

Avaliação Projeto

Alunos (as): Andrew Seth Missono Watanuki; Antônio Romano Santos; Giovana Kaori Mori; João Renato Gasparini Licerre; João Pedro de Lima.

(Grupo 1, Turma A)

Título: Preparação e caracterização de nanopartículas de prata para aplicação tópica em infecções com feridas abertas por *Staphylococcus aureus* multirresistente.

Nota: 5,05

- Cada grupo irá entregar um trabalho escrito de no máximo 12 páginas contendo:
 1. Resumo (1 página); **não tinha resumo**
 2. Introdução (máximo de 2-3 páginas);
 3. Métodos utilizados (descrevendo as massas pesadas, equipamentos, vidrarias, etc.);
 4. Resultados e discussão;
 5. Potencial aplicação da nanoestrutura indicando um produto que poderá ser obtido com essa nanoestrutura; **não indicou**
 6. Conclusão;
 7. Referências (Letra Times New Roman, 12, espaçamento 1,5).

Resumo	Clareza e objetividade; uso correto dos conceitos; resumo adequado ao relatório do projeto; capacidade de síntese sem perda de informações.	(1,5 pontos) Não apresentou (0)
Introdução	Embasamento teórico; contextualização; problematização; atualidade, originalidade e relevância.	(1,5 pontos) 0,75 Introdução muito breve, faltaram informações (DLS não é só para ver o tamanho das partículas); Poderia ter explorado melhor a aplicação que foi proposta (no texto apresentaram argumentos não relacionados com a aplicação proposta – por exemplo, nanoestrutura

		com fármaco, aplicação em pigmentos, tintas, que não são aplicações farmacêuticas). Não indicou as referências e usou poucas referências.
Métodos	Clareza e objetividade; descrição correta dos procedimentos; coerência dos métodos com o intuito do projeto.	(2,0 pontos) Apresentou de forma desorganizada, junto com resultados e as tentativas feitas durante a execução do projeto. Não comentou sobre o método de produção de nanopartículas de prata, apenas citou como foi feito. (1,0)
Resultados e discussão	Capacidade de comunicação; articulação; clareza e objetividade; concordância com o problema e os objetivos.	(2,0 pontos) Poderia melhorar a forma de escrever, com mais clareza, mais formal. Poderia ter comparado com outros trabalhos com o mesmo objetivo, buscado mais referências. (1,5)
Potencial da nanoestrutura	Conhecimento da aplicação; referências adequadas.	(1,0 ponto) Não apresentou este tópico, mas discutiu brevemente ao longo do relatório. Poucas referências, algumas que não se aplicam a formulação que fizeram. (0,5)
Conclusão	Clareza, objetividade, concordância com os objetivos.	(1,0 ponto) Texto poderia ser mais objetivo. Apresentou uma conclusão de acordo com os objetivos, exceto quando mencionam a falta de tempo para preparar o gel e incorporar as nanopartículas. (0,8)
Referências	Organização, formatação; referências correspondem às citadas no texto.	(0,5 ponto) Não utilizou fonte Times new roman como foi solicitado. Referências sem padronização (0,25)

Adequação à estrutura do documento	Formatação do documento; estrutura (resumo, introdução, métodos, resultados e discussão, conclusões, referências); número de páginas.	(0,5 ponto) Não seguiu a estrutura solicitada. Sem resumo, sem seção de métodos, resultados e discussão separados. (0,25)
------------------------------------	---	--

Total: 5,05

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP

Farmacotécnica, Tecnologia de Medicamentos e Cosméticos V



Preparação e caracterização de nanopartículas de prata para aplicação tópica em infecções com feridas abertas por *Staphylococcus aureus* multirresistente.

Turma A - Grupo 1

Andrew Seth Missono Watanuki - 11215171

Antônio Romano Santos - 11214920

Giovana Kaori Mori - 9849754

João Renato Gasparini Licerre - 10730744

João Pedro de Lima - 11395691

Novembro/2023

Ribeirão Preto - SP

1. Introdução

Atualmente, em um cenário marcado pelo rápido desenvolvimento da resistência microbiana aos antimicrobianos convencionais e pela dificuldade de introduzir novos medicamentos e compostos, é de alta relevância buscar novas alternativas. O impacto da evolução dos mecanismos de resistência antimicrobiana no sistema de saúde pública se traduz em tempos de tratamento mais prolongados, estadias hospitalares prolongadas e um aumento substancial nos custos associados aos equipamentos e instalações de saúde.

As nanopartículas metálicas, em geral, e as nanopartículas de prata (AgNPs), em particular, têm despertado grande interesse na comunidade científica. Há um longo histórico de conhecimento sobre a notável capacidade da prata em demonstrar uma forte toxicidade contra uma ampla variedade de microorganismos. Por essa razão, os compostos contendo prata têm sido extensivamente empregados em diversas aplicações com propriedades bactericidas. O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria pertencente ao grupo de cocos gram-positivos, comumente encontrada na microbiota humana. No entanto, essa bactéria tem a capacidade de desencadear uma variedade de doenças, que vão desde infecções simples, como espinhas e furúnculos, até condições mais graves, incluindo pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras. Embora tenha sido uma das primeiras bactérias controladas com a descoberta de antibióticos, o *Staphylococcus aureus* tornou-se uma das espécies mais significativas no contexto das infecções hospitalares e comunitárias devido à sua notável capacidade de adaptação e desenvolvimento de resistência aos tratamentos.

1.1 Vantagens da utilização de nanopartículas

De maneira geral, a nanotecnologia farmacêutica é de grande importância, pois envolve a caracterização, desenvolvimento e aplicação de sistemas terapêuticos que têm o intuito de controlar e direcionar a liberação de fármacos. Em relação às nanopartículas de prata (AgNPs), que serão estudadas neste projeto, pode-se dizer que possuem importantes propriedades, como o elevado efeito catalítico, boa condutividade, grande área superficial e alta atividade antimicrobiana. Por estarem nanoparticuladas, as soluções coloidais de AgNPs apresentam alta relação de área por volume, caracterizando a principal vantagem da nanopartícula do ativo: atividade antimicrobiana contra vários tipos de microorganismos (bactérias gram-negativas, gram-positivas, vírus e fungos).

Essa nanoestrutura permite que o fármaco mantenha suas concentrações em níveis adequados durante longos períodos de tempo, previne sua degradação e possibilita que o fármaco seja entregue em lugar adequado. Como exemplo, a ação das AgNPs se

dá pelo contato com a membrana celular dos microrganismos, ocasionando danos na permeabilidade e respiração celular, além de os íons de prata liberados das nanopartículas inativarem sua replicação, por atuarem no fosfato das moléculas do DNA. Além disso, os íons de prata geram uma reação com as proteínas das bactérias que contém enxofre, causando a inibição de suas funções enzimáticas.

1.2 Aplicação farmacêutica

Nanopartículas são extremamente pequenas e, devido a esse tamanho reduzido, apresentam uma enorme área superficial. Para minimizar essa área superficial e reduzir a tensão superficial do sistema, as nanopartículas tendem a se unir, formando aglomerados. No entanto, em muitas aplicações, como em alguns pigmentos, tintas e revestimentos, é crucial manter as partículas em dispersão e evitar a aglomeração. Durante qualquer etapa do processo de síntese das nanopartículas, se não for realizado de maneira adequada, as partículas podem se aglomerar indesejavelmente. Para contornar esse problema, é comum empregar surfactantes no processo de síntese ou na etapa de dispersão das nanopartículas (Garcia et al., 2011).

1.3 Caracterização das AgNP's

O Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering - DLS) é uma técnica experimental usada para determinar o tamanho de partículas suspensas em um líquido ou solução coloidal. Essa técnica é frequentemente aplicada em áreas como química, biologia, farmacologia e ciência de materiais para caracterizar o tamanho das partículas dispersas em uma amostra. O princípio básico do DLS é baseado na interação da luz com as partículas em suspensão. Um feixe de luz laser é direcionado para a amostra, e as partículas dispersas interagem com a luz, fazendo com que a luz seja espalhada em várias direções. A velocidade e o padrão do espalhamento da luz dependem do tamanho das partículas em movimento browniano na amostra.

A formação de nanopartículas de prata ocorre gerando estruturas com tamanhos de até 100 nm. O espectro de absorção da solução coloidal de AgNPs, exibe uma banda de absorção em aproximadamente 425 nm, apresentando uma cor amarelo ouro que é característica das AgNPs (Garcia et al., 2011).

2. Objetivos

Esse projeto tem como objetivo a preparação e caracterização de nanopartículas de prata para aplicação tópica em pacientes acometidos por infecções por *Staphylococcus aureus* em feridas abertas na pele, sem resposta a antimicrobianos convencionais.

2.2 Objetivos específicos

1. Obtenção das nanopartículas de prata por redução química de nitrato de prata;
2. Caracterização das nanopartículas de prata obtidas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS);
3. Incorporação na forma farmacêutica final (gel).

3. Desenvolvimento do projeto

3.1 Primeira tentativa (dia 10/10/2023)

◆ Matérias-primas e suas quantidades:

- 25 mL de solução 1,0 mM de AgNO₃ (nitrato de prata) → sal precursor
- 1 mL de solução de citrato de sódio 1% → agente redutor
- 2 mL de poli vinil álcool 0,3% → estabilizante
- Água destilada para dissoluções necessárias

◆ Vidrarias e equipamentos necessários:

- Balança analítica de precisão, agitador magnético a quente, agitador magnético a frio, pulga magnética, proveta de 40 mL, béquer de 10 mL, erlenmeyer de 250 mL, pipeta de Pasteur, eppendorf, aparelho DLS.

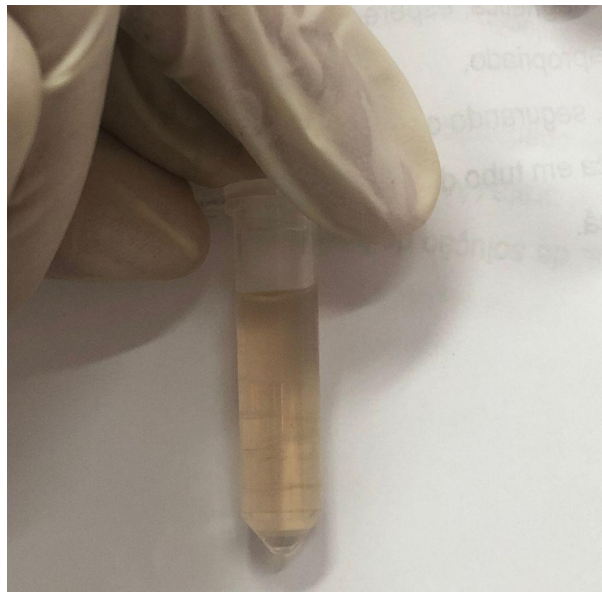
◆ Procedimento:

- Em um erlenmeyer de 250 mL, adicionar 25 mL da solução 1,0 mM de AgNO₃.
- Colocar a barra magnética no erlenmeyer e colocá-lo sobre a placa aquecedora e com agitação a 1100 rpm.
- Quando iniciada a ebulição, iniciar o gotejamento da solução de citrato de sódio (1 gota por segundo, aproximadamente). Gotejar 1 mL da solução de citrato de sódio 1% com pipeta de Pasteur.
- Após o gotejamento finalizado, manter a agitação e aquecimento até que se forme uma coloração amarelada, que indica a redução da prata e a formação de nanopartículas.

- Imediatamente, retirar do aquecimento e colocar em agitador a frio até que a coloração passasse de amarelo pálido para amarelo dourado.
- Retirar da agitação e manter em repouso para esfriar, até atingir temperatura ambiente.
- Para estabilização, adicionar em um eppendorf 2 mL de poli vinil álcool 0,3% e 2 mL da solução de nanopartículas produzida.
- Depois, realizar a leitura da amostra em DLS.

◆ Resultados:

- Potencial Zeta = -7,86 mV
- Índice de polidispersividade (Pdl) = 0,279
- Tamanho da partícula = 188,4 nm



3.2 Segunda tentativa (dia 24/10/2023)

◆ Matérias-primas e suas quantidades

- 25 mL de solução 10 mM de AgNO_3 (nitrato de prata) → sal precursor
- 1 mL de solução de citrato de sódio 1% → agente redutor
- 2 mL de poli vinil álcool 0,3% → estabilizante
- Água destilada para dissoluções necessárias

◆ Vidrarias e equipamentos necessários:

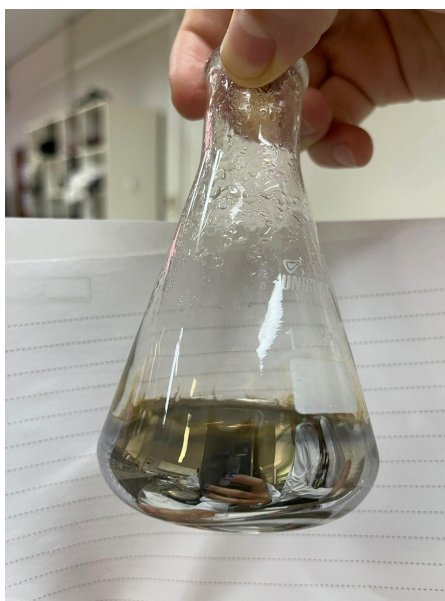
- Balança analítica de precisão, agitador magnético a quente, agitador magnético a frio, pulga magnética, proveta de 40 mL, béquer de 10 mL, erlenmeyer de 250 mL, pipeta automática, eppendorf, aparelho DLS.

◆ Procedimento:

- Em um erlenmeyer de 250 mL, adicionar 25 mL da solução 10 mM de AgNO_3 .
- Colocar a barra magnética no erlenmeyer e colocá-lo sobre a placa aquecedora e com agitação 1100 rpm.
- Quando iniciada a ebulição, iniciar o gotejamento da solução de citrato de sódio (1 gota por segundo, aproximadamente). Gotejar 1 mL da solução de citrato de sódio 1% com pipeta automática.
- Após o gotejamento finalizado, manter a agitação e aquecimento até que se forme uma coloração amarelada, que indica a redução da prata e a formação de nanopartículas.
- Imediatamente, retirar do aquecimento e colocar em agitador a frio até que a coloração passasse de amarelo pálido para amarelo dourado.
- Retirar da agitação e manter em repouso para esfriar, até atingir temperatura ambiente.

◆ Resultados:

Após o gotejamento da solução de citrato de sódio 1% (agente redutor), não se formou uma coloração amarelada, mas sim cinza-prateada, indicando que não houve a formação de nanopartículas, além de deposição de prata metálica na parede da vidraria. Provavelmente se formaram macropartículas de prata que se agregaram e se aderiram ao vidro do erlenmeyer devido à alta concentração de nitrato de prata.



3.3 Terceira tentativa (24/10/2023)

◆ Matérias-primas e suas quantidades

- 40 mL de solução 1 mM de AgNO₃ (nitrato de prata) → sal precursor
- 3 mL de solução de citrato de sódio 1% → agente redutor
- 2 mL de poli vinil álcool 0,3% → estabilizante
- Água destilada para dissoluções necessárias

◆ Vidrarias e equipamentos necessários:

- Balança analítica de precisão, agitador magnético a quente, agitador magnético a frio, barra magnética, proveta de 40 mL, béquer de 10 mL, erlenmeyer de 250 mL, pipeta automática, eppendorf, aparelho DLS.

◆ Procedimento:

- Em um erlenmeyer de 250 mL, adicionar 25 mL da solução 1 mM de AgNO₃.
- Colocar a barra magnética no erlenmeyer e colocá-lo sobre a placa aquecedora e com agitação 1100 rpm.
- Quando iniciada a ebulição, iniciar o gotejamento da solução de citrato de sódio (1 gota por segundo, aproximadamente). Gotejar 3 mL da solução de citrato de sódio 1% com pipeta automática.
- Após o gotejamento finalizado, manter a agitação e aquecimento até que se forme uma coloração amarelada, que indica a redução da prata e a formação de nanopartículas.
- Quando atingida a coloração amarelada, foi retirado 10 mL dessa solução em um béquer e colocado em agitador a frio para continuidade do processo.
- No que restou no erlenmeyer, foi adicionado mais 4 mL de AgNO₃ para avaliação da necessidade de excesso de sal precursor e aparecimento de uma coloração amarela mais escura.
- Após a amostra do béquer atingir a coloração amarelo dourado, foi retirada do agitador a frio e posta em repouso para esfriar, até atingir a temperatura ambiente. Sendo essa a solução SEM excesso de sal precursor (amostra 1).
- A amostra do erlenmeyer, após atingir a coloração desejada, foi colocada em agitador a frio até que atingisse uma coloração amarelo dourado e depois posta em repouso para esfriar, até atingir a temperatura ambiente. Sendo essa a solução COM excesso de sal precursor (amostra 2).

- Por fim, foram preparadas 4 amostras para leitura em DLS:
 - Amostra 1A: 1 mL de NP sem excesso de sal precursor + 1 mL de água destilada
 - Amostra 1B: 1 mL de NP sem excesso de sal precursor + 1 mL de PVA 1,0%
 - Amostra 2A: 1 mL de NP com excesso de sal precursor + 1 mL de água destilada
 - Amostra 2B: 1 mL de NP com excesso de sal precursor + 1 mL de PVA 1,0%


◆ Resultados

Para melhor visualização dos resultados obtidos com as quatro amostras, os valores obtidos do DLS foram organizados na tabela abaixo:

Amostra	Diâmetro (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
1A (- AgNO ₃ e - PVA)	39,69	0,637	-23,6
1B (- AgNO ₃ e + PVA)	85,87	0,441	-6,3
2A (+ AgNO ₃ e - PVA)	53,58	0,747	-17,7
2B (+ AgNO ₃ e + PVA)	80,13	0,467	-12,6

Tabela 1: Avaliação da influência do excesso de AgNO₃ e da adição ou não do agente estabilizante polivinil álcool (PVA) no diâmetro, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta das nanopartículas de prata obtidas experimentalmente.

4. Metodologia proposta para preparação da forma farmacêutica final (gel sanitizante)

Produzir o gel com a adição de 2% (m/v) de hidroximetil  celulose em água destilada sob agitação e aquecimento. Feito a diluição, foi adicionado 5% (m/v) de propileno glicol, 0,1% (m/v) de EDTA e 0,2% (m/v) de metilparabeno, atuando como conservante. Ainda em agitação, quando a temperatura do meio alcançou 70 °C, o aquecimento foi desligado. Após resfriamento até 25 °C, foi incorporado 5% (m/m) de Nanopartículas de Prata (AgNPs), metodologia adaptada de Souza et al., 2019.

5. Discussão

A fim de facilitar a visualização dos resultados de DLS obtidos em cada alteração realizada no protocolo original, foi criada a tabela a seguir:

Tentativas	AgNO ₃ 1,0 mM (mL)	AgNO ₃ 10 mM (mL)	Citrato de sódio 1% (mL)	PVA 0,3% (mL)	Diâmetro (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
1°	25	-	1	2	188,4	0,279	- 7,86
2°	-	25	1	2	Macropartícula		
3°	25	-	3	2	85,87	0,441	- 6,3
	29	-	3	2	80,13	0,467	- 12,6

Tabela 2: Correlação entre o método experimental empregado em cada tentativa (variação das quantidades e concentrações das soluções utilizadas) com os valores obtidos com o DLS de diâmetro de partícula, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta das nanopartículas de prata obtidas nas três tentativas.

De acordo com os dados obtidos e expostos na tabela 2 é possível inferir que as diferentes quantidades e/ou concentrações do sal precursor e do agente redutor surtiram efeito nos parâmetros avaliados pelo DLS. Os resultados obtidos com a primeira tentativa, a qual já estava descrita na literatura (Garcia et al., 2011), foram os mais satisfatórios, quando comparados com os resultados obtidos após as modificações no protocolo. Levando em consideração que tal nanopartícula de prata estudada deve ter apenas um efeito tóxico para manifestações cutâneas ocasionada pela infecção de *S. aureus*, a partícula a ser empregada não pode ter seu diâmetro abaixo de 100 nm, a fim de evitar efeito sistêmico.

Na primeira tentativa obtivemos resultados satisfatórios comparados com a literatura disponível. O tamanho da nanopartícula, potencial zeta e seu índice de polidispersibilidade (PDI) sugerem uma formulação não apenas estável mas também com propriedades antimicrobianas presentes (Ginjupalli et al., 2018). Além disso, trabalho avaliando o potencial antimicrobiano de AgNP, demonstrou que a nanopartícula com tamanho entre 40-70 nm apresentou o maior halo de inibição contra *S. aureus* (Reddy et al., 2014).

Para produzir uma AgNP de tamanho maior, seguindo a hipótese de que uma nanopartícula de Ag com menor diâmetro teria efeito sistêmico, que deve ser evitado pela sua alta toxicidade, foram realizadas outras tentativas. Na segunda tentativa a concentração do sal precursor AgNO₃ foi aumentada, de 1,0 mM para 10 mM, a fim de obter tamanhos maiores de AgNP. Após a adição da solução de citrato de sódio 1% (agente redutor), não ocorreu a coloração amarela esperada. Em vez disso, observou-se

uma coloração cinza-prateada, sugerindo a ausência de formação de nanopartículas e o depósito de prata metálica nas paredes do recipiente de vidro. É possível que tenham se formado partículas maiores de prata, que se aglomeraram e aderiram ao vidro do erlenmeyer devido à elevada concentração de nitrato de prata.

Tendo em vista a formação e deposição de macropartículas de prata na segunda tentativa, a terceira tentativa foi executada logo após. Foi proposto o aumento da quantidade de solução de 1 nM de AgNO_3 ao invés de aumentar a concentração da solução de AgNO_3 . Portanto foi adicionado 4 mL a mais de AgNO_3 a mais do que na primeira tentativa, após o gotejamento de 3 mL do agente redutor obtendo a formação de uma solução de coloração amarelo ouro mais forte que a obtida anteriormente o que acreditávamos ser a formação de nanopartículas maiores, por conta do tom mais escuro. Entretanto, os resultados do DLS demonstraram que obtivemos partículas menores e com maior polidispersão do que na primeira tentativa. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido ao fato da solução ter ficado mais tempo em agitação e ebulição do que nas tentativas anteriores. Portanto o primeiro protocolo proposto seria utilizado para preparação do produto final.

6. Conclusão

Embora tenham sido feitas várias tentativas para aumentar as nanopartículas de prata, o primeiro experimento realizado foi o mais alinhado com as informações disponíveis na literatura. Ao aumentar a concentração do sal precursor AgNO_3 de 1 mM para 10 mM há a formação de agregados de macropartículas, que aderiram à parede da vidraria utilizada. Quando foi mantida as concentrações originais de 1 mM e o aumento do volume inserido na formulação houve a diminuição do tamanho das AgNPs e aumento do índice de polidispersão, o que não condiz com as expectativas do grupo e com as propriedades necessárias para a formulação do produto final. Portanto, o primeiro protocolo de preparo das NPs foi considerado pelo grupo o mais adequado para produzir NPs com tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão adequados para a incorporação na forma farmacêutica proposta e para o uso terapêutico contra manifestações cutâneas da infecção por *Staphylococcus aureus*. O potencial zeta não foi levado em consideração na escolha do protocolo, tendo em vista a utilização de um agente estabilizador polimérico, polivinil álcool (PVA), o que confere estabilidade eletrostática às NPs. O grupo não conseguiu incorporar as nanopartículas de prata na fórmula farmacêutica final pelo tempo limitado na execução do projeto.

7. Referências

- Lorraine Mulfinger, Sally D. Solomon, Mozghan Bahadory, Aravindan V. Jeyarajasingam, Susan A. Rutkowsky, and Charles Boritz. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education** 2007 84 (2), 322. DOI: 10.1021/ed084p322
- Garcia, D. G., Santos, K. O., Freitas, K. F. D., Cardoso, M. J. B., & Fook, M. V. L. (2021). Síntese de Nanopartículas de Prata pela Técnica de Eletrodeposição para Desenvolvimento de Biossensores. **Brazilian Journal of Development**, 7(3), 31130–31145. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-709>
- GARCIA, Marcus V. D. Síntese, caracterização e estabilidade de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. Campinas, 2011. 89 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- Souza, M. S., Santos, I. J. B., Bianchi, J. R. Avaliação antimicrobiana de hidrogel de PVA e gel de Propilenoglicol incorporado com Nanopartículas de Prata como sanitizantes. **Revista Higiene Alimentar**, v.33, p. 1600-1604 - Abril, 2019.
- Ginjurpalli, K., Shaw, T., Tellapragada, C., Alla, R., Gupta, L., Upadhyya, N. Does the size matter? Evaluation of effect of incorporation of silver nanoparticles of varying particle size on the antimicrobial activity and properties of irreversible hydrocolloid impression material, **Dental Materials**, Volume 34, Issue 7, 2018, Pages e158-e165, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.016>.
- Reddy NJ, Nagoor Vali D, Rani M, Rani SS. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by Piper longum fruit. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 2014;34:115-122. doi:10.1016/j.msec.2013.08.039