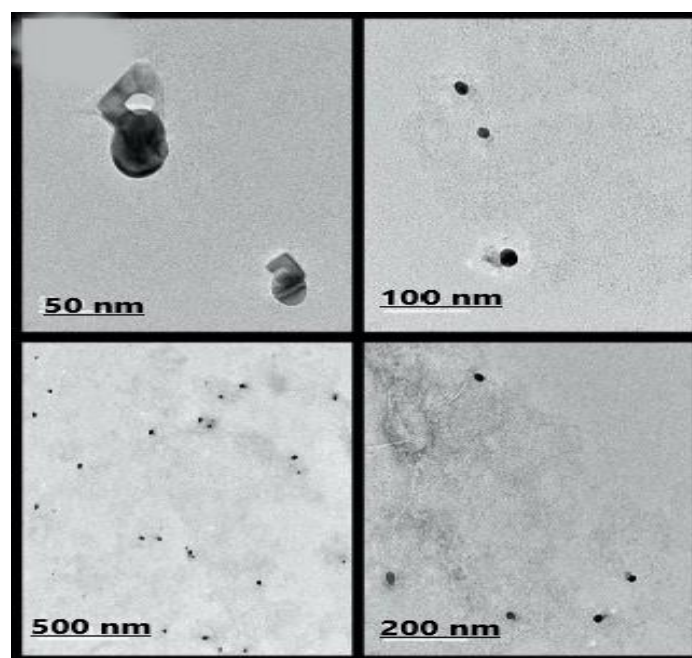
Os dados obtidos por análise de DLS colaboram para o entendimento de outros fatores importantes das propriedades dessas nanoestruturas como sua estabilidade e tamanho. O índice de polidispersividade (PDI) obtido por meio da técnica de DLS, fornece informações detalhadas sobre a distribuição de tamanhos das partículas em uma amostra. Quando o PDI obtido pelo DLS é próximo de 0, isso sugere uma distribuição monodispersa, com partículas de tamanho bastante uniforme. Por outro lado, valores mais elevados, próximos de 1, indicam uma distribuição mais polidispersa, com partículas de diferentes tamanhos. Nesse sentido, foi obtido um PDI de 0,410, estando dentro do

esperado para uma reação de AgNPs utilizando como estabilizador extrato vegetal. Para alguns autores, sistemas de nanoestruturas variando de 0,3 e 0,5 PDI indica uma monodispersividade moderada, ou seja, temos partículas de tamanhos mais homogêneos (ALKHULAIFI et al., 2020; CHAND et al., 2021).

O potencial zeta (ζ) é uma medida do potencial elétrico na interface entre uma partícula sólida e o líquido ao seu redor. É comumente usado para avaliar a carga elétrica da superfície das partículas coloidais e entender sua estabilidade. Se as partículas tiverem um potencial zeta muito negativo (menos de -30mV, por exemplo) ou muito positivo (mais de +30mV), isso geralmente indica uma forte repulsão elétrica entre as partículas (CLOGSTON; PATRI, 2011). Nesses casos, a suspensão é mais propensa a ser estável, e as partículas têm menos tendência a se aglomerar ou sedimentar. Quando abordamos o valor fornecido pelo DLS sobre o potencial zeta da alíquota avaliada da reação, obtivemos uma medida de -50,9mV, atestando uma alta repulsão elétrica entre as partículas, mostrando que mesmo com o passar do tempo a reação permaneceu bem estável, com pouca formação de agregados.

Partindo para as imagens, a figura (11) exibe as micrografias, observasse as amostras sintetizadas a partir do extrato da casca da laranja, apresentando NPs com morfologia em sua grande maioria esferoidal, com dimensões médias próximo de 50 nm. Analisando os dados fornecidos pelo EDS (figura 13-B) corroborar para constatar que a energia que emana das estruturas observadas são constituídas principalmente de prata.

Figura 11 –Micrografia das AgNPs a partir da casca da laranja.

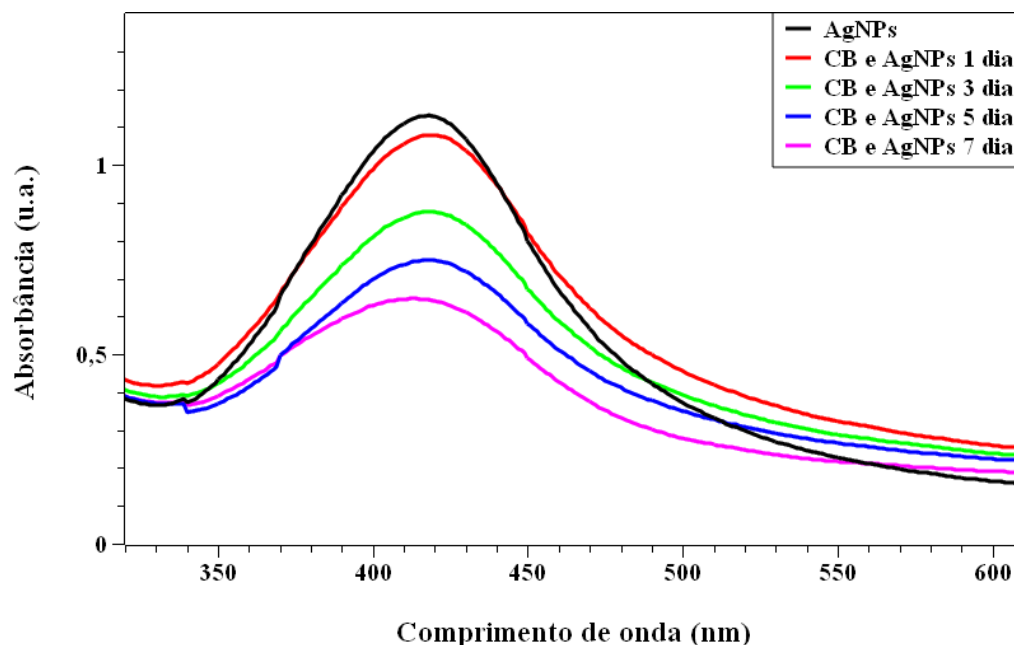


Fonte: o autor

Após a produção e monitoramento das AgNPs, foi adicionado uma membrana de CB medindo 1 cm² na dispersão de nanopartículas. Em seguida foi feito o monitoramento da banda plasmôica como exposto na Figura 3.

Com o decorrer do tempo observou-se uma diminuição da banda que caracteriza a concentração de AgNPs, após 7 dias de reação foi observado o seu menor pico. Esses resultados sugerem que está havendo a incorporação dessas nanoestruturas na membrana (YANG, et al., 2018). Tal fenômeno pode ser explicado pela interação eletrostática que as AgNPs têm com as estruturas químicas da CB (YANG, et al., 2018). A porosidade das membranas também colabora com a fixação das nanoestruturas, fazendo com que uma maior quantidade de AgNPs sejam incorporadas e formando um biopolímero com novas propriedades (AgNPs-CB) (CHEN et al., 2018).

Figura 12 - Espectro eletrônico UV-VIS com o decréscimo da banda no meio reacional, AgNPs (preta), AgNPs-CB com 1 dia de reação (vermelha) AgNPs-CB com 3 dias de reação (verde), AgNPs-CB com 5 dias de reação (azul escuro), AgNPs-CB com 7 dias de reação (azul claro).



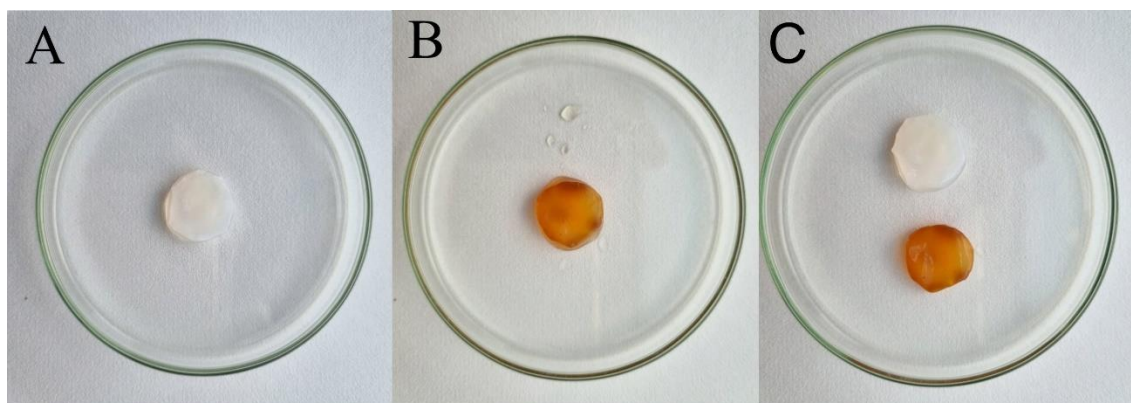
Fonte: o autor

A síntese bem-sucedida da membrana de celulose bacteriana (CB) contendo nanopartículas de prata (AgNPs) foi alcançada com êxito. Os resultados revelaram uma transformação na coloração das membranas de CB purificadas quando expostas aos sobrenadantes contendo a dispersão de AgNPs. Visualmente é possível ver a mudança de coloração de branco opaco para um tom castanho escuro que sugere a incorporação/imobilização de nanopartículas de prata (JENKHONGKARN, R.; PHISALAPHONG, M, 2023). Em contraste, as membranas de CB nos controles negativos mantiveram sua característica incolor ao longo do tempo de incubação. A Figura 13 ilustra a membrana de CB antes e após a impregnação com as nanopartículas.

A composição da celulose bacteriana é caracterizada por redes tridimensionais não tecidas que são preenchidas com um grande número de poros. Quando colocados em uma dispersão de AgNPs, os íons de prata conseguem atravessar facilmente a celulose bacteriana, entrando nos poros do material. Os íons Ag^+ assim absorvidos apresentam afinidade pelas microfibras de celulose bacteriana, sendo provável que essas interações ocorram através do mecanismo eletrostático. Essa interação é prevista porque os átomos

de oxigênio, presentes nos grupos polares hidroxila e éter da celulose bacteriana, tendem a se associar com íons metálicos positivos (HE; KUNITAKE; NAKAO, 2003; BARUD, et al, 2008).

Figura 13 - Mudança de coloração das membranas de CB com a incorporação das AgNPs com 1 dia (A), 7 dias (B) e comparativo de celulose antes da incorporação e depois dos 7 dias (C).

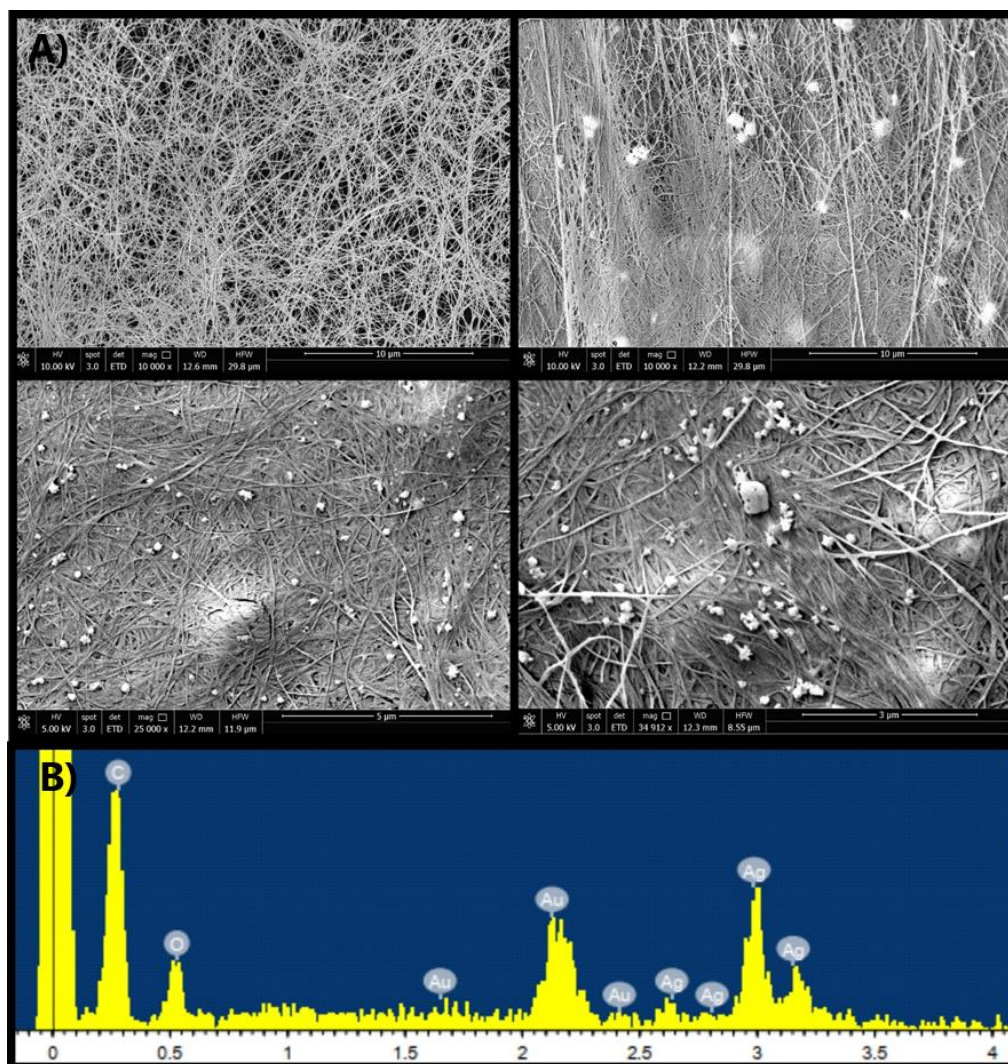


Fonte: o autor.

As fibras de celulose bacteriana (CB) foram preparadas e posteriormente observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FE-MEV), revelaram características notáveis, figura (14-A). Os filmes compostos inteiramente por celulose bacteriana, sem tratamento adicional, exibiram fibras celulósicas com uma intrincada rede tridimensional de poros organizados de maneira precisa. Devido à sua elevada área superficial, a celulose bacteriana demonstrou uma notável capacidade de retenção de outras moléculas. Esse atributo contribui para a expansão das capacidades da celulose bacteriana no que diz respeito à retenção de AgNPs, pois (Jinga et al., 2013; Audtarat et al., 2022) a CB e as NPs não geram interação entre si, com as NPs apenas ficando aderidas as fibras de CB, sendo algo vantajoso quando pensamos na questão de liberação destas AgNPs para ação bactericida.

A estrutura esponjosa do compósito de celulose bacteriana pode ter facilitado a migração eficiente das partículas de prata em direção à superfície das fibras celulósicas. Esse fenômeno resultou em uma distribuição de partículas de prata ao longo da superfície da fibra, conferindo-lhe propriedades únicas e promissoras para aplicações que demandam uma distribuição uniforme de materiais funcionais (KHAMRAI et al., 2019). A análise EDS da CB impregnada com AgNPs, confirmou a existência de prata nas membranas, como representado na figura (14-B).

Figura 14 – (A) Micrografia das membranas de celulose bacteriana antes e depois da impregnação por AgNPs. (B) Análise de Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS).

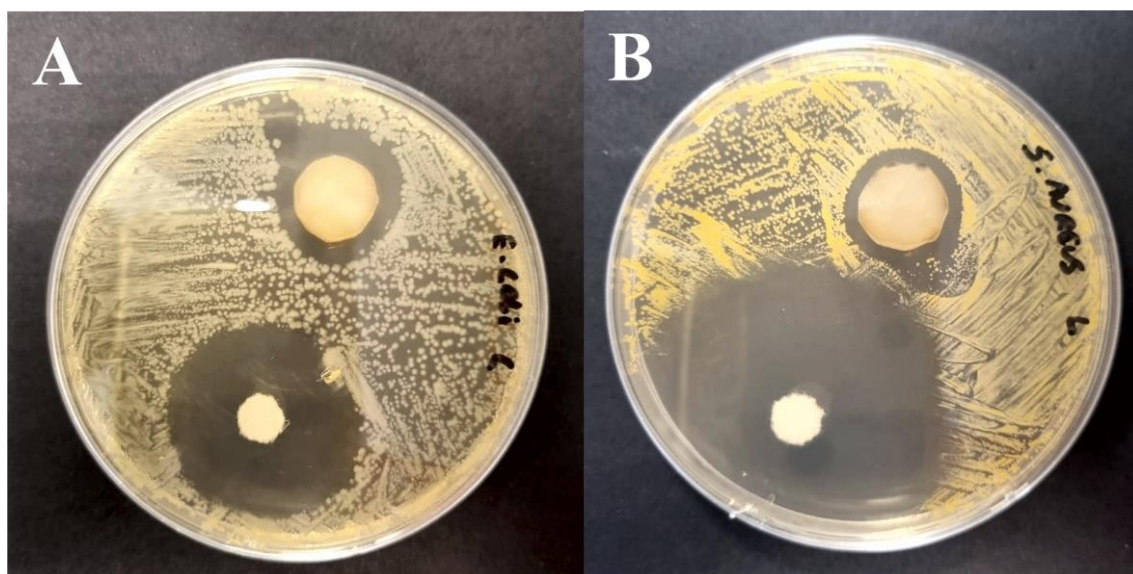


Fonte: o autor.

Após a incorporação das AgNPs na CB foi avaliado a atividade bactericida em dois grupos de bactérias. Na figura 15 observa-se o resultado da análise microbiológica por halo de inibição contra duas bactérias pertencente a dois grupos distinto, *E. coli* (Gram-negativa) e *S. aureos* (Gram-positiva). Para a bactéria Gram-negativa obtivemos uma inibição mais assertiva, tendo uma área de $6 \pm 1,2$ mn, valor superior aos $3 \pm 1,8$ mn visualizados na Gram-positiva. Essa diferença é delimitada por fatores característicos de cada grupo. No qual as *S. aureos* apresentam mecanismos de defesas, como presença de ácido lipoteicóico, sendo uma função de proteção contra agente externos; e uma maior

espessura de sua parede celular, dificultando a ação das nanopartículas (MOHANBABA; GURUNATHAN, 2016; WALKER, 2002). Esses fatores que beneficiam as Gram-positivas (*S.aureos*) são decisivos na eficácia da ação bactericida das AgNPs (MOHANBABA; GURUNATHAN, 2016; WALKER, 2002).

Figura 15 - Halo de inibição contra as bactérias (A) *E. coli* e (B) *S. aureos* após de 24 horas.



Fonte: o autor

6 CONCLUSÕES

Em suma já há trabalhos publicados que abordam a composição química da casca da laranja (*Citrus sinensis*) e suas biomoléculas (flavonoides e terpenoides) com propriedades essenciais para utilização na síntese verde de nanopartículas prata. Obteve-se resultados de análise DLS satisfatórias, atestando um tamanho médio de polidispersividade dentro dos padrões, junto com um potencial zeta e PDI indicando uma reação com estabilidade e pouca variação de tamanho das nanopartículas. Esses resultados nos mostram que para as condições apresentadas a qualidade das AgNPs se mostraram estruturalmente boas para sua aplicação como bactericida.

Em vista disso, a incorporação das AgNPs em CB foi realizada com exatidão, sendo possível visualiza-las por meio do MEV, nos fornecendo uma micrografia (figura 13-A) nítidas das nanopartículas aderidas ao biopolímero. Dados de EDS corroboraram para provar que aquilo que foi visualizado claramente tinha prata.

Por fim, os testes antimicrobiológicos do biopolímero multicomponente, utilizando bactérias dos grupos Gram-positiva e Gram-negativa resultou em uma ação bactericida nas duas placas de Petri, entretanto, as Gram-positivas foram inibidas com maior eficiência, devido suas diferenças estruturais com as Gram-negativas, que possuíam armas de defesa contra agentes externos.

7 REFERENCIAS

ABDALLA, S.; DADALTI, P. Uso da sulfadiazina de prata associada ao nitrato de cério em úlceras venosas: relato de dois casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 2, p. 227-233, 2003.

AHMED, S. et al. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 1, p. 17–28, 2016a.

AHMED, S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2016b.

AL-RUBAYE, H. I. et al. Green Chemistry Synthesis of Modified Silver Nanoparticles. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1664, n. 1, p. 1–26, 2020.

ALHARBI, N. S.; ALSUBHI, N. S.; FELIMBAN, A. I. Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 15, n. 3, p. 109-124, 2022.

ALKHULAIFI, M. M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using Citrus limon peels and evaluation of their antibacterial and cytotoxic properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 3434-3441, 2020.

AMIRJANI, A.; FATMEHSARI, D. H. Colorimetric detection of ammonia using smartphones based on localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles. **Talanta**, v. 176, n. 12, p. 242-246, 2018.

AUDTARAT, S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles loaded into bacterial cellulose for antimicrobial application. **Nanocomposites**, v. 8, n. 1, p. 34-46, 2022.

BARUD, H. S. et al. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 515-518, 2008.

BARUD, H. S. et al. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. *Journal of Nanomaterials*, v. 2011, p. 1-8, 2011.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, v. 235, n. 12, p. 337-351, 2016.

BEYENE, H. D. et al. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 13, n. August, p. 18–23, 2017.

BHUI, D. K. et al. Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 145, n. 1, p. 33-37, 2009.

BRUNA, T. et al. Silver nanoparticles and their antibacterial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 7202, 2021.

BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 46-54, 2014.

CARSON, L. et al. Green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial properties using *Phyllanthus dulcis* plant extract. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 8, p. 504-511, 2020.

CHEN, S. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose synthesised by diverse strains of the genus *Komagataeibacter*. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 87-95, 2018.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. In: Scontt, E. McNeil (Ed.). Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. **New York:Humana Press**, p. 63-70, 2011.

DE LIMA, E. D. et al. Principais etiologias e o aumento da resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antimicrobianos frente a COVID-19: uma revisão integrativa: Main etiologies and the increase in bacterial resistance by the indiscriminate use of antimicrobials against COVID-19: an integrative review. **Brazilian Journal of Development**, p. 59436-59456, 2022.

DE OLIVEIRA B., H. G. et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406-420, 2016.

DEMURTAS, M.; PERRY, C. C. Facile one-pot synthesis of amoxicillin-coated gold nanoparticles and their antimicrobial activity. **Gold Bull**, v. 47, p. 103–107, 2014.

DORES, H. F. et al. Utilização de fontes de carbono alternativas para a produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus*. **SENAI**. Trabalho de Conclusão de curso (Curso Técnico em Biotecnologia), 2017

ETEBU, E.; NWAUZOMA, A. B. A review on sweet orange (*Citrus sinensis* L Osbeck): health, diseases and management. **American Journal of Research Communication**, v. 2, n. 2, p. 33-70, 2014.

GIWA, S. O.; MUHAMMAD, M.; GIWA, A. Utilizing orange peels for essential oil production. **Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 13, n. 1, p. 17-27, 2018.

GOMES, A.; COSTA, N.; MOHALLEM, NELCY. Os Tecidos e a Nanotecnologia. **Química Nova na Escola**. 2016.

GORGIEVA, S.; TRČEK, J. Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 9, n. 10, p. 1352, 2019.

GUPTA, A. et al. Synthesis of silver nanoparticles using curcumin-cyclodextrins loaded into bacterial cellulose-based hydrogels for wound dressing applications. **Biomacromolecules**, v. 21, n. 5, p. 1802-1811, 2020.

HABIBULLAH, G.; VIKTOROVA, J.; RUMML, T. Current Strategies for Noble Metal Nanoparticle Synthesis. **Nanoscale Research Letters**, v. 16, n. 1, 2021.

HADRUP, N.; SHARMA, A. K.; LOESCHNER, K. Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 98, n. 8, p. 257-267, 2018.

HE, J.; KUNITAKE, T.; NAKAO, A. Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 23, p. 4401-4406, 2003.

HOSSEINI, H. et al. Lightweight aerogels based on bacterial cellulose/silver nanoparticles/polyaniline with tuning morphology of polyaniline and application in soft

tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 57-67, 2020.

HUAIZHI, Z.; YUANTAO, N. China's ancient gold drugs. **Gold Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 24-29, 2001.

HUSSAIN, M., RAJA, NI, IQBAL, M. *et al.* Aplicações de Flavonóides Vegetais na Síntese Verde de Nanopartículas de Prata Coloidal e Impactos na Saúde Humana. **Irã J Sci Technol Trans Sci**. v. 43, p. 1381–1392, 2019.

IJAZ, M; ZAFAR, M; IQBAL, T. Green synthesis of silver nanoparticles by using various extracts: a review. **Inorganic and Nano-Metal Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 744-755, 2020.

INNS, E. L. *et al.* Effect of modification of the kilning regimen on levels of free ferulic acid and antioxidant activity in malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9335-9343, 2011.

JAIN, S.; MEHATA, M. S. Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

JENKHONGKARN, R.; PHISALAPHONG, M. Effect of Reduction Methods on the Properties of Composite Films of Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles. **Polymers**, v. 15, p. 2996, 2023.

JIANG, S. *et al.* A novel U-bent plastic optical fibre local surface plasmon resonance sensor based on a graphene and silver nanoparticle hybrid structure. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 16, p. 165-175, 2017.

JJI, S. *et al.* Bacterial cellulose matrix with in situ impregnation of silver nanoparticles via catecholic redox chemistry for third degree burn wound healing. **Carbohydrate polymers**, v. 245, p. 116573, 2020.

JINGA, S. I. *et al.* Silver green synthesis on bacterial cellulose membranes using tannic acid. **Dig. J. Nanomater. Bios**, v. 8, n. 4, p. 1711-1717, 2013.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation Stability**, v. 59, p. 101-106, 1998.

KAABIPOUR, S.; HEMMATI, S. A review on the green and sustainable synthesis of silver nanoparticles and one-dimensional silver nanostructures. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 12, p. 102–136, 2021.

KALWAR, K.; SHAN, D. Antimicrobial effect of silver nanoparticles (AgNPs) and their mechanism—a mini review. **Micro & Nano Letters**, v. 13, n. 3, p. 277-280, 2018.

KHAMRAI, M. *et al.* A mussel mimetic, bioadhesive, antimicrobial patch based on dopamine-modified bacterial cellulose/rGO/Ag NPs: a green approach toward wound-healing applications. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 14, p. 12083-12097, 2019.

KHEZERLOU, A. *et al.* Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. **Microbial pathogenesis**, v. 123, p. 505-526, 2018.

KIM, J. H. Extraction time and temperature affect the extraction efficiencies of coumarin and phenylpropanoids from *Cinnamomum cassia* bark using a microwave-assisted extraction method. **Journal of Chromatography B**, v. 1063, p. 196-203, 2017.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose. In: de Baets, S., Vandamme, E., Steinbüchel, A. (Eds.), Biopolymers. **Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes**. Wiley-VCH Weinheim, v. 6, p. 275–319, 2004.

KODURU, J. R. *et al.* Phytochemical-assisted synthetic approaches for silver nanoparticles antimicrobial applications: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 256, n.2, p. 326-339, 2018.

KUMAR, Y (Ed.). **Antimicrobial resistance: a global threat**. BoD—Books on Demand, 2019.

LARA, H. H.; GARZA-TREVIÑO E. N.; IXTEPAN-TURRENT L.; e SINGH D. K.; Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. v. 9, 2011.

LIN, D. *et al.* Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 1007-1019, 2020.

LIU, L. et al. Study on binding modes between cellobiose and β -glucosidases from glycoside hydrolase family 1. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 2, p. 837-843, 2012.

LOHBAUER, C. A Indústria Brasileira de suco de laranja. **Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos**, p. 1-37, 2021.

NQAKALA, Z. B. et al. Advances in nanotechnology towards development of silver nanoparticle-based wound-healing agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 11272, 2021.

NAM, G. et al. Investigating the versatility of multifunctional silver nanoparticles: preparation and inspection of their potential as wound treatment agents. **International Nano Letters**, v. 6, n. 1, p. 51-63, 2016.

NIDHIJA, R. et al. Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 807-812, 2013,

MEVA, F. et al. Stachytarpheta cayennensis aqueous extract, a new bioreactor towards silver nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 10, n. 2, p. 102-119, 2019.

MIRANDA, A. F. M. Determinação dos teores de flavonas e flavanonas em cascas de frutas cítricas cultivadas no Brasil para posterior isolamento e aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica. **Universidade federal do rio de janeiro**, 2013.

MOG, M. et al. Problems of antibiotic resistance associated with oxytetracycline use in aquaculture: A review. **J. Entomol. Zool. Stud.**, v. 8, p. 1075-1082, 2020.

MOHANBABA, S.; GURUNATHAN, S. Differential biological activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria: A novel approach for antimicrobial therapy. In: Grumezescu, A. M. (Ed.). **Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy**. Bucureste: William Andrew Applied Science Publishers, p. 193-227, 2016.

MORENA, A. G. et al. Laccase/TEMPO-mediated bacterial cellulose functionalization: production of paper-silver nanoparticles composite with antimicrobial activity. **Cellulose**, v. 26, n. 16, p. 8655-8668, 2019.

MORMINO, R. P. Evaluation and applications of a rotating disk reactor producing bacterial cellulose. 130 f. Thesis (Chemical Engineering), Faculty of Rensselaer Polytechnic Institute, 2002.

OLIVEIRA, N. A. et al. Use of antibiotics in animal production and its impact on human health. **J. Food Chem. Nanotechnol**, v. 6, p. 40-47, 2020.

PAL, S.; KYUNG, Y.; SONG, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1712-1720, 2007.

PALADINI, F.; POLLINI, M. Antimicrobial silver nanoparticles for wound healing application: progress and future trends. **Materials**, v. 12, n. 16, p. 2540, 2019.

PIRES, T. C. M, RIBEIRO, M. G. T. C, MACHADO, A. A. S. C. Extração do r-(+)-limoneno a partir das cascas de laranja: avaliação e otimização da verduza dos processos de extração tradicionais. **Quim. Nova**, Vol. 41, No. 3, 355-365, 2018.

RAFIQUE, M. et al. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. Artificial Cells, **Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 7, p. 1272–1291, 2017.

ROY, A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. **RSC advances**, v. 9, n. 5, p. 2673-2702, 2019.

SAINI, R. K. et al. Bioactive compounds of citrus fruits: A review of composition and health benefits of carotenoids, flavonoids, limonoids, and terpenes. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 239, 2022.

SANTOS, J. F. L. et al. Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1098-1111, 2016.

SANTOS, S. S. dos et al. Production of Silver Nanoparticles Mediated by Aqueous Extracts of Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) Pulp. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, p. 705-712, 2023.

SINGH, A. et al. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. **Biotechnology Reports**, v. 25, n. 7, p. 400-427, 2020.

SINGH, D. K. et al. Mycosynthesis of bactericidal silver and polymorphic gold nanoparticles: physicochemical variation effects and mechanism. **Nanomedicine**, v. 13, n. 2, p. 191-207, 2018.

SINGH, P. et al. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588-599, 2016.

SONG, S. et al. Antibacterial polyvinyl alcohol/bacterial cellulose/nano-silver hydrogels that effectively promote wound healing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 126, p. 112171, 2021.

SWINGLER, S. et al. Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine. **Polymers**, v. 13, n. 3, p. 412, 2021.

TALEBI, B. A. A. et al. World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. **BioNanoScience**, v. 9, n. 4, p. 778-788, 2019.

TAPIAS, Y. A. R. et al. Produção de filmes de celulose bacteriana pela comunidade simbiótica de Kombucha cultivada em diferentes infusões de ervas. **Food Chemistry**, v. 372, 2022.

VILA, L.; MARCOS, R.; HERNÁNDEZ, A. Long-term effects of silver nanoparticles in caco-2 cells. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 6, p. 771-780, 2017.

WALKER, T. S. **Microbiologia**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2002. p. 157-204.

WANG, M. et al. Probing bianisotropic biomolecules via a surface plasmon resonance sensor. **Optics express**, v. 26, n. 22, p. 28277-28287, 2018.

WEI, L. et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595-601, 2015.

XU, L. et al. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. **Theranostics**, v. 10, n. 20, p. 8996–9031, 2020.

YANG, Y. et al. Nanoporous cellulose membrane doped with silver for continuous catalytic decolorization of organic dyes. **Cellulose**, v. 25, p. 2547-2558, 2018.