

EFEITO ANTICANCERÍGENO DE NANOCOMPÓSITOS BINÁRIOS E TERNÁRIOS PRODUZIDOS POR MOLDAGEM COMPRESSIVA¹

ANTICANCER EFFECT OF BINARY AND TERNARY NANOCOMPOSITES PRODUCED BY COMPRESSIVE MOLDING

Natália Zago Sentena², Ingrid Rosales Costa³, Camila Medianeira da Silva D'avila⁴, Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden⁵, Francine Carla Cadoná⁶, Lailla Daianna Soltau Missio Pinheiro⁷ e Sergio Roberto Mortari⁸

RESUMO

A fabricação de diferentes nanomateriais com distintas características físico-químicas estão sendo pesquisadas, principalmente nas áreas biológicas e farmacêuticas. As nanopartículas (NPs) são grupos de átomos, íons ou moléculas que possuem dimensões entre 1-100 nm. É difundido na pesquisa o uso de quitosana (CH), nanopartículas de prata (AgNPs) e nanotubos de carbono (NTC) em bactérias, contudo, as aplicações celulares desses nanomateriais combinados, ainda carecem de mais investigações. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade anticancerígena da combinação destes nanomateriais (CH, AgNPs e NTC), obtidos após compactação. Os nanomateriais produzidos foram caracterizados por DRX e compactados por meio de uma prensa hidráulica (discos contendo 100 mg). A quantidade de NTC avaliada na obtenção dos discos foi de 3, 5 e 10 mg (m/m). Os difratogramas, obtidos das amostras, mostraram que não houve diferenças significativas nas estruturas cristalinas, das combinações ternárias, apesar da variação na quantidade dos NTC incorporados. Em relação aos testes *in vitro*, as amostras foram testadas em células de linhagem de câncer colorretal (HT-29) pelos ensaios de MTT, PicoGreen, NO, DCFH-DA e coloração de violeta genciana. Foi possível avaliar significativa diferença entre as amostras binárias compostas por CH/NTC, principalmente nas duas amostras com menor quantidade de NTC. Já as amostras ternárias apresentaram resultados adequados para os parâmetros dos ensaios, portanto, promissores para uma sequência da pesquisa.

Palavras-chave: Polímero, nanomateriais, Células de câncer colorretal

ABSTRACT

The preparation of different nanomaterials with distinct physicochemical characteristics as been widely researched, mainly in the biological and pharmaceutical areas along the last years. Nanoparticles (NPs) are groups of ions or molecules that have dimensions between 1-100 nm. The use of chitosan (CS), silver nanoparticles (AgNPs), and carbon nanotubes (CNTs) in bacteria is widespread in research. However, the cellular applications of these combined nanomaterials still need further investigation to evaluate the anticancer capacity from the combination of these nanomaterials (CS, AgNPs, and CNTs) obtained after compaction. The nanomaterials produced were individually characterized by XRD and compacted by using a hydraulic press

1 Trabalho Final de Graduação. Curso de Engenharia Biomédica. Universidade Franciscana - UFN.

2 Curso de Engenharia Biomédica. Universidade Franciscana. natalia.zago@ufn.edu.br

3 Curso de Engenharia Biomédica. Universidade Franciscana. ingrid.costa@ufn.edu.br

4 Aluna de Biomedicina. Universidade Franciscana. camila.davila@ufn.edu.br

5 Professor do curso de Engenharia Química - Universidade Franciscana. cristianorbr@ufn.edu.br

6 Professora do curso de Farmácia. Universidade Franciscana. f.cadona@ufn.edu.br

7 Coordenadora, PPG em Nanociências - Universidade Franciscana. laillapinheiro@ufn.edu.br

8 Orientador, Professor do curso de Engenharia Química- Universidade Franciscana. mortari@ufn.edu.br

(disks containing 100 mg). The amounts of CNTs evaluated to accomplish the discs were 3, 5, and 10 mg (m:m). The diffractograms obtained from the samples showed that there were no significant differences in the crystalline structures of the ternary combinations, despite the variation in the amount of incorporated CNTs. Regarding the *in vitro* tests, the samples were tested in colorectal cancer cells (HT-29) by MTT, PicoGreen, NO, DCFH-DA, and gentian violet staining assays. It was possible to evaluate a significant difference between the binary samples composed of CS/CNTs, mainly in the two samples with the lowest amount of CNTs. The ternary samples, on the other hand, showed higher toxicity against the cancer cells in comparison of the NPs independently, therefore promising for further investigations.

Keywords: Polymer, Nanomaterials, Colorectal cancer cells

INTRODUÇÃO

A incorporação de nanopartículas (NPs) é significativamente promissora nas áreas biológicas e da saúde, diferenciando de macro ou micropartículas, principalmente pela grande área superficial, que aumenta à medida que atinge a dimensão nanométrica (RAMEZANPOUR M. *et al.*, 2022). Estudos desenvolvidos por Suchithra *et al.* (2021), Moisés *et al.* (2022) e Nagaraj *et al.* (2022) relatam atividade microbiana, antioxidante, anticancerígena, antiviral, antifúngica, antibacteriana, e anti-inflamatória atribuídas ao uso das nanopartículas metálicas de prata e de ouro.

A quitosana (CH) é um amino polissacarídeo natural, encontrada em crustáceos, não tóxicas, biocompatível e biodegradável (Abruzzo *et al.* (2016). Asghar *et al.* (2020), usaram nanopartículas de prata (AgNPs) decoradas com quitosana (CH), sugerindo que juntos, estes materiais podem ser utilizados como agentes antibacteriano e anticoagulante, com uma baixa toxicidade.

Sendo um alótropo do carbono, os nanotubos de carbono (NTC) são materiais tubulares, cilíndricos com diâmetro interno nanométrico, podendo atuar como carreadores de fármacos, armazenar energia, tem alta resistência mecânica, e elevada integridade estrutural, alta leveza e alta estabilidade química. (JAYALAKSMI & JEYANTHI, 2021).

Kassem *et al.* (2019) propuseram um nanocompósito constituído de CH e NTC visando aumentar a área de superfície por volume. Segundo os autores, os compósitos produzidos com nanomateriais de carbono, possuem propriedades intrínsecas, como morfologia, alta carga superficial, possibilidade de funcionalização, com a vantagem de ser biocompatível e não citotóxico.

Este estudo teve como objetivo produzir e caracterizar nanocompósitos contendo quitosana (CH), quitosana com nanopartículas de prata (CH@AgNPs) e quitosana com nanopartículas de prata e com nanotubos de carbono (CH@AgNPs@NTC) e, obter por compactação, discos contendo estes nanocompósitos. Também objetivou-se avaliar a viabilidade celular destes nanocompósitos (estresse oxidativo, espécies reativas e concentração de DNA) em células HT-29.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Os reagentes e equipamentos utilizados no presente estudo foram: Nitrato de Prata-Vetec® (Alemanha); Ácido clorídrico-Synth® (Brasil); Quitosana (Qbpm; 50-190 KDa) Sigma Aldrich® (Brasil); forno tubular (Jung, modelo LT3.9013®, 1300 °C (Brasil); Fluxômetro múltiplo (Hidrogênio/Argônio/Etileno) da Aalborg® (USA) modelo

P31SIVA; pHmetro-Digimed DM-22® (Brasil); Centrifuga -Spinlab/ Mod. SL16RAV® (Brasil); fonte de alimentação regulável - HF-3003S DC HIKARI® (Brasil); Difractometro de Raios-X - D2 Phase, Bruker® (Alemanha); Potencial Zeta- Malvern® (UK), modelo ZEN3600; Prensa Hidráulica Specac® (UK). Em todo o trabalho utilizou-se água de alta pureza (Milli-q - Millipore®, Alemanha).

PRODUÇÃO CATALISADOR

O catalisador utilizado na produção dos NTC (NiFe_2O_4) foi produzido conforme Zampiva *et al.* (2018), pelo método de combustão em solução. Foram empregados os precursores $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (32,32 g) e $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (11,60 g) em solução aquosa, e glicina (3,00 g) como agente complexante e combustível. A composição do precursor ativo foi calculada usando a equação (1).



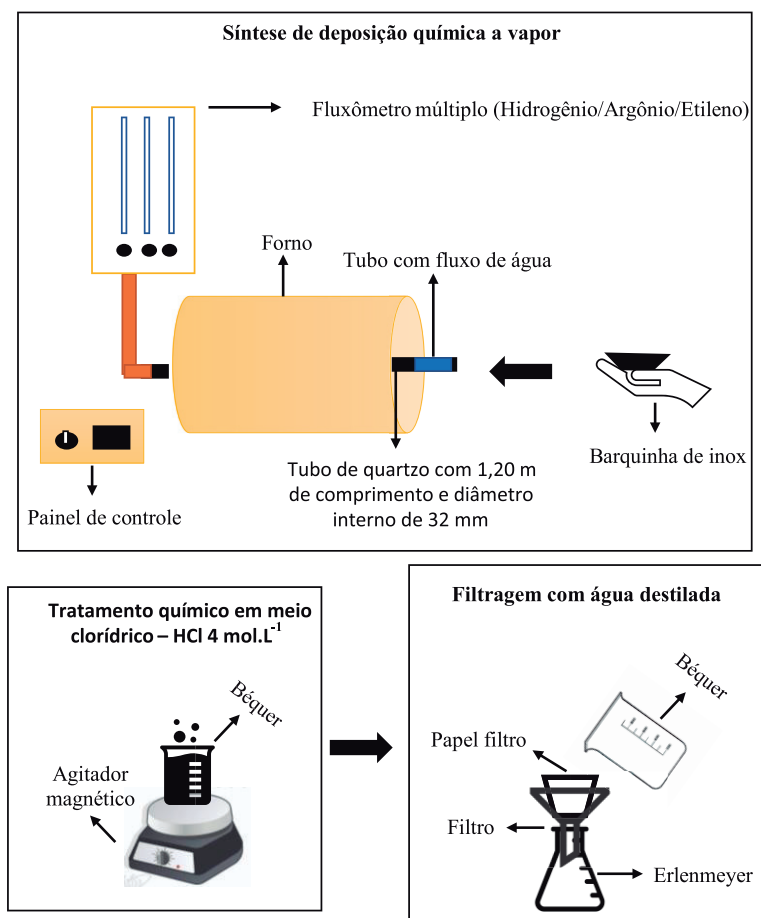
PRODUÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO

Os NTC foram produzidos pelo método de deposição química a vapor, conforme rotina do Laboratório de Nanomateriais de Carbono da UFN (De CAMARGO *et al.*, 2014). Em uma barca de inox foram adicionados 3,0 g do catalisador (NiFe_2O_4) e colocada no forno tubular (figura 1). Os gases (argônio, hidrogênio e etileno) foram controlados por um fluxômetro múltiplo. Argônio foi mantido com fluxo de 335,0 mL/min em todo o processo. O fluxo de hidrogênio foi de 101,9 mL/min, e introduzido como gás ativador em 600°C. Na temperatura de 850°C (temperatura de síntese), o etileno foi liberado com fluxo de 202,2 mL/min, como gás fonte de carbono, no tempo de síntese de 40 min. Para a eliminação de carbono amorfo e resíduos de catalisador, utilizou-se tratamento químico em meio clorídrico (HCl 4,0 mol.L⁻¹), a 80°C por 120 minutos sob agitação magnética. Após os nanotubos produzidos e purificados foram lavados com água destilada até atingir neutralidade, secos em estufa a 30°C por 24 horas e armazenados em frascos de polipropileno.

PRODUÇÃO NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Para a produção das AgNPs seguiu metodologia adaptada de QIN Y. *et al.* (2010). Em um balão de 250 mL adicionou-se 20,0 mL de nitrato de prata $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 800 mg de ácido ascórbico (solubilizado com 30 mL de água destilada), sob agitação, a temperatura de 50°C . O material produzido foi centrifugação por duas vezes, por 15 min a 4500 rpm. Posteriormente, foi seco em estufa à 50°C , por 12 horas e armazenado em frasco de polipropileno.

Figura 1 - Esquema representando o processo de produção e purificação dos NTC.



Fonte: Construção do autor

PRODUÇÃO DOS NANOCOMPOSITOS

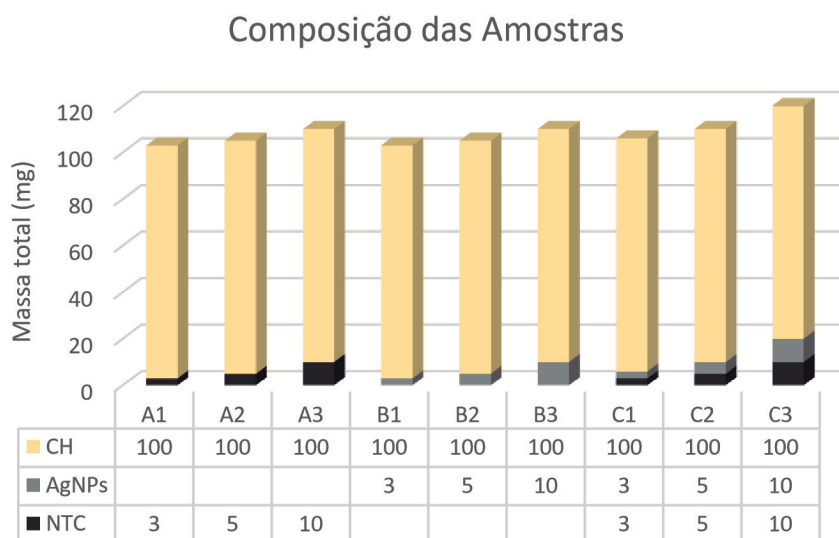
A misturas da quitosana com os nanomateriais foram compactados em uma prensa hidráulica, em uma matriz de 1,0 cm de diâmetro à temperatura ambiente. Para cada moldagem a CH foi testada em diferentes concentrações e submetidas a três diferentes cargas (3 Kg x 1000, 5 Kg x 1000 e 7 Kg x 1000). Depois do material ser colocado no molde, foi aplicada uma pressão na parte superior que pressiona o pó de forma uniaxial, enquanto a matriz e parte inferior permanecem estáticas, por um tempo de 2 minutos.

Em função da capacidade de absorção de umidade da atmosfera, as amostras permanecem sempre em dessecador (com sílica) nos períodos que antecederam os ensaios. Conforme a Figura 2, para melhor entendimento os discos foram divididos em três grupos. O grupo A é composto por CH@NTC, enquanto o grupo B pelos discos CH@AgNPs e finalmente o grupo C por aquelas que contém CH@NTC@AgNPs, A1-A3, B1-B3 e C1-C3 respectivamente.

TAMANHO MÉDIO, PDI E POTENCIAL ZETA DAS AgNPs

O pó de AgNPs obtido foi caracterizado (tamanho médio, índice de polidispersão e Potencial Zeta). Para isto, 100 µg de cada amostra foram dispersos em 10 mL de KCl 0,01 mol L⁻¹, em ultrassom por 15 minutos. Para as medidas, tomou-se 10 µL de amostra em 10 mL de água Milli-Q®.

Figura 2- Composição dos compósitos



Fonte: Construção do autor

DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A técnica foi utilizada para verificar a cristalinidade das AgNPs produzidas assim como para determinar o tamanho médio de cristalito (Debye Scherrer - Equação 2).

$$D = \frac{k * \lambda}{\beta_L * \cos \theta} \tag{2}$$

Onde: k constante (para esfera 0,94), λ representa o comprimento de onda dos raios X, β o pico de difração de largura total na metade do máximo (FWHM) e θ o pico de reflexão de Bragg.

CULTURA CELULAR

Os discos foram previamente submetidos a radiação UV por 15 minutos. As células de câncer colorretal, linhagem HT-29, foram armazenadas no meio de cultura DEMEN 6h depois da exposição ao UV e incubadas por 72h em estufa com temperatura de 35°. Para limpeza do meio foi utilizado tampão PBS, pH 7,4. Após o descarte do PBS, foi inserido Tripsina e colocado em estufa 35 °C por 5 min. Posteriormente foram colocados em tubos Falcon, acrescentando 15 mL de meio de cultura e levados para centrifuga (1.500 rpm por 5min). Foi retirado o sobrenadante e colocado 1mL de meio em cada tubo. Em seguida, as amostras foram colocadas em microtubos descartáveis para contagem. Foram colocados 5×10^4 de células em cada poço e 3mL de solução em uma placa de 12 poços.

TESTE DE PROLIFERAÇÃO

O teste de MTT seguiu a metodologia adaptada de Fukui, Yamabe, Zhu (2010). Foi utilizado 100 µL de suspensão celular (lavado com PBS), e adicionado 10 µL de MTT e 100 µL de DMSO em uma placa Elisa de 96 poços. A leitura dos resultados foi realizada por meio de espectrofotometria a 560 nm.

CONCENTRAÇÕES DE DSDNA

No procedimento experimental para o ensaio PicoGreen, utilizou a metodologia de Ha, *et al.* (2011). O método utiliza o sobrenadante do meio em uma placa preta de 96 poços e realizado em triplicata. Inicialmente foi pipetado 80 µL de TE 1X e homogeneizadas com 10 µL do sobrenadante. Então, 10 µL do reagente PicoGreen foi adicionado e diluído no meio. O material permaneceu incubado a temperatura ambiente por 5 min. A leitura dos resultados ocorre em fluorímetro nos seguintes comprimentos de onda: 480 nm de excitação e 520 nm de emissão.

ESTRESSE OXIDATIVO

Para o teste do Óxido Nítrico, seguiu-se a metodologia adaptada de Choi, *et al.* (2012); Noh, *et al.* (2015), onde 100 µL de sobrenadante da amostra em uma placa de 96. Após se adiciona 100 µL do reagente Griess ao sobrenadante. Foi realizada incubação a temperatura ambiente por 15 min. E por fim, foi medida a absorbância à 540 nm no espectrofotômetro.

ESPÉCIES REATIVAS

Para o ensaio de Diclorofluoresceína Diacetato (DCFH-DA) 50 μ L da amostra e 65 mL do tampão TRIS/HCl pH 7,4 foram adicionados na placa, após 10 μ L de DCFH-DA são acrescentados no meio. As soluções permaneceram incubadas em temperatura ambiente por 1 h em ambiente escuro. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofluorímetro, utilizando os comprimentos de onda de 525 nm de emissão e 488 nm de excitação (ARANDA *et al.* 2013).

COLORIMETRIA

Uma placa de 12 poços foi lavada com PBS, em seguida foi adicionado 1 mL de Violeta de metila. O material foi colocado em estufa por 30 min à 35°C. Com o teste, foi verificado os aglomerados dos poços em relação ao controle (PITTS *et al.*, 2003).

RESULTADOS

PARÂMETROS INICIAIS DOS NANOCOMPOSITOS

Para definir a melhor concentração de quitosana no nanocompósito, realizou-se testes com diferentes massas de quitosana (50 e 100 mg) e com diferentes cargas aplicadas (3, 5 e 7 Kg x 1000). Melhores resultados (integridade da pastilha) se deu com 100 mg de CH numa carga de 5 kg x 1000. Dessa forma, adotou-se estes parâmetros para a prensagem dos nanocompósitos deste estudo variando-se apenas as concentrações NTC e AgNPs (3, 5 e 10 mg).

TAMANHO MÉDIO, PDI E POTENCIAL ZETA DAS AgNPs

Os dados obtidos estão apresentados na tabela 3. Os resultados foram semelhantes aos reportados na literatura (GARCIA *et al.*, 2021). Podemos considerar que o método utilizado é eficiente na produção de nanopartículas de prata.

Tabela 3 - Tamanho médio, PDI e potencial zeta da amostra de AgNPs, n=3.

Parâmetros	Valor
Tamanho médio (nm)	15,21 \pm 2,32
PDI	0,29 \pm 0,08
Potencial Zeta	-27,60 \pm 0,91

Fonte: Construção do autor

DIFRAÇÃO DE RAIOS X

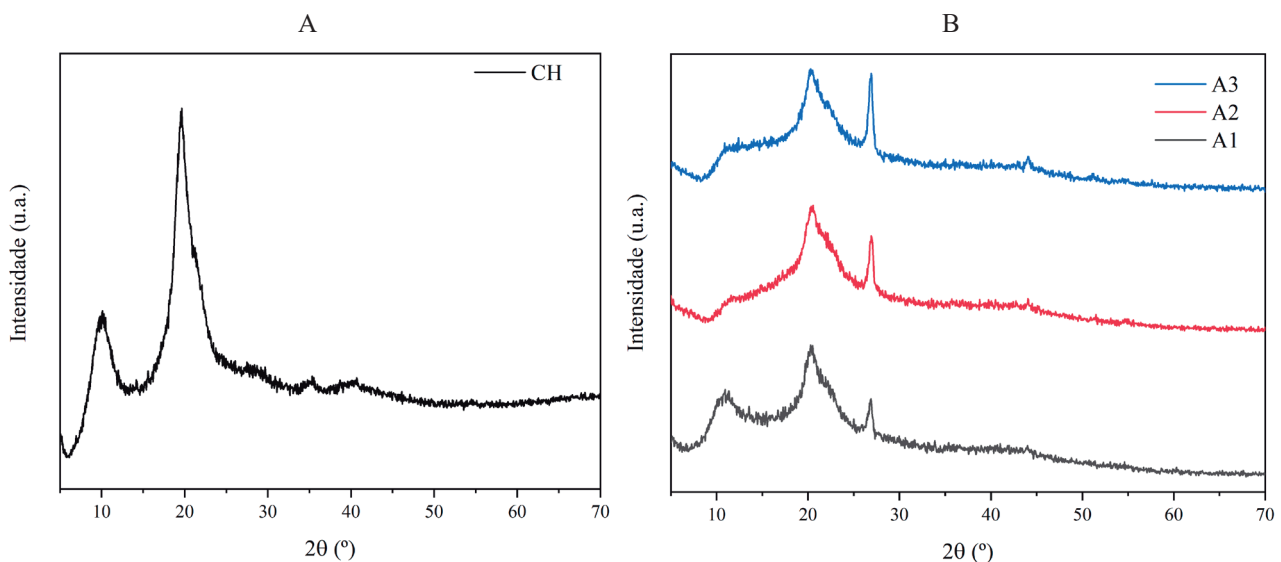
Os difratogramas obtidos pelas AgNPs apresentaram os picos característicos em $38,02^\circ$, $44,19^\circ$ e $64,35^\circ$, que segundo cálculo matemático, apresenta um tamanho de cristalito de 30 nm. Kanimozhi *et al.* (2022) relataram resultados experimentais semelhantes, com tamanho médio das partículas do cristalito, para as AgNPs (calculado pelo difratograma) de 30,5 nm.

Se compararmos os valores de tamanho médio de partícula, entre os dados obtidos por dispersão de luz dinâmica (Tabela 3) com os dados obtidos pelo cálculo do difratograma, observamos uma diferença (15,2 e 30,0 nm, respectivamente). Aqui precisamos levar em consideração a diferença entre as técnicas. A dispersão de luz dinâmica utiliza amostra líquida e o DRX na forma de pó.

O difratograma apresentado na figura 4 (A), representa a forma cristalina da quitosana (CH), após a moldagem, com picos cristalinos em $2\theta = 10^\circ$, 20° e 40° aproximadamente, confirmando com dados da literatura (SOBREIRA *et al.*, 2020).

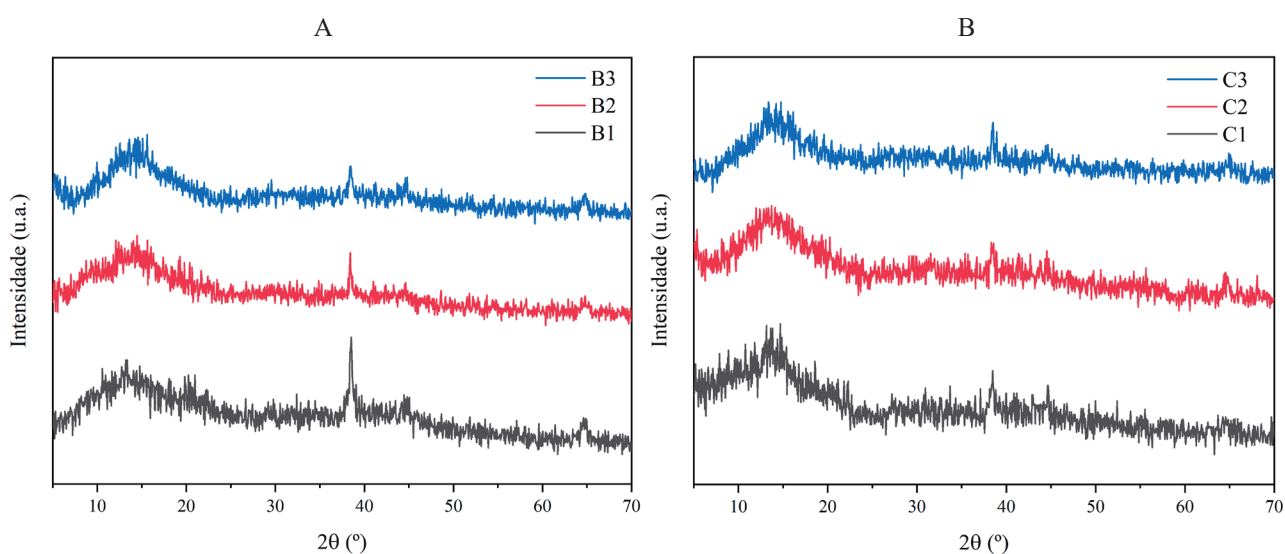
Já o difratograma apresentado na figura 4 (B), para as amostras compostas pelo grupo A foram observados picos característicos da CH em todos os difratogramas, estando de acordo com o plano (110). As amostras A2 e A3 apresentaram menor intensidade do pico $2\theta = 20^\circ$ e em aproximadamente $2\theta = 26^\circ$. A amostras A3 por possuir uma maior concentração de NTC (pico $2\theta = 26^\circ$) apresenta uma maior intensidade, em relação as demais amostras com picos em $2\theta = 10^\circ$ e 20° .

Figura 4 - DRX A) Quitosana e B) composto CH/NTC.



Os difratogramas da figura 5 (A) representa a quitosana, sendo possível observar o pico da CH deslocado em torno de $2\theta = 14^\circ$ e das AgNPs aproximadamente em $2\theta = 38^\circ$ com mudança na intensidade dos picos.

Figura 5 - DRX dos nanocompositos A) CH/AgNPs e B) CH/NTC/AgNPs.

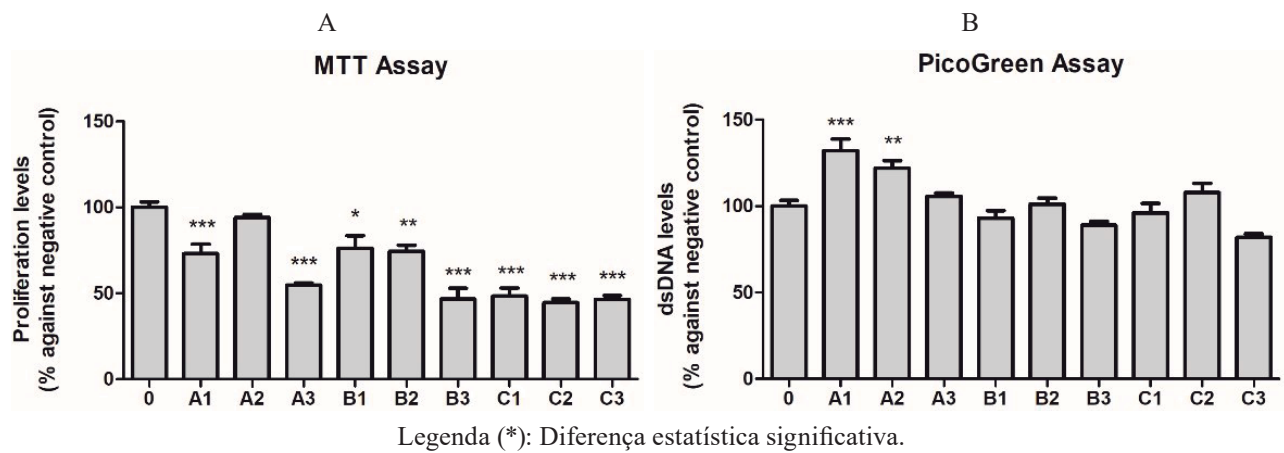


As três concentrações do grupo C (Tabela 3) presente na figura 6 (B), apresentaram como o pico de CH em torno $2\theta = 10^\circ$ e com leve intensidade a AgNPs aproximadamente em $2\theta = 40^\circ$. Também é possível deduzir que a compactação dos três materiais demonstra uma mudança na cristalinidade das amostras e um alongamento na distância entre os ângulos.

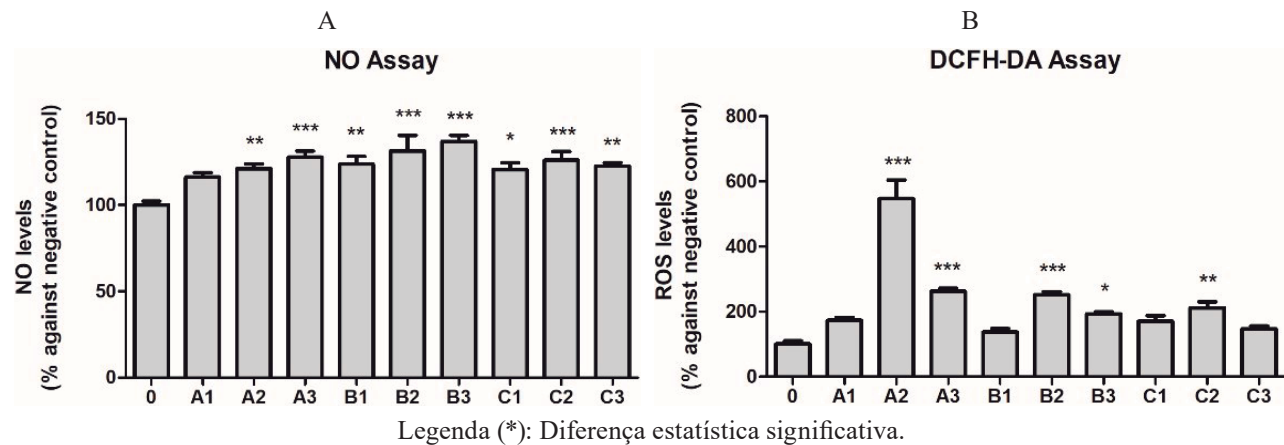
ESTUDOS *IN VITRO*

As amostras foram testadas em células HT-29. A sobrevivência celular (%) foi obtida usando de ensaio MTT (figura 6 A). Os resultados apresentaram morte celular em grande parte dos tratamentos, com exceção do tratamento A2, que não demonstrou significância estatística. Durante a realização dos testes, notou-se uma interferência na cor da amostra A2, o que pode explicar a alteração no resultado. Para detectar as pequenas quantidades de DNA na solução, foi realizado o teste de PicoGreen (figura 6 B). As amostras A1 e A2 apresentaram um aumento, pela possível degradação da dupla fita de DNA.

Figura 6 - Resultados A) MTT e B) PicoGreen.



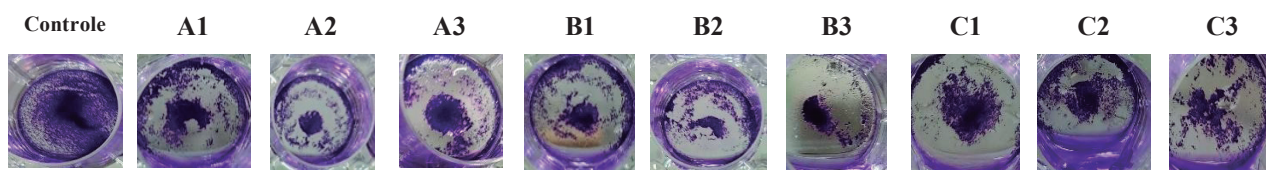
O resultado dos testes apresentados na figura 7 A detectam a presença de nitrito orgânico na amostra, quando as mesmas apresentaram estresse oxidativo. Os resultados desse teste não apresentaram diferenças significativas entre as amostras. Entretanto, na figura 7 B, quando se analisa de forma indireta, a taxa total de espécies reativas, se observa diferenças. Nesse caso, observa-se que o tratamento A2 apresentou elevada quantidade de espécies reativas de oxigênio em relação as demais amostras.

Figura 7 - Ensaios dos Estudo *in vitro*: (A) NO e (B) DCFH-DA.

No teste de coloração de violeta genciana, os dados são apresentados na Figura 8. A partir das aglomerações, foi possível observar que houve morte celular em todos os poços, em relação ao controle.

Analisando em conjunto os ensaios *in vitro*, as amostras do grupo A apresentam maior variação nos tratamentos. Hipoteticamente estes resultados se devem pela sua mudança de cor nos testes. As maiores diferenças foram entre os resultados dos tratamentos aplicados ao grupo B, enquanto que o grupo C apresentou resultados de menor variação.

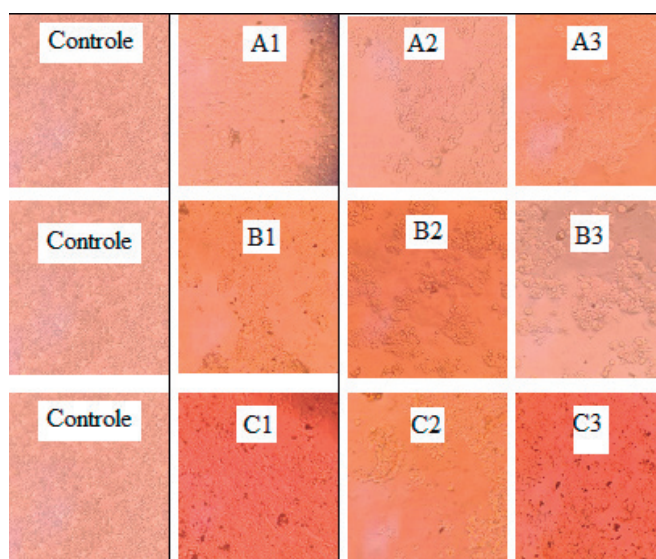
Figura 8 - Teste de coloração de violeta genciana.



Fonte: Construção do autor.

Os resultados de microscopia óptica (figura 9), mostram que houve morte celular em todos os grupos, em relação ao controle inicial.

Figura 9 - Microscopia óptica da concentração celular inicial e após 72h de aplicação das amostras



Fonte: Construção do autor

CONCLUSÃO

A partir do conjunto de ensaios realizados nesse trabalho foi possível concluir que a produção e caracterização dos nanocompósitos contendo CH, CH@AgNPs e CH@AgNPs@NTC tiveram sucesso na síntese/produção e a compactação em prensa hidráulica foi apropriada para este estudo. Apesar das propriedades mecânicas dos discos não terem sido avaliadas, pode-se observar que elas mantiveram a integridade durante a manipulação para execução dos ensaios. Dessa forma, conclui-se que o método se mostra adequado para os testes de laboratório. Com relação a avaliação *in vitro* em células HT-29, entre os 3 grupos de nanocompósitos produzidos, as amostras de combinação ternária representadas pelo grupo C (CH@NTC@AgNPs) foram as responsáveis pelos melhores resultados. Essas amostras apresentaram resultados considerados adequados para os parâmetros anticarcinogênicos dos ensaios (MTT, PicoGreen, NO e DCFH-DA). Portanto, promissoras para serem submetidas a novas investigações em uma sequência da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

FAPERGS e CNPq

REFERÊNCIAS

ABRUZZO A. *et al.* Chitosan nanoparticles for lipophilic anticancer drug delivery: Development, characterization and in vitro studies on HT29 cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 362-372, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.023>.

ARANDA, A. *et al.* Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 2, p. 954-963, 2013. DOI: [10.1016/j.tiv.2013.01.016](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.016)

ASGHAR M. A. *et al.* Antibacterial, anticoagulant and cytotoxic evaluation of biocompatible nanocomposite of chitosan loaded green synthesized bioinspired silver nanoparticles. **Journal International of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 934-943, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.197>.

CHOI W.S., *et al.* **The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS stimulated**, v. 280, p. 70-164, 2012. DOI: [10.1016/j.cellimm.2012.12.007](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007).

DE CAMARGO, C.L. *et al.* Funcionalização de nanotubos de carbono de paredes simples com 6-aminofluoresceína. **Disciplinarum Scientia | Naturais e Tecnológicas**, v. 15, n. 1, p. 39-46, 2014.

FUKUI M, YAMABE N, ZHU B T. Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells In Vitro and In Vivo. **Eur J Cancer**. v. 46, n. 10, p. 1882-1891, 2010. DOI: [10.1016/j.ejca.2010.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.004).

GARCIA D. G. *et al.* Síntese de Nanopartículas de Prata pela Técnica de Eletrodeposição para Desenvolvimento de Biossensores. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 31130-31145, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-709>.

HÁ, T. T. N., *et al.* Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **PloS One**, 2011. DOI: [10.1371/journal.pone.0025969](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025969).

JAYALAKSHMI R., JEYANTHI J. Spectroscopic investigation of carbon nanotube as nano-filler entrapped in chitosan hydrogel beads. **Journal of Molecular Structure**, v. 1237, p. 1-10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130386>.

KANIMOZHIS. *et al.* Biogenic synthesis of silver nanoparticle using *Cissus quadrangularis* extract and its invitro study. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, p. 2-5, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101930>.

KASSEM A., AYOUB G. M., MALAEB L. Antibacterial activity of chitosan nanocomposites and carbon nanotubes: A review. **Science of The Total Environment**, v. 668, p. 566-576, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.446>

MOISÉS M. P. *et al.* Preparation of a sustainable Zeolite A using an agroindustry solid waste loaded with silver nanoparticles: Antimicrobial activity study. **Materials Letters**, v. 308, p. 1-3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.131194>.

NAGARAJ B. *et al.* Anti-microbial and anti-cancer activity of gold nanoparticles phytofabricated using clerodin enriched clerodendrum ethanolic leaf extract. **Journal of King Saud University - Science**, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101989>.

NOHH. J., *et al.* Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of *Citrus unshiu*. **J Ethnopharmacol.** S0378-8741(15)00039-2, 2015. DOI: [10.1016/j.jep.2015.01.024](https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.024).

PITTS, B.; HAMILTON, M. A.; ZELVER, N.; STEWART, P. S. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. **Journal of microbiological methods**, v. 54, n. 2, p. 269-276, 2003.

QIN Y. *et al.* Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, p. 172176, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.10.013>.

RAMEZANPOUR M. *et al.* Pore-scale simulation of nanoparticle transport and deposition in a microchannel using a Lagrangian approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 355, p. 1-14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118948>.

SOBREIRA, T.G.P *et al.* Aspectos estruturais de esferas de quitosana/PVA reticuladas com glutaraldeído submetidas a diferentes tratamentos térmicos. **Química Nova**, v. 43, p. 1251-1257, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170613>.

SUCHITHRA M. R. *et al.* In vitro study of antioxidant, antidiabetic and antiurolithiatic activity of synthesized silver nanoparticles using stem bark extracts of *Hybanthus enneaspermus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 38, p. 1-11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102219>.

ZAMPIVA, R., Y., S. *et al.* Influence of the Fuel Composition and the Fuel/Oxidizer Ratio on the Combustion Solution Synthesis of MgFe_2O_4 Catalyst Nanoparticles. **FME Transactions**, v. 46, p. 157-164, 2018. DOI: 10.5937/fmet1802157Z.