UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Leandro Oliveira Feitosa

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO *Kalanchoe pinnata* VISANDO A APLICAÇÃO EM HIDROGÉIS PARA O COMBATE DE BACTÉRIAS RESISTENTES

Sorocaba/SP
2020

Leandro Oliveira Feitosa

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO *Kalanchoe pinnata* VISANDO A APLICAÇÃO EM HIDROGÉIS PARA O COMBATE DE BACTÉRIAS RESISTENTES

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Drª Renata de Lima
Coorientador: Drª Daniele Ribeiro de Araújo

Sorocaba/SP
2020

Ficha Catalográfica

Feitosa, Leandro Oliveira

C939 Biossíntese de nanopartículas de prata utilizando Kalanchoe pinnata visando a aplicação em hidrogéis para o combate de bactérias resistentes / Leandro Oliveira Feitosa. – 2020.

88 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima

Coorientadora: Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2020.

Elaborada por Regina Célia Ferreira Boaventura – CRB-8/6179

Leandro Oliveira Feitosa

BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO *Kalanchoe pinnata* VISANDO A APLICAÇÃO EM HIDROGÉIS PARA O COMBATE DE BACTÉRIAS RESISTENTES

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em 06/03/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Renata de Lima
Universidade de Sorocaba

Prof. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Patrícia Léo
Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Prof. Dra. Ângela Faustino Jozala
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol
Universidade de Sorocaba

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por terem me dado todo tipo de apoio durante o desenvolvimento desta tese.

A minha orientadora Dra Renata de Lima por ter me acompanhado em mais uma etapa da minha formação. Também a minha co-orientadora Daniele Ribeiro por todo o apoio dado.

Aos meus companheiros de laboratório que me deram apoio em diversos momentos durante esses últimos anos. Tati, Mari, Tais, Ná, Dmitri, Vitoria, Bianca, Mariana B.

Ao Prof. Dr. Leonardo Fraceto e seus alunos da Unesp-Sorocaba pelo auxílio nas análises em etapas especificas do trabalho.

Aos meus amigos, que sentiam orgulho por terem um amigo “quase” doutor. Peterson, William, Paty, Angela, Ciça, Genise.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho e a Uniso pelas instalações e a oportunidade em desenvolver este trabalho.

Obrigado!

EPÍGRAFE

“Todo conhecimento produz uma sensação de prazer, seja quando se trata de uma simples percepção, seja, com maior razão, quando se alcança a iluminação do espírito a partir da pura intuição intelectual.”

Ubaldo Nicola

RESUMO

As bactérias resistentes a antibióticos tornaram-se um grande desafio para a saúde pública devido à dificuldade de combatê-las. Na busca por novas alternativas, as nanopartículas de prata (AgNPs) surgem como uma das possibilidades para ajudar nesta situação. A ação antibacteriana da prata é conhecida há anos, no entanto, o seu potencial é ampliado quando em escala nanométrica. Assim, as AgNPs podem ser uma promissora opção contra as bactérias resistentes. Este trabalho teve como objetivo realizar a síntese de AgNPs biogênica utilizando extrato de *Kalanchoe pinnata* com a intenção de ajudar a comprovar a eficácia das AgNPs contra bactérias resistentes. Também avaliar toxicidade *in vitro* e propor a aplicação das AgNPs em hidrogéis para futura utilização de tratamentos de feridas cutâneas. Inicialmente, foi realizada a otimização da síntese de AgNPs de modo a selecionar os melhores parâmetros para isto. Deste modo, foram realizadas a caracterização físico-química das AgNPs utilizando as técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). A atividade antibacteriana foi comprovada através do teste de disco-difusão em ágar e concentração mínima inibitória. A eficácia das AgNPs foi confirmada com ensaios de cinética de crescimento com bactérias resistentes. Para avaliar a citotoxicidade foram realizados os testes de redução de tetrazólio (MTT) e vermelho neutro. E para avaliar a genotoxicidade, utilizamos os testes de *Allium cepa* e ensaio do Cometa. Também foi testado a possibilidade de alergias através de expressão gênica de genes ligados a formação de inflamossomos e quimiocinas. Os resultados mostraram que a melhor condição de síntese de AgNPs foi na concentração de 0,06 $mg.mL^{-1}$de extrato de *K. pinnata*, pH 9 e $AgNO_3$ a 1mM. Logo, geraram AgNPs com tamanho de 121 ± 6,5 nm, polidispersão 0,2 ± 0,1 pdi, potencial zeta de -23 ± 0,1 mV e concentração de 9×10^{10} $Np.mL^{-1}$. As AgNPs foram eficazes contra bactérias resistentes a partir de concentrações de $0,9 \times 10^{10}$ $Np.mL^{-1}$. As AgNPs conseguiram interromper a formação de biofilme e inibir o crescimento bacteriano durante 24 h. Não apresentaram citotoxicidade *in vitro* até a concentração de 3×10^{10} $Np.mL^{-1}$. Apresentaram efeitos genotóxicos em raízes de *Allium cepa* em altas concentrações e no ensaio de cometa com células animais a partir da concentração de $0,9 \times 10^{10}$ $Np.mL^{-1}$ e indica alteração na expressão dos genes. As AgNPs foram incorporadas em hidrogéis poliméricos de polaxamer, e isto melhorou os perfis reológicos dos géis tanto em função da frequência quanto da temperatura, desta maneira, modificou a viscosidade e comportamento não Newtoniano do sistema. Ainda, os géis apresentaram ação antibacteriana, mostrando serem eficazes contra bactérias resistentes através do contato direto. Tendo em vista os resultados, as AgNPs de extrato de *K. pinnata* são eficazes contra bactérias resistentes, mesmo depois de incorporadas em hidrogéis. Desta forma, são uma excelente alternativa para tratar infecções causadas por bactérias resistentes.

Palavras-chaves: AgNPs. Hidrogel. Bactérias resistentes. Citotoxicidade. Otimização.

ABSTRACT

Antibiotic-resistant bacteria have become a major public health challenge due to the difficulty of combating them. In the search for new alternatives, silver nanoparticles (AgNPs) appear as one of the possibilities to help in this situation. The antibacterial action of silver has been known for years, however, its potential is increased when on a nanometer scale. Thus, AgNPs can be a promising option against resistant bacteria. This work aimed to carry out the synthesis of biogenic AgNPs using *Kalanchoe pinnata* extract with the intention of helping to prove the effectiveness of AgNPs against resistant bacteria. Also evaluate toxicity in vitro and propose the application of AgNPs in hydrogels for future use of skin wound treatments. Initially, the optimization of the synthesis of AgNPs was carried out in order to select the best parameters for this. Thus, the physical-chemical characterization of the AgNPs was carried out using the techniques of dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA). The antibacterial activity was proven through the disk-diffusion test on agar and minimum inhibitory concentration. The effectiveness of AgNPs was confirmed with growth kinetics assays with resistant bacteria. Tetrazolium reduction (MTT) and neutral red tests were performed to assess cytotoxicity. And to assess genotoxicity, we used the *Allium cepa* tests and the Comet assay. The possibility of allergies was also tested through gene expression of genes linked to the formation of inflamossomes and chemokines. The results showed that the best condition for the synthesis of AgNPs was at the concentration of 0.06 $mg.mL^{-1}$ of *K. pinnata* extract, pH 9 and 1mM $AgNO_3$. Therefore, they generated AgNPs with a size of 121 ± 6.5 nm, polydispersion 0.2 ± 0.1 pdi, zeta potential of -23 ± 0.1 mV and concentration of 9×10^{10} $Np.mL^{-1}$. AgNPs were effective against resistant bacteria from concentrations of 0.9×10^{10} $Np.mL^{-1}$. AgNPs were able to stop biofilm formation and inhibit bacterial growth for 24 h. They did not show cytotoxicity in vitro until the concentration of 3×10^{10} $Np.mL^{-1}$. They showed genotoxic effects in *Allium cepa* roots in high concentrations and in the comet assay with animal cells from the concentration of 0.9×10^{10} $Np.mL^{-1}$ and indicates alteration in gene expression. The AgNPs were incorporated into polymeric polaxamer hydrogels, and this improved the rheological profiles of the gels both as a function of frequency and temperature, thus changing the viscosity and non-Newtonian behavior of the system. Also, the gels showed antibacterial action, showing to be effective against resistant bacteria through direct contact. In view of the results, *K. pinnata* extract AgNPs are effective against resistant bacteria, even after being incorporated into hydrogels. In this way, they are an excellent alternative to treat infections caused by resistant bacteria.

Keywords: AgNPs. Hydrogel. Resistant bacteria. Cytotoxicity. Optimization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de formação de nanopartículas de prata biogênica. 22
Figura 2- Mecanismo proposto d*a* ação antibacteriana das nanopartículas de prata: 1*)* atração eletrostática, 2*)* produção de radicais livres, alterações na permeabilidade, distúrbios da respiração, vazamento de conteúdo intracelular, 3*)* modulação dos perfis fosfotirosina das proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular e na síntese de polissacarídeos capsulares, 4*)* interação com os grupos SH; inibição da síntese e função de proteínas, 5*)* interação com moléculas contendo fósforo (DNA). 25
Figura 3 - Linha do tempo do desenvolvimento de resistência antimicrobiana. 29
Figura 4- Mecanismo de resistência bacteriana. 32
Figura 5 – Otimização da síntese de AgNP para concentração de 0,06mg. mL^{-1} de extrato e concentração final de 1mM de $AgNO_3$. Em **A**) Evolução do tempo de síntese de AgNP utilizando diferentes pH. Em **B**) Espectro-Vis do estrado de K. pinnata e UV-Vis da síntese das nanopartículas em pH9 (0,06mg. mL^{-1} de extrato e concentração final de 1mM de $AgNO_3$). 42
Figura 6 - Resultados das leituras em espectrofotômetro de UV-vis das diferentes reações de pH e concentrações do extrato após 24h da síntese. Os gráficos mostram padrões de leitura típicos da presença de AgNPs. Imagens: A Concentração 0,03 $mg.mL^{-1}$; B – 0,06 $mg.mL^{-1}$; C – 0,12 $mg.mL^{-1}$. 43
Figura 7 - Esquema da proposta de síntese biogênica utilizando K. pinnata como agente redutor e estabilizante, originando uma nanopartícula com um cerne de prata metálico e um capping formado pelas substâncias originadas do extrato. 46
Figura 8 – Resultados das análises quantitativa de expressão de genes ligados a inflamação. 48
Figura 9 – (A) Leitura em UV-Vis mostra um pico de absorbância no comprimento de onda entre 430-450 nm, indicando a formação de AgNPs; (B) Foto do meio de reação ao iniciar a síntese ($AgNO_3$ + Extrato) e ao final da síntese (AgNPs), demonstrando a cor característica da formação de AgNPs. 62
Figura 10 - Cinética de crescimento bacteriano ao longo do tempo em exposição a AgNP biogênicas na concentração de 1 vez o MIC de cada bactéria. Os controles estão marcados com linhas tracejadas. (A) cepas de S. aureus; (B) cepas de E. coli; (C) cepas de K. pneumonie; (D) cepas de P. aeruginosa; (E) cepas de Enterbacter; (F) S. liquefaciens 64

Figura 11 – Resultados da Inibição da formação de biofilme expostos a diferentes concentrações de nanopartículas, nos quadrados a porcentagem de biofilme encontrado após exposição. 65
Figura 12 – Resultados de viabilidade celular. Na figura (A) resultados da avaliação por MTT e em (B) resultados da avaliação por Vermelho neutro..... 66
Figura 13 – Em **A**) Resultados dos índices relativos do ensaio cometa em diferentes linhagens. As letras a e b indicam comparação do controle com a exposição em linhagens. Em **B**) Resultados obtidos no ensaio com raízes de Allium cepa. As letras a e b indicam comparação das raízes expostas com o controle..... 66
Figura 14 - Análises reológicas em função da variação de temperatura para os hidrogéis a base de PL407, isolado ou em associação com PL403, antes e após a incorporação de nanopartículas de prata. As setas indicam a temperatura de transição so0l-gel (Tsol-gel) (n=3/amostra)..... 67
Figura 15 - Análises reológicas em função da variação de frequência para os hidrogéis a base de PL407, isolado ou em associação com PL403, antes e após a incorporação de nanopartículas de prata. A- PL407; B- PL407AgNps; C-PL407-PL403; D-PL407-403AgNps (n=3/amostra) 68

Sumário

1 INTRODUÇÃO **12**

2 REVISÃO DA LITERATURA **14**

2.1 Um breve histórico da prata e seus benefícios à saúde **14**

2.2 Nanotecnologia **16**

2.2.1 Síntese biológica de nanopartículas metálicas 19

2.3 Aplicação, síntese, ação antimicrobiana e toxicidade de AgNPs **21**

2.3.1 Ação antimicrobiana das AgNPs 24

2.3.2 Toxicidade das AgNPs 25

2.4 A crise das bactérias resistentes **28**

2.4.1 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos 31

3 OBJETIVOS **35**

3.1 Objetivo geral **35**

3.2 Objetivos específicos **35**

4 RESULTADOS **36**

4.1 Artigo 1 ..... **37**

4.2 Artigo 2 ..... **54**

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS **81**

6 REFERÊNCIAS **82**

1 INTRODUÇÃO

Antes da descoberta da penicilina, qualquer ferida infeccionada poderia causar sérias complicações e, como consequência, levar o indivíduo a morte. A penicilina tornou-se um marco na história da medicina, pois deu início as pesquisas e investimentos para o desenvolvimento de novos antibióticos, salvando incontáveis pacientes da morte (PEREIRA; PITA, 2005; FERREIRA *et al*. 2008; VENTOLA *et al*. 2015; BELL, 2016). Porém, o uso abusivo e inadequado dos antibióticos trouxe à tona a crise das bactérias resistentes. Tal situação, é considerada uma ameaça global e um dos principais problemas que a ciência e a medicina enfrentam atualmente (KASSIROV *et al*. 2018; ALAVI; RAI, 2019).

Diversos órgãos públicos relacionados a saúde, como a OMS (Organização Mundial da Saúde) e a FDA (Food and Drug Administration), demonstram preocupação com as bactérias resistentes e alertam sobre uma crise que afetará todos os países, desenvolvidos ou não. A OMS, através de relatório, diz que até 2050 as bactérias resistentes acarretarão a morte de mais de 10 milhões de pessoas por ano (SANTOS, 2004; WANNMACHER, 2004; FERREIRA *et al*. 2008; WHO, 2014; VENTOLA *et al*. 2015; SAMPAIO *et al*. 2018).

Desde que os antibióticos são utilizados para tratamentos de infecções e contaminações já foram identificadas centenas de bactérias resistentes. A cada dia cresce mais este número. Desta forma, desenvolver novos antibióticos pode ser uma boa estratégia neste embate. No entanto, nos últimos anos foram poucos os novos antibióticos criados e aprovados para tratamentos. Pois, tal processo é caro, complicado e trabalhoso para as empresas, além de exigir anos de pesquisa e ainda correr o risco das bactérias adquirirem resistência a este novo medicamento em pouco tempo de uso (BASSETI *et al*., 2013; PATERSON; HARRIS, 2015; VENTOLA, 2015; CANIAUX *et al*., 2017; KASSIROV *et al*. 2018).

Neste cenário, é preciso buscar alternativas que possam ajudar no combate as bactérias resistentes. Na antiguidade, a prata era bastante utilizada para tratar infecções, justamente em decorrência do seu potencial bactericida e fungicida contra mais de 650 microrganismos patogênicos (MÖHLER *et al*. 2018). Recentemente, o uso da prata vem sendo reconsiderado e unida a novas tecnologias, como a nanotecnologia, surge como esperança para ajudar no combate das bactérias resistentes (BEG *et al*. 2016; CHAUDHURI *et al*. 2016; SÁNCHEZ *et al*., 2016; NANO.ORG, 2016; ALAVI; RAI, 2019; LIMA; DEL FIOL; BALCÃO, 2019).

A nanotecnologia vem avançando e oferecendo novas estratégias para combater as bactérias resistentes. Entre as alternativas de uso da nanotecnologia, estão as nanopartículas de prata (AgNPs), pois quando tal metal está em nanoescala o seu potencial antimicrobiano é

ampliado e isto aumenta as suas possibilidades de aplicação (GOPINAPH *et al*. 2013; VERMA & SRIVASTAVA, 2016; MÖHLER *et al*. 2018; ALAVI; RAI, 2019). Diversas pesquisas já mostraram a efetividade das AgNPs contra as bactérias resistentes como *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* e *Streptococcus pyogenes, Klebsiela pneumonie,* entre outras (NANDA *et al*. 2009; LARA *et al*. 2010; LOPEZ-CARRIZALES *et al*. 2018; GUPTA *et al*., 2019; LIAO *et al*., 2019). Apesar de comprovada que as AgNPs são bactericidas, o modo de ação sobre as bactérias ainda precisa ser mais bem estudado (DURAN *et al*. 2016).

No entanto, com o tempo, as AgNPs tendem a aglomerar e sedimentar quando estão em meio aquoso e isto faz que a ação antimicrobiana diminua gradativamente, o que acaba prejudicando as aplicações das AgNPs (SEVJI *et al*. 2014; BERDOU & FERFERA-HARRAR, 2016; MEKKAWY *et al*. 2017). Para contornar este problema as AgNPs devem estar suspensas num substrato de suporte que as impeçam de se aglomerarem e as mantenham estáveis por um longo período (MEKKAWY *et al*. 2017; INOUE *et al*., 2019). Os sistemas utilizando hidrogéis estão entre as principais estratégias para manter as AgNPs estáveis. Os hidrogéis são compostos poliméricos tridimensionais que formam ligações cruzadas e absorvem uma grande quantidade de líquido. São utilizados na área médica para reparar tecidos biológicos, como a pele, também para liberação prolongada de medicamentos (KABANOV *et al*., 2002; KLOUDA; MIKOS; 2008).

Entre os diversos polímeros que compõem os hidrogéis encontram-se os poloxamers (PL). Os PL são materiais que respondem a estímulos de temperatura no local de aplicação e em função da sua alta biocompatibilidade e baixa toxicidade o PL 407 aparece como o de maior interesse para aplicações em humanos. Este pode ser usado como substrato para crescimento de células hematopoiéticas, osteoblastos e recuperação de tecidos lesados por queimaduras (SCHMOLKA, 1972; WEINAND *et al*., 2006; HIGUCHI *et al*., 2006). Além de ser usado como veículo em diferentes formulações endovenosas, subcutâneo, intramuscular, oral, oftálmico e em produtos para uso tópico (KLOUDA; MIKOS, 2008).

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi estudar o potencial antimicrobiano de AgNPs biogênicas utilizando do extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* e propor a suspensão das AgNPs em hidrogéis de polaxamer com a intenção de usar na prevenção de contaminações de ferimentos e tratar feridas cutâneas infeccionadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Um breve histórico da prata e seus benefícios à saúde

Historicamente, a prata é utilizada para inúmeros propósitos desde sua descoberta, sendo um dos primeiros metais descobertos e manipulados pelo homem. Já foi considerada mais valiosa que o ouro e tida como um símbolo de pureza no Egito e na Grécia (EBRAHIMINEZHAD *et al*., 2016). Há referência à prata inclusive na Bíblia em Gênesis 44:2, *"E o meu copo, o copo de prata (...)",* tratando-se de um relato de 3.000 anos a.C, durante as civilizações egípcias. Hoje, a prata é empregada na produção de peças decorativas e joias, mas no passado ela tinha outras utilidades como conservar água, vinho e outros alimentos livres de contaminações, além de ser usada para prevenir e tratar infecções (SOUZA *et al*. 2013).

Há relatos na história que reis persas apenas bebiam água se ela estivesse armazenada em recipientes de prata, onde mantinha-se fresca por um longo período. Alexandre, "o Grande", armazenava água em vasos de prata quando ia as guerras, com o propósito de manter a água limpa para seus guerreiros (EBRAHIMINEZHAD *et al*., 2016). Na era das explorações, era comum o uso de moedas de prata dentro dos barris de água e leite para conservá-los livre de contaminações. Na idade contemporânea, vasos de prata tinham grande aceitação para armazenagem de leite, água e vinho, onde mantinha-se puros por mais tempo (BARILO; MARX, 2014). O uso de cantis de prata foi importante em conflitos militares durante a segunda guerra mundial, pois o consumo de água potável era de difícil acesso e o consumo de água suja poderia causar disenteria em um pelotão inteiro. Embora os exemplos acima não sejam estritamente a aplicações médicas, estes são importantes para manter uma pessoa saudável (ECKHARDT *et al*., 2013). Neste contexto, de manter água, ambiente e alimentos livre de microrganismos, hoje, a prata é utilizada em filtros para purificação de água e em purificadores de ar (ALEXANDER, 2009; WILKINSON *et al*., 2011; BARILO; MARX, 2014).

Quanto as aplicações da prata ligada a medicina, existem relatos do seu uso desde a época dos macedônios, onde a prata era aplicada na cicatrização de feridas, prevenir e tratar infecções (DIAS; FONTANA; RESENDE, 2013). O grego, Hipócrates, considerado o "pai da medicina", declarou que a prata possuía potencial medicinal e a utilizava para tratar úlceras e feridas devido a sua ação antissépticas e antimicrobiana (SOLANO-UMAÑA *et al*., 2015). Na Roma antiga, o uso de nitrato de prata é mencionado nas farmacopeias para tratar feridas (PULIT; BANACH; KOWALSKI, 2011). Há relatos do uso de nitrato de prata nas farmacopeias romanas em 69 a.C, e era usado em 700 d.C para tratamento de feridas pelos guerreiros romanos (EBRAHIMINEZHAD *et al*., 2016). Paracelso utilizava nitrato de prata

como agente cauterizante de feridas (ALEXANDER, 2009). Após 1800, era comum usar o nitrato de prata 1% nos olhos dos recém-nascidos para prevenir oftalmia neonatal (LANSDOWN, 2006). Durante a primeira guerra, eram usados compostos de prata para evitar infecções em feridas. E desde o século XIX, a prata é utilizada nos fios de suturas (fio de prata) com a intenção de diminuir a ocorrência de infecções. Até a metade do século XX os compostos de prata eram bastante utilizados, seja para prevenir contaminações ou para tratar infecções, havendo mais de 50 produtos comercializados nos Estados Unidos, porém a prata deixou de ser popular após a descoberta dos antibióticos, no início dos anos de 1940 (ALEXANDER, 2009; MEDICI *et al*., 2019).

Em média, são conhecidos dezoito compostos de prata utilizados para fins farmacêuticos, entre os quais estão o nitrato de prata, sulfadiazina de prata, acetato de prata, fluoreto de prata e arsfenamina de prata, segundo o Merck Index (2019). No entanto, o nitrato de prata e a sulfadiazina de prata são os mais citados para aplicações médicas. Antes da descoberta da penicilina, o nitrato de prata foi utilizado em hospitais por cerca de 150 anos como principal substância para tratamento de doenças infecciosas, também era utilizado para tratar feridas de queimaduras (LEE *et al*., 2014). As propriedades cáusticas e adstringente do nitrato de prata foram documentadas nas primeiras farmacopeias escritas. E os alquimistas o chamavam de cáustico lunar e o utiliza para tratar verrugas (KLASEN, 2000). O uso de nitrato de prata em concentração de 0,5% é capaz de inibir o crescimento de bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* (MOSER *et al*., 2013).

A sulfadiazina de prata é um fármaco usado para tratar feridas de queimaduras e evitar possíveis infecções (DIAS; FONTANA; RESENDE, 2013; MOSER *et al*., 2013). Charles Fox desenvolveu um complexo combinado com sulfamida, o qual foi utilizado para recobrimento de cateteres, dispositivos médicos, curativos e cremes, sendo mais vantajoso que o nitrato de prata, por ter baixa toxicidade e boa eficácia como agente antimicrobiano (MEDICI *et al*., 2019). Este composto tem um amplo espectro de ação, ou seja, sua forma de atuação não é específica e atinge grande parte dos microrganismos. A solução de 1% de sulfadiazina de prata é eficiente para inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, principais contaminantes de feridas (DIAS; FONTANA; RESENDE, 2013).

O mecanismo de ação da prata contra bactérias é complexo, e independe do composto, o importante é que ocorra a ionização da prata. O biólogo Karl Wilhelm von Naegeli foi o primeiro a atribuir os efeitos antimicrobianos da prata aos seus íons bioativos e fez estudos que levaram a descoberta da eficácia da prata contra mais de 650 agentes patógenos (ALEXANDER, 2009). De uma forma geral, a prata em solução aquosa sofre ionização e os

íons biorreativos (Ag^+) interagem com proteínas, enzimas e aminoácidos, agem sobre a membrana citoplasmática causando alteração da permeabilidade. Também age inibindo a replicação do DNA e prejudica a cadeia respiratória, assim, exercendo ação bactericida imediata e bacteriostática residual (LANSDOWN, 2006; WILKINSON *et al*., 2011; ECKHARDT *et al*., 2013; KONOP *et al*., 2016, MEDICI *et al*. 2019). Este efeito residual prolongado é chamado de "efeito zumbi", onde as bactérias viáveis são induzidas a morte por entrarem em contato com as bactérias mortas. Isso ocorre porque os íons Ag^+ ficam internalizados nas bactérias mortas. Tais bactérias mortas funcionando como um reservatório de prata, onde são responsáveis por transmitir a prata para as bactérias vivas. Assim, quando as bactérias vivas vão consumir os restos celulares das bactérias mortas, acabam entrando em contato com a prata residual e sofrendo a ação bactericida dos íons (WAKSHLAK; PEDAHZUR; AVNIR, 2015).

A prata e seus compostos são utilizados há milênios para prevenir infecções e contaminações, sendo um importante agente antimicrobiano antes da descoberta dos antibióticos (LEE *et al*. 2014). Mas o uso dos antibióticos deu origem a crise das bactérias resistentes e hoje existe uma preocupação para encontrar alternativas para combatê-las. Atualmente, unida a nanotecnologia, a prata é bastante cogitada para ajudar a combater as bactérias resistentes. O uso das AgNPs se dá em razão de sua ação antimicrobiana e quimioterápica. As AgNPs têm uma taxa maior de liberação de íons Ag^+ quando comparada aos seus outros compostos. No entanto, devido as características físico-químicas das AgNPs existem novas perspectivas em sua aplicação em virtude da sua grande área de superfície e, principalmente, devido ao seu pequeno tamanho. Assim, a nanotecnologia pode ser uma alternativa e grande aliada na guerra contra as bactérias resistentes (WILKINSON *et al*., 2011; EBRAHIMINEZHAD *et al*., 2016; KONOP *et al*., 2016).

2.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a tecnologia que descreve, manipula e cria materiais em escala nanométrica, e tem como objetivo desenvolver e criar produtos e processos através da manipulação dos átomos (MANSOORI; SOELAIMAN, 2005; WANG, 2018; SINGH; DUBEY; DUBEY, 2019). O termo "nano" está relacionada a escala nanométrica, que é a bilionésima parte do metro ($1x10^{-9}$ m = 1nm) ou a milionésima parte do milímetro. Quanto a palavra "nanotecnologia", esta foi utilizada pela primeira vez pelo Professor Norio Taniguchi (1974) para definir a tecnologia que vai além da microescala e que utiliza da escala nano para produzir inovações. Devido a possibilidade de construir estruturas manipulando átomo a átomo, existe uma infinidade de nanoestruturas que podem ser formadas, como nanopartículas,

nanotubos, nanofibras e nanocamadas. Além da grande variedade de elementos e compostos químicos que podem ser utilizados na produção de nanomateriais como, metais, óxidos metálicos, carbono, polímeros e biomoléculas, e isto abre infinitas possibilidades de uso desta tecnologia (SATALKAR; ELGER; SHAW, 2015; FERREIRA; *et al*., 2017).

O interesse pela nanotecnologia surgiu quando os pesquisadores observaram as suas peculiaridades e a versatilidade de uso. Isto se deve ao fato de que quando um material está arranjado em nanoescala ele apresenta comportamentos óticos, mecânicos, magnéticos e/ou eletrônicos incomuns de sua forma bruta. E isso torna o material mais leve, mais forte, mais rápido, menor e/ou mais durável, assim, dando nova aplicabilidade aos materiais (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; WANG, 2018; SINGH; DUBEY; DUBEY, 2019).

Por ser uma ciência multidisciplinar, a nanotecnologia concebe um dos domínios mais amplo da ciência. Ela pode ser aplicada junto a área biotecnológica, física, engenharia, computação, eletrônica, cosmética, medicina, farmacêutica, entre outras, isto devido as condições da nanoescala (SINGH; DUBEY; DUBEY, 2019). E é por isso que esta tecnologia é um grande passo para a ciência, por ser possível empregar os seus conceitos em diversos campos do conhecimento, melhorando o uso das tecnologias e produtos que utilizamos em nosso dia a dia (SINGH; DUBEY; DUBEY, 2019). Da mesma forma, existe um grande potencial de aplicação da nanotecnologia nas áreas biomédicas que promete trazer muitos benefícios para a medicina. Por exemplo, no melhoramento de captura de imagens e nas aplicações farmacêuticas para carreamento de fármacos para o tratamento de doenças (FIGUEIRAS *et al*., 2014; MOBASSER; FIRROZI, 2016).

Uma das nanoestruturas mais utilizadas na medicina são as nanopartículas (NPs), sendo elas definidas como um pequeno objeto que se comporta como uma unidade inteira em termos de transporte e propriedades, e possuem diversas formas e composição (HEILIGTAG; NIEDERBERGER, 2013; HOFMANN-AMTENBRINK *et al*., 2015; SHARMA; KANCHI; BISETTY, 2015; KHAN; SAED; KHAN, 2017). As NPs fornecem diversas vantagens, mas a principal está ligada ao seu tamanho, que permite uma melhor interação da NPs com a biomolécula-alvo (ex.: DNA, proteínas, receptores). Outro fator é que estas também apresentam uma enorme diversidade de características, como composição química, forma, meio de dispersão, estado de dispersão e superfície, que pode ser funcionalizada, o que torna as nanopartículas ainda mais abrangente em aplicações terapêuticas (ZHANG *et al*. 2008; KHAN; SAED; KHAN, 2017). Dependendo da utilização final, é possível ajustar as propriedades das NPs, seja através do método de síntese ou por funcionalização, fazendo com que a partícula

responda a um determinado pH, temperatura ou campo magnético, e isso melhora ainda mais sua aplicação dentro da medicina (ZHANG *et al*. 2008; GARIMELLA; ELTORAI, 2017).

As NPs compreendem, basicamente, a dois tipos de estrutura, as nanocápsulas e nanoesferas, as quais podem ter composição polimérica ou metálica, mas existem outros tipos de nanoestruturas bastante utilizadas na área biomédica como os lipossomos, as nanoemulsões, as micelas, os dendrímeros, cada qual com seu potencial de aplicação (GARCIA, 2014; DARAEE *et al*. 2016).

As nanocápsulas são estruturas que tem uma cavidade central com um invólucro fino de um polímero biodegradável ou com núcleo líquido diferenciado (óleo ou água), no qual a substância ativa encontra-se dissolvida servindo como um sistema reservatório. Neste caso a substância ativa pode estar dissolvida no núcleo e/ou adsorvida na parede polimérica (HEILIGTAG; NIEDERBERGER, 2013; HOFMANN-AMTENBRINK *et al*., 2015; SHARMA; KANCHI; BISETTY, 2015; KHAN; SAED; KHAN, 2017).

As nanoesferas são formadas por matrizes poliméricas ou metálica, onde possuem um núcleo sólido. Nas nanoesferas poliméricas as substâncias que serão carreadas ficam distribuídas por toda a nanopartícula, mas também podem ser transportadas apenas adsorvidas à superfície da nanoesfera. Com as NPs poliméricas, existe a possibilidade de se buscar uma liberação mais seletiva de fármacos em órgãos, tecidos ou células, direcionando-as ao local onde é necessário a ação da substância (FIGUEIRAS *et al*., 2014; GARCIA, 2014). Deste modo, utilizando NPs poliméricas, é possível aumentar a eficácia de aplicação e diminuir a toxicidade da substância. Aumentando a concentração da NPs em sítios específicos e reduzindo os efeitos tóxicos em sítios não-específicos (FIGUEIRAS *et al*., 2014; KHAN; SAED; KHAN, 2017). As NPs poliméricas podem ser formadas por polímeros hidrofílicos, biodegradáveis, biocompatíveis tais como Poli(D,L-lactídeo), Poli(ácido láctico) (PLA), Poli(L-ácido láctico) (PLLA), Poli(ácido lactico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(cianoacrilato) (PCA), poli(e-caprolactona) (PCL) entre outros (ZHANG *et al*., 2008; DANHIER *et al*., 2012; CHO *et al*., 2015; LUZ *et al*., 2017).

Já as nanopartículas metálicas (NPMet) são as nanoestruturas que mais apresentam diferentes propriedades físicas (ótica, eletrônica, magnética, mecânica) quando comparadas as suas estruturas macroscópicas, por isso são as mais versáteis e utilizadas nanopartículas, sendo aplicadas em diversos campos (RAI *et al*., 2015; SOLANO-UMAÑA *et al*., 2015; KHAN; SAED; KHAN, 2017). Elas são utilizadas para diagnósticos e na terapia de doenças devido às suas propriedades únicas de tamanho, área de superfície, características físico-químicas, alta bioatividade, biocompatibilidade etc. Podendo ser encontradas com diferentes tamanhos e

formatos, e isto influencia suas características físico-química-biológicas. São diversos os metais utilizados nas aplicações médicas, entre os quais, a prata, o ouro, o paládio, o ferro, a platina, o cobre etc., estes são bastante utilizados devido a sua alta compatibilidade com o corpo humano (SOLANO-UMAÑA *et al*., 2015). São exemplos de aplicação das NPMet na área biomédica o diagnóstico de doenças, distribuição e entrega de drogas, diagnóstico médicos por imagens, biomarcadores, sistema de distribuição de genes, usados como antimicrobianos e na terapia anticâncer (KLEBOWSKI *et al*. 2018).

2.2.1 Síntese biológica de nanopartículas metálicas

As NPMet podem ser sintetizadas usando métodos físico, químico e biológico. Os processos podem ser divididos em “bottom-up” e “top-down”. O “bottom-up” é baseado na síntese das partículas por meio da redução de um sal metálico usando produtos químicos ou biológicos. No “top-down” a formação de nanopartículas, se dá através da desintegração da superfície de uma peça metálica, ou seja, o material é dividido até chegar a partículas nanométricas. Aqui se encaixam os métodos físicos de síntese (ECKHARDT *et al*. 2013; SWEET *et al*. 2017; MEDICI *et al*. 2019). Cada método tem seus prós e contras, contendo problemas como alto custo, uso de substâncias tóxicas em seu processo de síntese, necessidades de equipamentos específicos, baixa escalabilidade, problemas com tamanho e distribuição de tamanho das nanopartículas (ECKHARDT *et al*. 2013; SWEET *et al*. 2017; MEDICI *et al*. 2019).

Na síntese física existem as técnicas de evaporação-condensação, de corrente alternada e de descargo em arco, essas técnicas são exemplos de processos “top-down” (ABASSI *et al*. 2016). Estas técnicas têm como vantagens a rápida velocidade de síntese e a não utilização de substâncias tóxicas. Mas são desvantajosas devido ao alto consumo de energia e a falta de distribuição uniforme das nanopartículas (ABASSI *et al*. 2016). Quanto aos processos “bottom-up” acontece através da redução química dos íons metálicos (ZHANG *et al*., 2016). Alguns métodos químico e físico apresentam bons resultados devido ao alto rendimento de nanopartículas, mas estes métodos fazem o uso de solventes e substâncias que são tóxicas e, desta maneira, inviabiliza as aplicações médicas que venham a ter contato direto com o corpo (DAUTHAL *et al*., 2016).

Devido aos problemas das sínteses químicas e físicas, a síntese biogênica passou a ser uma alternativa interessante, pois é econômica, ecológica e segura e biocompatível (DAUTHAL *et al*., 2016). Isto ocorre devido ao fato dos métodos biológicos não precisar de equipamentos sofisticados ou de condições extremas como alta temperatura, alta pressão, alto

consumo de energia ou o uso de produtos químicos tóxicos (AHMED *et al*., 2016). A síntese biogênica também apresenta vantagens como o fácil escalonamento e a possibilidade de controlar as condições de síntese afim de encontrar as características físico-química adequadas das nanopartículas (DHUPER *et al*., 2012).

O principal requisito da síntese biogênica é, em geral, uma solução de sal metálico e um agente biológico redutor. Os íons metálicos são requisitos primário para a síntese de NPMet biogênicas e são obtidos a partir de diversos sais metálicos que tenha boa solubilidade em água (PERALTA-VIDEA *et al*., 2016). No caso das AgNPs, o nitrato de prata ($AgNO_3$) é o sal metálico mais utilizado, isto se deve aos nitratos terem ótima solubilidade em água (PERALTA-VIDEA *et al*., 2016; SRIKAR *et al*., 2016). Na síntese de nanopartículas de ouro é bastante utilizado o ácido cloroaúrico ($HAuCl_4$) (PERALTA-VIDEA *et al*., 2016; AHMAD *et al*. 2018). E na síntese de nanopartículas de cobre (CuNPs) é comum o uso de nitrato de cobre ($Cu(NO_3)_2$), sulfato de cobre ($CuSO_4$) e cloreto de cobre ($CuCl_2$)(PERALTA-VIDEA *et al*., 2016). Na maioria dos casos, os agentes biológicos têm dupla função, além de serem redutores, atuam como agentes estabilizadores e de recobrimento, portanto, não há necessidade de adicionar agentes estabilizadores após a síntese (VASEGHI *et al*., 2018). Na síntese biogênica de NPMet são relatados o uso de vários microrganismos, como bactérias, fungos, leveduras e plantas (VANAJA *et al*. 2013; CHITRA; ANNADURAI, 2014; VELGOSOVÁ *et al*. 2016; GUILGER *et al*. 2018; RHEDER *et al*. 2018).

O uso de plantas para a síntese de NPMet biogênicas é bastante citada por proporcionar protocolos de síntese rápidas, econômicas, ecológicas e a não utilização de produtos tóxicos. O uso de plantas como um agente de redução tem vantagens sobre a síntese microbiana, incluindo aumento na taxa de síntese, aumento da monodispersão, partículas estáveis e a não necessidade de tratamento complexo, como exemplo, o isolamento e cultivo microbiano. Além de ser necessário apenas uma etapa para o processo de síntese (MITTAL *et al*.,2013; YADI *et al*., 2018). E a síntese usando microrganismo não é viável perante a indústria devido aos requisitos de condições altamente assépticas e à sua manutenção (AHMED *et al*., 2016). A capacidade redutora das plantas é baseada em vários componentes reativos, como terpenóides, polissacarídeos, polifenóis, açúcares redutores, proteínas e aminoácidos. Além disso, diferentes órgãos vegetais, como caules, folhas, flores e sementes, podem ser utilizados na síntese (MITTAL *et al*.,2013; YADI *et al*., 2018).

As aplicações das NPMet biogênicas variam do campo biomédico a catalizadores e sensores na indústria química (SHARMA *et al*., 2015). Devido ao método de síntese, as propriedades das NPMet biogênicas são diferentes das sintetizadas por vias químicas e físicas.

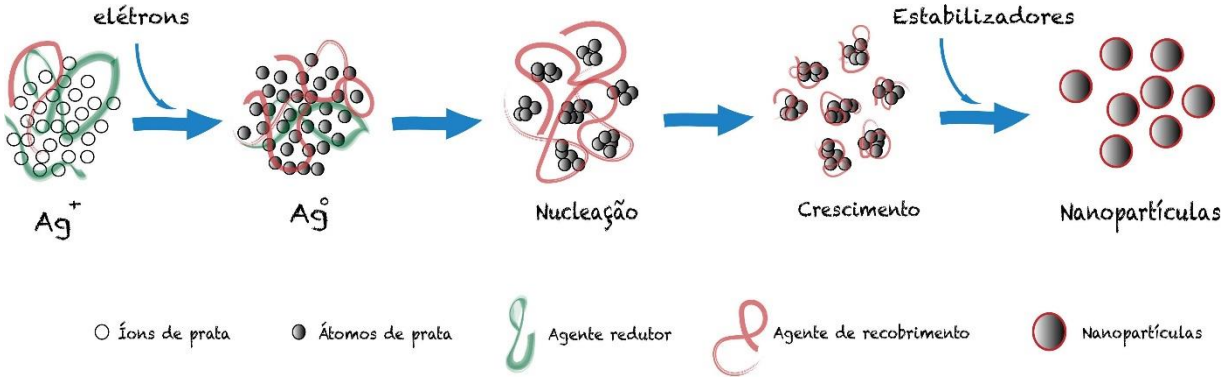
Assim, as NPs biogênicas são mais aceitas para aplicações médicas, por não envolver nenhum tipo de substância tóxica em sua síntese e ter alta biocompatibilidade (SHARMA *et al*., 2015; SRIKAR *et al*., 2016; TRIPATHI; CHUNG; 2019). Algumas NPMet biogênicas têm atraído bastante a atenção devido a sua propriedade antimicrobiana, e neste quesito, as mais aplicadas e pesquisadas são as AgNPs. Devido a essa propriedade antimicrobiana intrínseca da prata, as AgNPs são bastante visadas para recobrir materiais cirúrgicos e cateteres, em curativos para feridas e cremes antibacterianos (SLAVIN *et al*., 2017).

2.3 Aplicação, síntese, ação antimicrobiana e toxicidade de AgNPs

As AgNPs são aplicadas em setores como cosmética (GAJBHIYE; SAKHARWADE, 2016), alimentos (CARBONE *et al*., 2016), ambiental (YU *et al*., 2012), energia (CIESIELSKI; CZAJKOWSKI; SWITLIK, 2019), ciências biomédicas (PATIL *et al*., 2019), química (STARK *et al*., 2012) e eletrônico (YANG *et al*., 2011). Isto se deve as suas propriedades de alta condutividade elétrica, térmica, ótica e magnética, estabilidade química, alta atividade catalítica e atividade antimicrobiana, entre outras. Porém o maior uso das AgNPs está relacionado a sua ação antimicrobiana em embalagens de alimentos (CARBONE *et al*., 2016), em tecidos – para evitar proliferação de bactérias (BALLOTIN *et al*., 2017), em revestimento materiais cirúrgicos e dispositivos médicos (SOLANO-UMAÑA *et al*., 2015). Na área biomédica, além de agente antimicrobiano, também é utilizada em diagnósticos, na administração de medicamentos, na entrega de genes e como agente antitumoral (PATIL *et al*., 2019).

Para que se tenha as propriedades desejadas das AgNPs é importante selecionar bem o método de síntese. Como já dito, existem os métodos físicos, químicos e biológicos. Nos dois últimos, geralmente envolve um sal metálico precursor (por exemplo, $AgNO_3$), um agente redutor ($NaBH_4$ ou citrato de sódio) e um agente estabilizante/de recobrimento (tióis, aminas, polímeros) (ZHANG *et al*., 2016). O agente precursor fornece os íons de prata, enquanto o agente redutor fornece elétrons para redução ($Ag^+ \rightarrow Ag^0$). Após a redução, ocorre o estágio de nucleação onde os íons reduzidos começam a formar um núcleo que serve como referência para atrair novos os íons (processo de crescimento da NPs), logo formando as AgNPs (Figura 1). A estabilização decorre da adsorção de um agente estabilizador, que evita que as nanopartículas sofram aglomeração ou agregação (ZHANG *et al*., 2016).

Figura 1 – Esquema de formação de nanopartículas de prata biogênica.



*Elaboração própria

Os métodos químicos têm como grande vantagem o alto rendimento de nanopartículas sintetizadas, facilidade de síntese e são mais baratas que as sínteses físicas. Mas apresentam desvantagens como agentes redutores prejudiciais à saúde e ambiente, a possibilidade de tais substâncias ficarem aderidas a superfície das nanopartículas. Também é necessário uma etapa a mais para recobrir e dar estabilidade as partículas (ZHANG *et al*., 2016; SIDDIQI *et al*. 2018). São exemplos de técnicas da síntese química síntese crioquímica, sonoquímico, litografia, redução eletroquímica, decomposição sol-gel (ABASSI *et al*. 2016; BEYENE *et al*., 2017).

A síntese biogênica tem baixo custo, é ecologicamente correta, tem rápida formação de nanopartícula, apresentam alto rendimento, boa solubilidade e alta estabilidade, além de apresentar tamanho e morfologia bem definidos sob condições otimizadas (ZHANG *et al*. 2016; SIDDIQI *et al*. 2018). Tanto na síntese química como na biológica, existem os estágios de redução de íons de prata, o estágio de nucleação e o de crescimento da partícula. Em ambos os métodos é utilizado um sal metálico como precursor, o mais utilizado é o nitrato de prata ($AgNO_3$), o qual fornece íons de prata (KIM *et al*. 2018). Na síntese química são comumente utilizados dois reagentes para as etapas de redução e estabilização/recobrimento da partícula. Enquanto que na síntese biogênica as biomoléculas têm função dupla, de agente redutor e estabilizador/recobrimento das nanopartículas, e tais biomoléculas podem ser de origem vegetal, bacteriana ou fúngica (VANAJA *et al*. 2013; CHITRA; ANNADURAI, 2014; VELGOSOVÁ *et al*. 2016; GUILGER *et al*. 2018; RHEDER *et al*. 2018).

No entanto, s extratos vegetais são os meios redutores mais utilizados na síntese biogênica de AgNPs. Neste caso, os agentes redutores podem ser metabólitos hidrossolúveis (alcaloides, compostos fenólicos, terpenóides) biomoléculas (enzimas, proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, flavonoides, ácido cítrico) e grupos funcionais (álcool, aldeídos e aminas, compostos heterocíclicos e ácido tânico) que podem ser encontrados em talos, folhas e sementes

(KRISHNARAJ et. al, 2012; MAKAROV *et al*. 2014). A síntese utilizando extrato de plantas é bastante simples, basta adicionar o agente precursor ao extrato da planta para que haja a formação de nanopartículas (VANAJA *et al*. 2013; YADI *et al*. 2018).

Basicamente, existem 3 fases no processo da síntese biogênica de AgNPs. O primeiro estágio consiste na redução dos íons de prata. Nesta etapa, os íons recebem um elétron das biomoléculas e passam a ser prata metálica ($Ag^+ \rightarrow Ag^0$). Logo após, acontece o estágio de nucleação, onde os átomos de prata começam a se atrair e se concentrarem em um único ponto, isto ocorre concomitantemente em milhões de diferentes pontos, e assim, originam as AgNPs. E para finalizar, acontece o processo de recobrimento AgNPs, onde as biomoléculas são atraídas para a superfície das nanopartículas e funcionam como agentes estabilizadores, evitando o processo a aglomeração das AgNPs (ZHANG *et al*. 2016).

Na biossíntese de nanopartículas utilizando extrato de plantas existem quatro fatores importantes que podem influenciar na síntese das AgNPs, são eles o pH, temperatura, tempo de reação e proporção do extrato/$AgNO_3$ (CHITRA; ANNADURAI, 2014). O pH é um fator determinante na síntese, pois sua variação altera as cargas das biomoléculas que consequentemente interagem de maneira diferente com os íons Ag^+ afetando a produção de AgNPs. O pH influencia diretamente o tamanho das partículas, quanto mais alcalino o meio de reação, menor será o tamanho das partículas sintetizadas (SINGH; SINHA; MANDAL, 2009; VELGOSOVÁ *et al*. 2016; ANIGOL *et al*., 2017; NURFADHILAH *et al*., 2018). No caso da temperatura, temos a influência em relação a taxa de rendimento da formação de AgNP (VELGOSOVÁ *et al*. 2016; KUMAR *et al*., 2018). Estudos mostram que em altas temperaturas o rendimento, ou seja, a quantidade de nanopartícula formadas, é maior. O tempo de reação também influência na taxa de rendimento, sendo este dependente dos demais fatores. A proporção extrato/$AgNO_3$ interfere no tamanho e forma das AgNPs (KUMAR *et al*., 2018).

Além disso, as AgNPs apresentam atividade antimicrobiana e citotoxicidade diferentes dependendo do método de síntese, tamanho, forma e agentes redutor/recobrimento. As AgNPs sintetizadas por extratos de plantas têm mostrado um potencial impressionante contra vários patógenos, incluindo bactérias resistentes, fungos, protozoários, ácaros e larvas (ABBASZADEGAN *et al*., 2015; RAFIQUE *et al*., 2016; PRASAD *et al*., 2017; JUGANSON *et al*., 2017). Outro fato é que as NPs biogênicas têm mostrado potencial citotóxico contra células tumorais e ao mesmo tempo mostram baixa ou nenhuma toxicidade para as células normais (BHOWMIK *et al*., 2019). Além disso, sua alta estabilidade leva a potenciais aplicações em detecção química, imagem biológica, silenciamento de genes e administração de medicamentos (BINDHU; UMADEVI, 2015;).

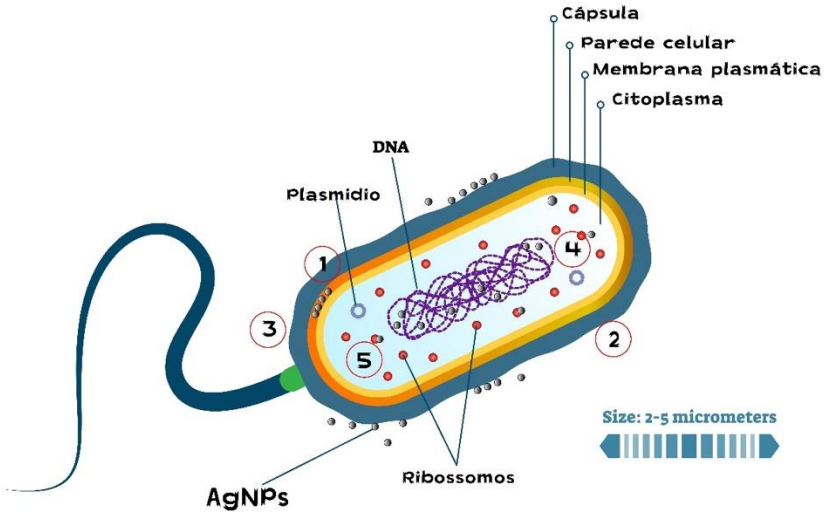
2.3.1 Ação antimicrobiana das AgNPs

A aplicação da prata como agente antimicrobiano é antiga, tal propriedade é a mais visada aplicação das AgNPs (BAPTISTA *et al*., 2018; LIMA; DEL FIOL; BALCÃO, 2019). O mecanismo exato de ação da AgNPs não é claramente conhecido, mas é uma questão que gera bastante discussão (FRANCI *et al*., 2015; BAPTISTA *et al*., 2018). Existem muitas teorias sobre sua ação bactericida. No entanto, alguns fatores são importantes para que exista a atividade antimicrobiana das AgNPs, tais como tamanho, forma, distribuição de tamanho, recobrimento, aglomeração, carga elétrica superficial, concentração das nanopartículas e liberação de íons Ag^+ (OUAY;STELLACCI, 2015; DAKAL *et al*., 2016; DÚRAN *et al*., 2016; RAMALINGAM *et al*., 2016; PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018). Atualmente, alguns estudos mostraram que as AgNPs menores que 10 nm são as responsáveis pela ação antimicrobiana, enquanto as AgNPs de tamanhos maiores, o mecanismo predominante ocorre através dos íons de prata (DÚRAN *et al*., 2016).

O tamanho das AgNPs é um fator importante para atividade antimicrobiana, pois quanto menor a partícula maior será sua área de contato e a sua interação com a superfície e estruturas internas das bactérias (PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018; MEDICI *et al*. 2019). Logo, as AgNPs aderem à membrana celular bacteriana e causam alterações estruturais que afetam a sua permeabilidade e transporte, levando a célula a um desequilíbrio na respiração celular e consequentemente a morte (DAKAL *et al*., 2016; DÚRAN *et al*., 2016). Além disso, as AgNPs também podem penetrar a célula e interagir com estruturas celulares internas que contém enxofre, como proteínas e enzimas (DÚRAN *et al*., 2016; PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018). Estudos sugerem que há a formação de radicais livres quando as AgNPs entram em contato com as bactérias, esses radicais podem danificar os componentes celulares causar a morte celular (FIGURA 2) (DAKAL *et al*., 2016; PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018).

Também é proposto que as AgNPs servem como um reservatório de íons Ag^+, que são quando as nanopartículas aderem as células (OUAY; STELLACCI, 2015; PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018; MEDICI *et al*. 2019). Assim, os íons liberados pelas AgNPs entram em contato com as bactérias e causam danos na membrana da célula. Dentro da célula, os íons podem inibir enzimas da cadeia respiratória e causar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que rapidamente atacam as organelas da célula (DAKAL *et al*., 2016; DÚRAN *et al*., 2016).

Figura 2- Mecanismo proposto d*a* ação antibacteriana das nanopartículas de prata: 1*)* atração eletrostática, 2*)* produção de radicais livres, alterações na permeabilidade, distúrbios da respiração, vazamento de conteúdo intracelular, 3*)* modulação dos perfis fosfotirosina das proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular e na síntese de polissacarídeos capsulares, 4*)* interação com os grupos SH; inibição da síntese e função de proteínas, 5*)* interação com moléculas contendo fósforo (DNA).



*Elaboração própria

A prata é um ácido mole, e seus íons têm a predisposição natural para interagir com bases moles. Diversas estruturas celulares são compostas por enxofre e fósforo, que são bases moles, as interações com estes elementos podem inativar ou danificar diversas estruturas celular e levar a célula a morte (DÚRAN *et al*., 2016; PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018). O DNA também contém enxofre e fósforo como seus principais componentes, desta maneira os íons podem atuar no material genético levando a problemas na estrutura ou função do DNA, implicando na impossibilidade de sobrevida da bactéria (OUAY; STELLACCI, 2015). A ionização das AgNPs é proporcional à área de sua superfície exposta, uma AgNP pode ser constituída de 20 a 15.000 mil átomos de prata (SOLANO-UMAÑA *et al*. 2015). Assim, acredita-se que a atividade antimicrobiana está diretamente ligada ao número de íons de prata biologicamente ativo e a sua disponibilidade para interação com os microrganismos (OUAY; STELLACCI, 2015; PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018).

2.3.2 Toxicidade das AgNPs

É inegável que as propriedades das AgNPs as tornam excelentes candidatas para diversas aplicações do nosso dia a dia, principalmente a sua atividade antimicrobiana que traz grandes perspectivas para a área biomédica (GE *et al*., 2014). No entanto, alguns estudos sugerem que as AgNPs podem causar danos a saúde e ao ambiente, mas tal fato ainda não é considerado completamente elucidado e é relativamente inexplorado (REZVANI *et al*., 2019). Também é necessário considerar que diversos aspectos podem influenciar a toxicidade das AgNPs. Além da concentração, as características das partículas como método de síntese,

tamanho, forma, carga elétrica superficial, recobrimento, entre outros, devem ser consideradas na avaliação da toxicidade (ZHANG *et al*., 2014). Foi atribuído que parte da toxicidade das AgNPs é devido aos íons de prata livres na fase aquosa. E os efeitos adversos mais comuns causados por esses íons, em humanos e outros seres vivos, incluem o tom cinza-azulada permanente da pele e dos olhos (argiria/argirose), efeitos tóxicos no fígado e nos rins; irritações oculares, cutâneas, respiratórias e do trato intestinal; e alterações nas células sanguíneas (REZVANI *et al*., 2019).

As AgNPs podem ter efeitos tóxicos ambientais, principalmente sobre a microbiota do solo, podendo matar as bactérias responsáveis pela desnitrificação, prejudicando o ciclo do nitrogênio e como consequência afetar a nitrificação do solo, essencial para o crescimento das plantas (YU *et al*., 2013). Os efeitos tóxicos também podem se estender aos ambientes aquáticos onde os íons de prata podem interagir com as brânquias afetando a osmorregulação dos peixes (RAJKUMAR *et al*., 2016). Também já foram observados estresse oxidativo e peroxidação lipídica em tecido cerebral de peixes (KHAN *et al*., 2015; AFIFI *et al*., 2016). Em ensaios realizados com peixes *Daphnia Magna*, os resultados mostram que a prata causa efeito tóxico agudo (Griffitt *et al*., 2009). Outros estudos mostram que AgNPs causaram estresse oxidativo, seguido pelo aumento da atividade da enzima catalase e diminuição da glutationa peroxidase e glutationa s-transferase em quase todos os tecidos de *Danio rerio* (RHEDER *et al*. 2018).

Embora alguns detalhes dos mecanismos citotóxicos das AgNPs não estejam claros. Um dos principais mecanismos citados é o estresse oxidativo através da formação de espécie reativa de oxigênio (ROS) e danos aos componentes celulares, como ao DNA, depleção de moléculas antioxidantes, ligação e desativação de proteínas e danos a membrana celular (MCSHAN, *et al*; 2014; ZHANG *et al*., 2016). No entanto, há detalhes que ainda precisam ser melhor estudados como, a relação tóxica das formas iônicas da prata e as AgNPs, quais as vias de sinalização envolvidas na toxicidade e principais enzimas, e o efeito das substâncias residuais da síntese e a relação com o revestimento das AgNPs (AKTER *et al*., 2018).

As avaliações de riscos são projetadas para testar os possíveis mecanismos de efeitos tóxicos. Assim, fatores como método de exposição, vias de exposição e tempo de exposição são críticos para determinar o potencial tóxico das AgNPs. A vias mais comuns de exposição são através da administração oral, inalação e contato dérmico (ZHANG *et al*., 2014). O fígado é o principal órgão alvo, seguido pelo baço, pulmões e rins (TANG *et al*., 2009). Um estudo sobre a toxicidade por inalação das AgNPs revelou distribuição das nanopartículas nos pulmões, fígado e indução de respostas inflamatórias, como exemplo, a inflamação alveolar crônica (BRAAKHUIS *et al*., 2016).

Em experimentos com ratos Brown-Noruega e Sprague-Dawley, foi notado que as AgNPs podem induzir inflamação, eosinofilia e neutrofilia pulmonar com hiperresponsividade brônquica, características da asma (SEIFFERT *et al*., 2015). Além disso, os AgNPs afetam a expressão de marcadores bioquímicos de hepatotoxicidade, como fosfatase alcalina sérica e colesterol, bem como apoptose e inflamação (KIM *et al*., 2008; SONG *et al*., 2013). Também foi descrito que a exposição oral a AgNPs produziu alterações na composição química do sangue e hepatotoxicidade, conforme indicado pelo aumento dos níveis de atividade sérica de AST (aspartato amino transferase) e ALT (alanina aminotransferase) e danos histológicos no fígado (HEYDRNEJAD *et al*., 2015). Atraves da alanina, isoleucina, L-serina desidratase/L-treonina desaminase e outros aminoácidos e proteínas, foi possível constatar que as AgNP-citrato alterou o metabolismo da glicina, serina e treonina, cisteína e metionina, afetando a oxidação e a desaminação e, finalmente, levando a danos no fígado (XIE *et al*., 2018).

É bastante comum encontrar trabalhos que realizaram teste de toxidade *in vitro*, pois tais ensaios são simples e pertinentes para testes iniciais, existe a possibilidade de realizar ensaios utilizando células humanas e animais como NIH/3T3, A549, V79, HaCat, HeLa, entre outras. Também é possível realizar diferentes tipos de ensaios citotóxicos e genotóxicos (MUKHERJEE *et al*., 2012; SAMBALE *et al*., 2015; RHEDER *et al*. 2018).

Em estudo realizado sobre a citotoxicidade de AgNPs comerciais com tamanho < 100 nm (Sigma), utilizando as linhagens HeLa e HaCat, mostram que as células HeLa foram consideradas como mais sensíveis que as células HaCaT em todos os ensaios de citotoxicidade a curto prazo realizados (MUKHERJEE *et al*., 2012). Uma possível explicação para a diferença na sensibilidade das diferentes linhagens celulares pode ser explicada pelos níveis de antioxidantes naturais de cada linhagem, fato que é a chave por trás de seu mecanismo de defesa natural durante o estresse oxidativo. Portanto, isso provavelmente governa a sensibilidade das linhagens celulares quando expostas às nanopartículas (MUKHERJEE *et al*., 2012). Outros dados também demonstraram que as AgNPs comerciais resultaram em efeitos citotóxicos e imunotóxicos em células epiteliais do pulmão humano A549, tais efeitos podem ter sido mediados pela geração de ROS e estresse oxidativo (SULIMAN *et al*., 2013).

No trabalho de Rolim *et al*. (2019) foram sintetizadas AgNPs utilizando chá verde e posteriormente recoberta com PEG (polietileno glicol 200) para aumentar a biocompatibilidade. Embora os resultados utilizando difusão de Franz demonstrasse que as AgNPs permeia a pele humana, as nanopartículas não geraram efeito citotóxico em células HaCaT avaliadas por ensaio de viabilidade com MTT (Brometo de tetrazólio azul de tiazolil). Em avaliações de citotoxicidade utilizando o sistema InQ ™ Cell Research System com células HEK 293 foi

demonstrado que AgNPs biológica não são tóxicas nas concentrações de 2 ppm e 4 ppm (OKAFOR *et al*., 2013).

Assim, a determinação da citotoxicidade das AgNPs pode ser considerada complexa devido aos diversos fatores que podem influenciar a toxicidade, como diferentes métodos de síntese, tamanho, se há ou não recobrimento da partícula e, principalmente, o ensaio que foi utilizado para avaliar a toxicidade (ZHANG *et al*., 2014). Normalmente é visto que as partículas biológicas têm efeito citotóxico menor do que as partículas sintetizadas de outras formas (SENTHIL *et al*., 2017). Por isso, não há como prever se a AgNP sintetizada será tóxica considerando apenas a sua composição. Portanto, é necessário testar os efeitos tóxicos de cada nanopartícula independente de suas características, pois cada nanopartícula é única. No atual momento, os estudos das AgNPs estão focados principalmente em sua atividade antimicrobiana devido ao aumento excessivo de bactérias resistentes. As AgNPs são promissoras nessa luta, pois eliminam bactérias resistentes em concentrações relativamente baixas (OKAFOR *et al*., 2013) e são pouco tóxicas para as culturas de células humanas (LIMA *et al*., 2012).

2.4 A crise das bactérias resistentes

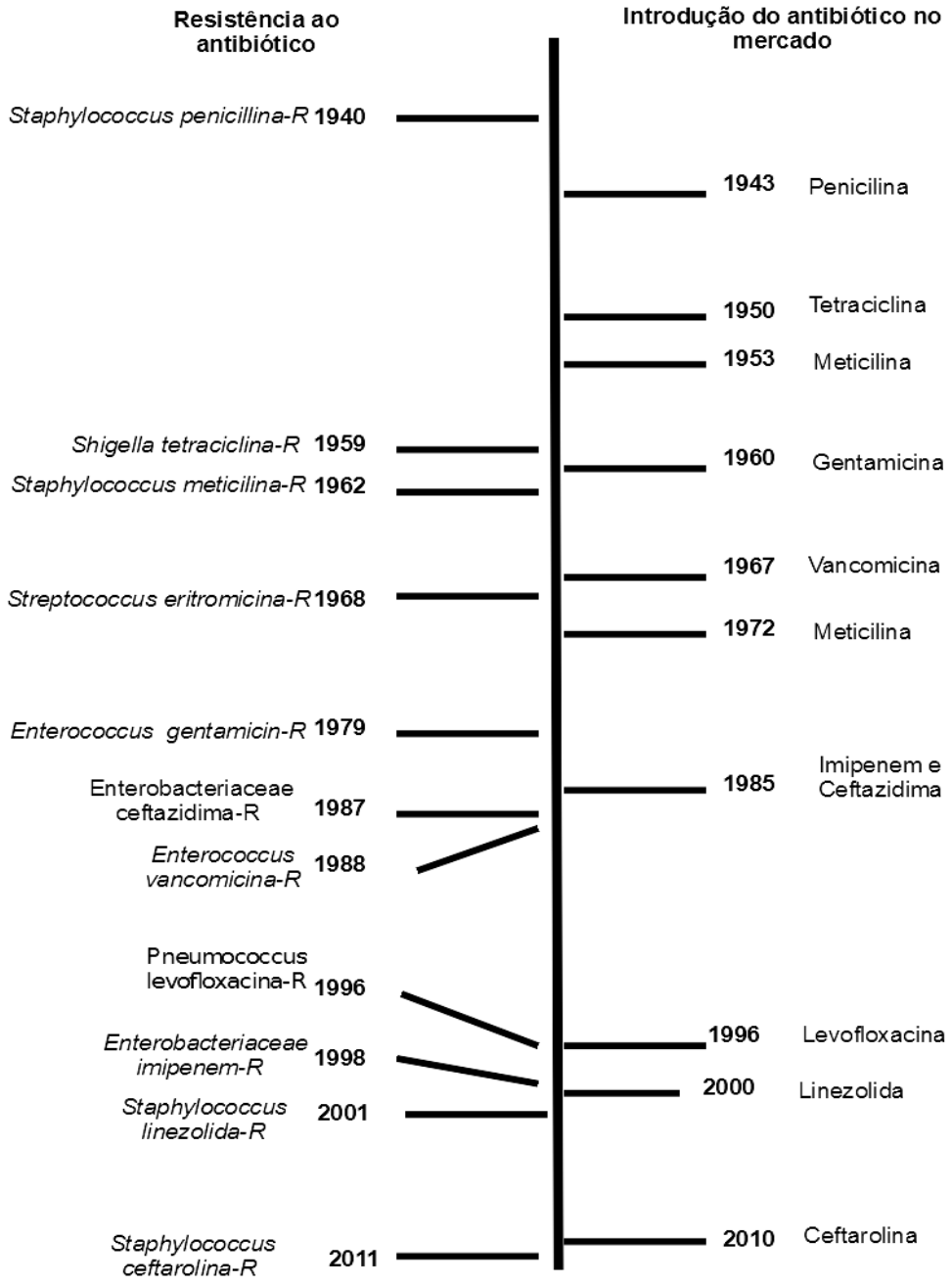
A descoberta da penicilina, em 1928, abriu as portas para a era da medicina moderna. Desde então os tratamentos com antibióticos já salvou milhões de pessoas no mundo inteiro e aumentou a expectativa de vida da população (PEREIRA; PITA, 2005; BELL, 2006; FERREIRA *et al*. 2008; VENTOLA *et al*. 2015;). Até o aparecimento dos antibióticos as infecções eram as principais causas de morte da população, sendo os primeiros registros do uso da penicilina para tratamento de infecções da década de 1940 (CHAIN *et al*., 2005; BELL, 2006; FEREIRA *et al*., 2008).

Entre as décadas de 1930 a 1960 foram descobertos muitos outros novos antibióticos, tal época ficou conhecida como a “era do ouro” dos antibióticos (AMINOV, 2010; NATHAN; CARS, 2014). Dentre as descobertas estão penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, aminoglicosídeo, cloranfenicol, macrólidos e glicopeptídeos (AMINOV, 2010; VENTOLA *et al*. 2015; LI; WEBSTER, 2018). A indústria farmacêutica conseguiu desenvolver e introduzir novos antibióticos no mercado até o início dos anos de 1980, e com o passar do tempo este ritmo foi desacelerando e poucos antibióticos novos foram introduzidos no mercado. Entre os anos de 1983 a 2002 foram aprovados cerca de 47 antibióticos, e entre os anos de 2003 a 2012 foram aprovados apenas 7 (CHOPRA *et al*., 2002; VENTOLA *et al*. 2015).

Infelizmente hoje, mais de 60 anos após a “era de ouro” dos antibióticos, as infecções bacterianas, mais uma vez, tornam-se uma grande ameaça a vida humana. Isto porquê com o

passar do tempo algumas bactérias criaram mecanismos para se defenderem dos antibióticos, tornando-se resistentes a quase todos os antibióticos já desenvolvidos (Figura 3). E infelizmente a indústria farmacêutica não conseguiu acompanhar este ritmo (CHOPRA *et al*., 2002; NATHAN; CARS, 2014). Até agora, nenhuma classe de antibióticos escapou deste fenômeno implacável, embora o tempo decorrido entre a introdução do antibiótico na prática clínica e o surgimento de resistência tem sido variável (NATHAN; CARS, 2014; VENTOLA *et al*. 2015).

Figura 3 - Linha do tempo do desenvolvimento de resistência antimicrobiana.



Fonte: Adaptado de Ventola (2015).

As mortes hoje causadas por doenças infecciosas já são o segundo maior motivo de óbitos no mundo. Em países desenvolvidos é a segunda maior causa de mortes e quarta nos Estados Unidos. Infecções por bactérias resistentes já matam mais de 33 mil pessoas por ano na Europa e 23 mil nos Estados Unidos. No Brasil, ainda não há relatórios oficiais sobre o número de vítimas por bactérias resistentes (MUNITA; ARIAS, 2016; MARTENS; DEMAIN, 2017; CASSINI *et al*., 2019). Acredita-se que até 2050 as infecções por bactérias resistentes matará 10 milhões de pessoas por ano, podendo matar mais do que o câncer (SANTOS, 2004; WANNMACHER, 2004; FERREIRA *et al*. 2008; WHO, 2014; VENTOLA *et al*. 2015; MICHAEL *et al*. 2016; SAMPAIO *et al*. 2018).

A resistência aos antibióticos é antiga, no entanto, e tornou-se um problema atual dinâmico e crescente. Um dos motivos deste problema é o uso excessivo de antibióticos. O aparecimento de cepas resistente deve-se a seleção de bactérias que acontece quando utilizamos os antibióticos (SPELLBERG *et al*., 2013). O alerta já havia sido dado em 1945, quando Fleming alertou sobre os perigos do uso deste tipo de medicamento (SPELLBERG *et al*., 2013). No início dos anos 1960, foram detectadas as primeiras cepas resistentes de *Salmonella, Shigella* e *Escherichia coli*. Na década seguinte, foi observado *Neisseria gonorrhoeae* resistentes à ampicilina e *Haemophilus influenza* resistentes à ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol (NEU, 1992; ROSSOLINI *et al*., 2014; ECONOMOU; GOUSIA, 2015; VENTOLA *et al*. 2015; ASLAM *et al*., 2018).

Além das prescrições de antibióticos para tratamento em humanos, estão entre as estatísticas do uso excessivo dos antibióticos a agropecuária que contribui para este aumentar o número de bactérias resistentes (ECONOMOU; GOUSIA, 2015). Os antibióticos são equivocadamente usados para prevenir doenças nos animais, sendo usado pelo setor agropecuário cerca de 30 diferentes antibióticos na água ou nos alimentos servidos para estes animais (ECONOMOU; GOUSIA, 2015; MARTENS; DEMAIN, 2017). Fatores como descarte incorreto, a falta de tratamento de esgoto e resíduos de antibióticos em fezes/estrume, também contribuem para que as bactérias possam ter contato com o medicamento, gerando a seleção natural das bactérias resistentes no ambiente (CAUCCI *et al*., 2016). Assim os antibióticos eliminam as bactérias sensíveis e seleciona as resistentes que apresentam mecanismos específicos de resistência.

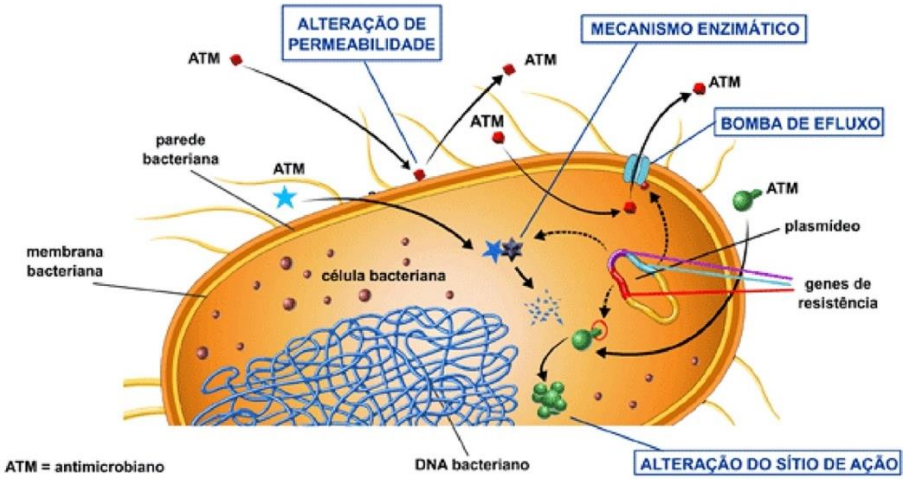
2.4.1 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência bacteriana acontece através do processo natural de evolução, onde as bactérias sofrem alterações nos vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos específicos envolvidos na ação antimicrobiana, os quais ajudam a bactéria a sobreviver na presença dos antibióticos (BLAIR *et al*., 2014; LIN *et al*., 2015). Portanto, o surgimento da resistência aos antibióticos é algo natural, uma vez que tais bactérias sofrem mutações e seleção natural ou por transferências de material genético. Existem dois tipos distintos de resistência a antibióticos: intrínseco e adquirido (BLAIR *et al*., 2014; MUNITA; ARIAS, 2016). As bactérias podem ter intrinsicamente resistência a uma determinada classe de antibióticos como resultado de suas características estruturais ou funcionais. Também pode adquirir resistência através da herança de genes parentais, já que existem mais de 20.000 genes que tem potenciais de resistência, ou então surgir através de uma mutação espontânea (LIU; POP, 2009; HOLMES *et al*., 2016). Tais genes, na grande maioria, fazem parte do DNA plasmidial ou fazem parte de unidades de DNA denominadas *transposons* (BLAIR *et al*., 2014; HOLMES *et al*., 2016). A resistência adquirida ocorre através de transferência gênica horizontal entre bactérias por meio de plasmídeos ou *transposons*, ou seja, em trocas de DNA entre espécies, com subsequente recombinação interespécies (BLAIR *et al*., 2014; HOLMES *et al*., 2016).

Ao discutirmos os mecanismos de resistência bacteriana é preciso ter em mente o modo de ação e as propriedades dos antibacterianos, que em geral apresentam as características: 1) Alcançar os alvos moleculares, quando são intracelulares, para isso, o antibiótico, precisa ultrapassar a membrana celular bacteriana em quantidades suficientes; 2) Interagir com uma molécula-alvo de modo a desencadear a morte da bactéria; 3) Evitar a ação das bombas de efluxo que jogam os antimicrobianos para fora da célula bacteriana; 4) Evitar a inativação por enzimas capazes de modificar o fármaco no ambiente extracelular ou no interior da célula bacteriana (ANVISA, 2019).

As bactérias utilizam diversas táticas para evitar a ação dos antibióticos, muitas vezes mais do que uma delas é necessário (Figura 4). Os principais mecanismos de resistência aos antibióticos estão relacionados à inativação do antibiótico por enzimas, como as β-lactamase; aumento do efluxo do antibiótico para fora das células; diminuição da captação do antibiótico, alterando a permeabilidade da membrana; modificação o sítio de ação, para diminuir a ligação do antibiótico; e proteção do alvo através da formação de biofilme (HALL; BARLOW, 2004; POOLE, 2005; BLAIR *et al*., 2014; LIN *et al*., 2015; FLEMMING *et al*., 2016; MUNITA; ARIAS, 2016).

Figura 4- Mecanismo de resistência bacteriana.



Fonte: Adaptado de Anvisa, 2019.

A degradação dos antibióticos por ação enzimática é o mecanismo de resistência mais presente nas bactérias. As β-lactamases atualmente são as enzimas mais importantes para o mecanismo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenens, monobactâmicos) (HALL; BARLOW, 2004; MUNITA; ARIAS, 2016).). A ação dessas enzimas se dá pela hidrolise da ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo a estrutura química que os antibióticos β-lactâmicos usam para ligar-se em seus alvos, assim, o antibiótico perde a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (HALL; BARLOW, 2004; BLAIR *et al*., 2014).

Essas enzimas podem ser encontradas extracelularmente em bactérias Gram-positivas e no espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas (HALL; BARLOW, 2004; BLAIR *et al*., 2014). Já foram descritos variados tipos de β-lactamases, a dissiminação da resistência aos β-lactâmicos acontece através de genes localizados em plasmídeos conjugáveis ou *transposons*, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou induzido (HOLMES *et al*., 2016). As β-lactamases podem ser detectadas em *Enterobacteriaceae, Haemophilus influenza, Pseudomonas aeruginosa, Neisseria gonorrhoeae, Vibrio cholerae, Klebsiella pneumoniae*. A *S. aureus* tem resistência quase universal à penicilina devido terem a enzima *β-lactamase* (HALL; BARLOW, 2004; MUNITA; ARIAS, 2016).

Para ter efeito o antibiótico deve estar em alta concentração dentro das células bacterianas. Algumas bactérias possuem proteínas de membrana que agem como uma bomba de exportação ou efluxo, que transportam uma variedade de compostos, como moléculas sinalizadoras e nutrientes na célula bacteriana (WEBBER; PIDDOCK, 2003; POOLE, 2005; BLANCO *et al*., 2016). As bombas de efluxo também podem transportar antibióticos para fora

da bactéria, expulsando-o o mais rápido possível, o que resulta na diminuição da concentração intracelular do antibiótico, assim, diminuindo a sua ação, sendo um dos mecanismos que mais contribui para a resistência (BLANCO *et al*., 2016; BLAIR *et al*., 2014; LIN *et al*., 2015).

Algumas bombas de efluxo são seletivas e expulsam antibióticos específicos, como macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas e tetraciclinas, enquanto outras (chamadas de múltiplas bombas de resistência a drogas) expelem uma outra variedade de antibiótico com diferentes modos de ação, por exemplo, clorexidina, propamidina e amónio quaternário (WEBBER; PIDDOCK, 2003; POOLE, 2005; BLANCO *et al*., 2016). Em alguns casos, as mutações no DNA bacteriano podem fazer com que as bactérias produzam mais de uma determinada bomba, o que por sua vez, aumenta a resistência (POOLE, 2005; BLAIR *et al*., 2014, BLANCO *et al*., 2016).

Quase sempre os antibióticos requerem acesso ao interior da bactéria para que consigam chegar aos seus alvos, para isso, é necessário ultrapassar a membrana da célula (KOJIMA; NIKAIDO, 2013; BLAIR *et al*., 2014). Certas alterações diminuiu a permeabilidade da membrana bacteriana, o que dificulta a passagem dos antibióticos, desta forma, menos antibiótico entra nas bactérias. A permeabilidade dessa membrana reside na presença de proteínas especiais, as porinas, que são canais por onde os antibióticos utilizariam para cruzar a membrana externa da bactéria, assim, podem passar para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula (WEBBER; PIDDOCK, 2003; WOZNIAK *et al*., 2012; BLAIR *et al*., 2014). A permeabilidade limitada constitui uma propriedade das bactérias Gram-negativas, tais bactérias reduzem a absorção de certos antibióticos como aminoglicosídeos, modificando a frequência, o tamanho e a seletividade do canal de porina da membrana celular (VARGIU; NIKAIDO, 2012; WOZNIAK *et al*., 2012). Esta tática evitará que os antibióticos alancassem seus alvos dentro da célula, como no caso dos aminoglicosídeos, que agem sobre os ribossomos e as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), respectivamente (KOJIMA; NIKAIDO, 2013; BLAIR *et al*., 2014).

Algumas bactérias resistentes evitam a ação dos antibióticos camuflando ou reprogramando os seus sítios alvos, este mecanismo de resistência é considerado um dos mais importantes. Pois apesar da presença de um antibiótico intacto, ativo e em concentrações altas dentro da bactéria, nenhuma ligação, ação ou inibição ocorrerá (LAMBERT, 2005; GIEDRAITIENĖ *et al*., 2011). Na camuflagem, acontecem alterações na composição da estrutura alvo, que pode impedir que o antibiótico interaja com o seu sítio de ação, uma das alternativas é a adição de diferentes grupos químicos à estrutura alvo, deste modo, a bactéria se protege do antibiótico. Algumas vezes as bactérias podem produzir uma estrutura variável da

que precisa, como por exemplo, uma bactéria resistente à vancomicina pode produzir uma parede celular diferente das bactérias suscetíveis ao antibiótico impedindo que este seja capaz de interagir com o seu alvo. As bactérias também podem adquirir um gene que codifica um novo produto resistente ao antibiótico, como a *Staphylococcus aureus* que apresenta o gene de resistência mec A e produz uma nova proteína resistente a ligação da penicilina. Desta maneira, enquanto as proteínas "originais" são inativados, esta nova proteína não sofre interferência dos β-lactâmicos, o que é suficiente para manter a integridade da parede celular da bactéria (BLAIR *et al*., 2014; LAMBERT, 2005).

Uma outra situação problemática para tratamento com antibióticos é quando existe a formação de biofilmes (OLSEN, 2015; SINGH *et al*., 2017; LI; WEBSTER, 2018). Os biofilmes consistem na formação de uma comunidade de bactérias envolta por substâncias poliméricas produzidas pela própria bactéria, esta tem como função proteger a comunidade da falta de nutrientes, ação de antibióticos ou outras substâncias nocivas as bactérias (FLEMMING *et al*., 2016; SINGH *et al*., 2017), porém o biofilme não é um mecanismo de resistência permanente a antibióticos, mas pode reduzir a eficácia dos antibióticos, sendo, portanto, um mecanismo de tolerância aos antibióticos, pois é um estado natural, uma vez que as bactérias desenvolveram este fenômeno para se proteger (GILBERT; ALLISON; MCBAIN, 2002; OLSEN, 2015; FLEMMING *et al*., 2016; SINGH *et al*., 2017).

Devemos lembrar que a formação de biofilme acontece naturalmente para a grande maioria das bactérias que colonizam os organismos, um exemplo é a *Escherichia coli* que produz biofilme, porém reside em nosso organismo e vive em simbiose conosco. A grande preocupação com os biofilmes é que com eles as bactérias podem chegar a ser 100 a 1.000 vezes mais resistentes aos antibióticos, e se imaginarmos este mecanismo agindo em conjunto com um mecanismo de resistência é possível aumentar ainda mais a dificuldade do tratamento de bactérias resistentes (OLSEN, 2015; FLEMMING *et al*., 2016; SINGH *et al*., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi sintetizar e estudar o potencial antimicrobiano de AgNPs biogênicas utilizando extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* e propor seu uso em hidrogéis para aplicações em feridas na pele.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar AgNPs utilizando *Kalanchoe pinnata* como agente redutor e estabilizante.
- Otimizar a síntese de AgNPs.
- Caracterizar as AgNPs para definição de parâmetros como distribuição de tamanho, índice de polidispersão, potencial Zeta, concentração através rastreamento de nanopartículas e espectrometria de luz visível.
- Avaliar a atividade antibacteriana das AgNPs produzidas, por análise suscetibilidade de disco-difusão, Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).
- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade das AgNPs em linhagens celulares de fibroblastos embrionário (NIH/3T3), queratinócitos humano (HaCaT), células cancerígenas epiteliais (HeLa) e células de pulmão (V79).
- Preparar hidrógeis contento AgNPs e caracterizar os aspectos físico-químico do perfil de permeação de hidrogéis sensíveis à temperatura.
- Avaliar a ação antimicrobiana das AgNPs nos hidrogéis.

4 RESULTADOS

Como resultados foi possível gerar 2 artigos científicos:

1. Otimização da síntese de nanopartículas de prata biogênica utilizando a planta *Kalanchoe pinnata*
2. Avaliação da atividade antibacteriana e de toxicidade *in vitro* de nanopartículas de prata biogênica sintetizadas com *Kalanchoe pinnata*

4.1 Artigo 1

Otimização da síntese de nanopartículas de prata por rota biogênica a partir do extrato da planta *Kalanchoe pinnata*

Resumo

As nanopartículas de prata (AgNPs) biogênicas são um dos nanomateriais mais estudados da atualidade, devido a sua propriedade antimicrobiana. Embora existam muitos trabalhos sobre as AgNPs biogênicas, ainda existe a necessidade de estudar as particularidades da sua síntese e características físico-químicas. Desta maneira, aprimorar e entender o processo de síntese de AgNPs biogênicas é essencial. O objetivo deste estudo foi investigar a relação entre o pH e as características das AgNPs biogênicas, como tamanho e polidispersão, além avaliar a sua atividade antimicrobiana. Para a síntese, foi utilizado diferentes concentrações do extrato das folhas da planta *Kalanchoe pinnata* sob variados pH. O processo de síntese das AgNPs foi acompanhado por espectrofotometria e posteriormente o tamanho das nanopartículas caracterizadas por espalhamento dinâmico da luz (DLS) e análise de potencial zeta por microeletroforese. Para medir o potencial antimicrobiano foi utilizado o método disco-difusão para os organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostram que as AgNPs sintetizadas com extratos na concentração final de 0,06 $mg.mL^{-1}$ e pH alcalino (9,00) produziram partículas menores e mais homogêneas, com diâmetro 121 ± 8, polidispersão 0,2 ± 0,01 e potencial zeta -22,6mv. Da mesma forma, as AgNPs sintetizadas em meio alcalino (pH 8 e 9) apresentaram halos maiores, o que corresponde a maior atividade antimicrobiana. Logo, pode-se concluir que a síntese de AgNPs biogênica as condições de preparo dependem da concentração e do pH. Este estudo abre perspectiva para o uso destas nanopartículas como opção para serem utilizada em diferentes áreas.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanopartículas de prata. Biogênicas. Otimização. pH.

INTRODUÇÃO

As pesquisas com nanotecnologia crescem a cada dia e despertam o interesse de diversos setores. Isto é porque quando um material está em escala nanométrica apresenta propriedades químicas, catalíticas, mecânicas, magnéticas, eletrônicas e óticas diferentes das propriedades de quando em macroescala. Isto possibilita melhorar a aplicação de um determinado material, buscando produzir produtos de alto desempenho (NIKALJE, 2015; KHAN; SAEED; KHAN, 2017; SINGH; DUBEY; DUBEY, 2019).

Dentre os diversos nanomateriais, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm atraído a atenção da comunidade científica por causa das suas características físico-químicas e versatilidade de aplicação. Elas são utilizadas como sensor, material fotovoltaico e catalizador (AKHTA *et al*. 2019; COUZON *et al*. 2019). O maior interesse nas AgNPs está em sua ação antibacteriana. Pois, elas podem ser aplicadas para tratamento de feridas, queimaduras, na superfície de dispositivos médicos, para assim, combater e prevenir contaminações e infecções por bactérias (MEDICI *et al*. 2014; NIKALJE, 2015; SINGLA *et al*. 2016; MAURICIO *et al*. 2018; MUHAMMAD *et al*. 2018).

Atualmente existem três maneiras de se obter AgNPs, através de métodos químicos, físico ou biológico (ECKHARDT *et al*. 2013; SWEET *et al*. 2017; MEDICI *et al*. 2019). Diante destes métodos, a biossíntese de nanopartículas são as mais atraentes, pois, em comparação aos demais procedimentos, apresentam menor toxicidade e consequentemente menos risco ambiental e ocupacional, além de ser uma síntese rápida e de baixo custo, pois sua execução necessita de poucos reagentes (ZHANG *et al*. 2016; SIDDIQI *et al*. 2018).

Na síntese biogênica de AgNPs são necessários 2 reagentes: um sal precursor e um meio aquoso rico em moléculas biológicas. O sal precursor é responsável por fornecer íons de prata, comumente é utilizado o nitrato de prata ($AgNO_3$). O extrato líquido de moléculas biológicas (proteínas, açucares, fenóis, entre outras) podem ser provindas de fungos, bactérias ou plantas (GUILGER *et al*. 2017; 2019; RHEDER *et al*. 2018). Aqui, as biomoléculas têm as funções de agir como redutor e estabilizador das nanopartículas. Ou seja, elas doam elétrons para o meio de reação, o que possibilita a redução dos íons de prata ($Ag^+ \rightarrow Ag^0$) para gerar as AgNPs, e posteriormente recobrem as AgNPs conferindo estabilidade e biocompatibilidade a elas (VANAJA *et al*. 2013; CHITRA; ANNADURAI, 2014; VELGOSOVÁ *et al*. 2016).

Os extratos de plantas são os meios redutores mais utilizados na síntese biogênica de AgNPs, por proporciona uma rápida formação de partículas e por serem ricos em moléculas biológicas. Pois, tais moléculas são essenciais para o sucesso da síntese, biocompatibilidade e

aplicação das AgNPs (KRISHNARAJ et. al, 2012; MAKAROV *et al*. 2014). A planta *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers, conhecida popularmente como folha-da-fortuna, é uma planta sublenhosa nativa de Madagascar (CRUZ, *et al* 2012). Tal planta apresenta ação anti-inflamatória e atividade antimicrobiana. Ela é usada na medicina popular, em países como Brasil e Índia, para tratar diarreia, conjuntivite, dermatites, infecções e cicatrização de feridas (OJEWOLE, 2005; COSTA *et al*., 2008; ABDELLAOUI *et al*. 2010; GOTAHNDAM, AISHWARYA & KARTHIKEYAN, 2010; BARBOZA *et al*., 2016, ARAÚJO *et al*., 2019).

Alguns estudos mostraram que o extrato de *Kalanchoe pinnata* tem atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* e *Staphylococcus aureus*, inclusive contra cepas resistentes a meticilina (SILVA *et al*. 2009; ABDELLAOUI *et al*. 2010; GOTAHNDAM, AISHWARYA & KARTHIKEYAN, 2010). Além do mais, o extrato da folha da planta não apresenta ação citotóxica e nem mutagênica (Umbuzeiro-Valent, 1999; BARBOZA *et al*., 2016). Tais características tornam a *K. pinnata* uma interessante candidata para utilizar na síntese biogênica de AgNPs. Pois, as diversas biomoléculas da planta podem atuar em sinergia com as AgNPs e melhorar a ação antibacteriana, a biocompatibilidade e conferir ademais funções devido ao recobrimento das AgNPs.

Apesar do grande interesse e volume de pesquisas sobre AgNPs biogênicas, pouco se discute sobre as condições do meio de síntese e como as mudanças neste meio influencia os parâmetros físico-químicos das nanopartículas. Fatores como concentração dos reagentes, temperatura e o pH da reação podem prejudicar ou melhorar as características das AgNPs influenciando no tamanho, distribuição, forma e grau de dispersão, afetando diretamente a qualidade da nanopartícula e sua aplicação, principalmente quando o interesse final é a sua ação antimicrobiana (VANAJA *et al*. 2013; CHITRA; ANNADURAI, 2014; VELGOSOVÁ *et al*. 2016, KUMAR *et al*. 2017; KIM *et al*. 2018; KUMAR *et al*. 2018).

O objetivo deste trabalho foi otimizar a biossíntese de AgNPs modificando os valores de pH do meio de síntese e testar diferentes concentrações finais de extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* e, finalmente, avaliar a atividade antimicrobiana das AgNPs sintetizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Foram adquiridas mudas da planta *Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers* através da floricultura SL flores e Cia, situada na cidade Terra Boa, Paraná, Brasil. As mudas foram cultivadas conforme indicação do fornecedor, em vasos em ambientes internos e protegida da luz solar direta.

As cepas utilizadas para as análises microbiológicas foram: cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), doadas pela empresa CeFar, São Paulo - SP.

Preparo do extrato de redução de *Kalanchoe pinnata*

Folhas da planta *K. pinnata*, foram lavadas com água destilada e colocadas para secar em temperatura ambiente. Quando secas, 20 g das folhas foram picadas e aquecidas em 30 mL de água ultrapura a 60 ºC por 30 minutos. O extrato foi filtrado em papel filtro com porosidade de 0,2 mm. O extrato foi armazenado a 4 ºC até o momento de uso.

Biossíntese de AgNPs

Para a síntese das AgNPs foi realizado o ajuste do pH do extrato das folhas de *K. pinnata* para os valores desejados (2, 5, 6, 7, 8, 9 e 11), para isto foi utilizado ácido clorídrico (HCl 1M) ou hidróxido de sódio (NaOH 0,1M). Também foram utilizadas diferentes concentrações de extrato, sendo estes obtidos por diluição com água ultrapura, as concentrações finais utilizadas foram 0,03; 0,06 e 0,12 $mg.mL^{-1}$. O sal $AgNO_3$ foi adicionado para obtenção de concentração final de 1 mM (VEERASAMY et. al, 2011; KRISHNARAJ et. al, 2012).

Caracterização das AgNPs

As reações foram monitoradas observando a mudança da coloração do meio de reação. Também foram analisados o espectro de absorção pelo espectrofotômetro de UV-vis (Shimadzu MultiSpec 1501) nos comprimentos entre 300 e 600 nm. A distribuição do tamanho, a polidispersão e potencial zeta das AgNPs foi analisada em ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern). O potencial zeta foi verificado pela técnica de microeletroforese em ângulo fixo de 90º. Em todas as medições, as amostram foram diluídas em água na proporção de 9:1 (água:AgNPs). Em cada experimento foram feitas três leituras e os resultados expressos pela média das leituras. Para avaliação da concentração em $NP.mL^{-1}$ foi utilizada a técnica de *Nanoparticles Tracking Analysis* (NTA - NanoSigth LM14) (ZHANG *et al*., 2016), onde as amostras foram diluídas

100 vezes e analisadas utilizando o equipamento NanoSight LM14 e analisadas no *software* NanoSight v.2.3.

Potencial antibacteriano - teste de disco-difusão

Para o teste de suscetibilidade antibacteriana foram utilizados discos de papel filtro previamente cortados em tamanho de 5 mm de diâmetro. Os discos foram colocados sobre placa de ágar pré-preparada com bactérias *S. aureus, E. Coli* e *P. aeruginosa* na concentração de 10^8 UFC.mL^{-1}. Em cada disco foram adicionados 10 µL das diferentes AgNPs sintetizadas, assim como, o extrato da planta para controle. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 ºC. Ao final das 24h os diâmetros dos halos foram mensurados em milímetros com o uso de um paquímetro. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Quantificação da expressão gênica por qPCR

Após exposição as células de linhagem HaCaT foi realizada a extração de RNA utilizando o kit *Ilustra™ RNAspin Mini RNA* (*GE-heltcare*), a seguir o RNA foi transcrito em cDNA utilizando-se o *High-Capacity RNA-to-cDNA™* Kit (*Applied Biosystems*). A quantificação de expressão foi realizada por qPCR utilizando método de *Sybr*, os genes alvos analisados foram NLRP3, NLRC4, AIM2, ASC, DNMT, MDC (CCL22), RANTES (CCl5), IL-8, TARC (CCL17) e como controle foi utilizado o gene da β-actina, os *primers* utilizados foram os descritos por Tang *et al* (2016) e Yang *et al* (2015). Os genes escolhidos para as análises estão relacionados com a resposta inflamatória da pele em concentração de 3,15 x10^9 NP.mL^{-1}.

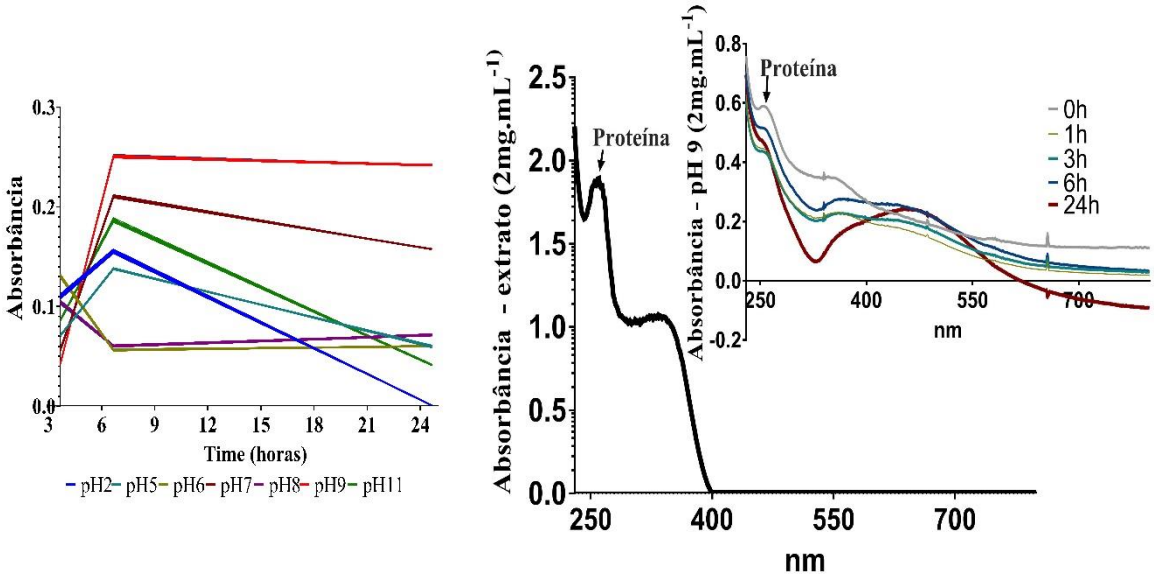
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização da síntese de AgNPs utilizando o extrato de *Kalanchoe pinnata*

Para este trabalho foi considerado como parâmetro de elegibilidade das AgNPs a sua ação antibacteriana, seguida da polidispersão (pdi), com a intenção de obter uma suspensão de nanopartículas monodispersa.

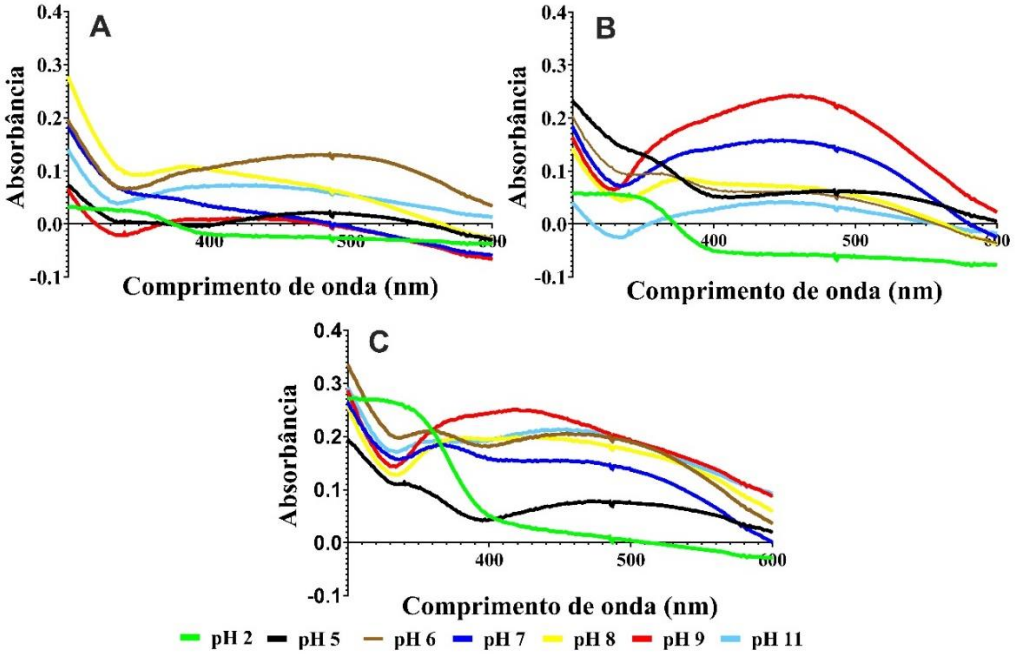
Foram sintetizadas um total de vinte e uma nanopartículas, considerando as combinações dos variados pH (2, 5, 6, 7, 8, 9 e 11) e diferentes concentrações finais do extrato de *K. pinnata* (0,03; 0,06 e 0,12 $mg.mL^{-1}$). Das 21 reações, apenas as com pH 2, independente da concentração de extrato, não apresentaram mudança na coloração da reação para tons castanhos. Bem como, não apresentaram picos de absorbância em espectrofotômetro, indicando a não houve síntese de nanopartículas. Na concentração de extrato 0,06 $mg.mL^{-1}$ foi observada alteração cinética da reação das sínteses de nanopartículas quando modificado o pH (Figura 1A). A maior biorredução ocorreu no pH 9, seguida do pH 7. A não síntese em pH ácido já foi relatada por Velosová *et al*. (2016) que obtiveram resultados parecidos em reações de síntese com pH 2. Outros trabalhos também mostraram que pH ácido a não favorece a formação de ou tem baixa produtividade (KRISHNARAJ *et al*. 2012; KUMAR *et al*. 2017).

Figura 5 – Otimização da síntese de AgNP para concentração de 0,06mg. mL^{-1} de extrato e concentração final de 1mM de $AgNO_3$. Em **A**) Evolução do tempo de síntese de AgNP utilizando diferentes pH. Em **B**) Espectro-Vis do estrado de K. pinnata e UV-Vis da síntese das nanopartículas em pH9 (0,06mg. mL^{-1} de extrato e concentração final de 1mM de $AgNO_3$).



A análise UV-Vis do extrato mostrou pico de absorbância em torno de 280 nm e 350 nm (Figura 1B). O pico de absorbância em 280 nm é observado também após a síntese das nanopartículas, sugerindo que estas substâncias possam ter sido incorporadas ao *capping* das nanopartículas. Ao final das 24 horas, todas as reações, exceto pH 2, mostraram picos de absorção de ressonância plasmônica (Figura 2) nos comprimentos de onda entre 430 a 500 nm, sendo tais padrões de leitura característico da formação de AgNPs (ANGIGOL *et al*., 2017; MALDOVAN *et al*. 2018; MUKHERJI *et al*., 2018).

Figura 6 - Resultados das leituras em espectrofotômetro de UV-vis das diferentes reações de pH e concentrações do extrato após 24h da síntese. Os gráficos mostram padrões de leitura típicos da presença de AgNPs. Imagens: A Concentração 0,03 mg.mL^{-1}; B – 0,06 mg.mL^{-1}; C – 0,12 mg.mL^{-1}.



Os valores de absorbância máximo foram diferentes em cada concentração de extrato. Na concentração de 0,03 mg.mL^{-1} (Figura 2A) o pH 6 foi o qual apresentou maior pico de absorbância em comprimento de onda de 480 nm. Já na concentração de 0,06 mg.mL^{-1} (Figura 2B) e 0,12 mg.mL^{-1} (Figura 2C), os picos estão, respectivamente, nos comprimentos de onda 450 nm e 430 nm, sendo o pH 9 o responsável pelo maior pico de absorção.

Os resultados obtidos por DLS (Tabela 1) confirmam que o valor de pH tem importante papel na formação de AgNPs. As reações com pH alcalino foram as que originaram AgNPs com homogeneidade de tamanho, com polidispersão inferior a 0,5, considerados padrões de boa qualidade (MULVANEY, 1996; KHAN *et al*., 2019). Os pH alcalinos apresentaram potencial zeta entre -20 e -30 mV, além de um rápido início de síntese. Por outro lado, as AgNPs sintetizadas em pH ácidos (pH 5 e 6), além de demorarem para iniciar o processo de síntese,

apresentaram formação de nanopartículas grandes e com polidispersão entre 0,6 a 1,0, indicando baixa qualidade das AgNPs, e potencial zeta entre -1 e -13 mV.

Tabela 1 - Resultados das caracterizações físico-químicas (tamanho em diâmetro, polidispersão e potencial zeta) das nanopartículas sintetizadas nas diferentes concentrações e pH.

	Tamanho (nm)			Polidispersão (pdi)			Potencial Zeta (mV)		
	Extrato (mg.mL-1)								
pH	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,03**	**0,06**	**0,12**
pH 2	570 ± 13	905 ± 10	408 ± 10	0,8 ± 0,01	1 ± 0,01	0,8 ± 0,01	-7,1	-1,91	-2,6
pH 5	553 ± 21	1351 ± 100	1010 ± 100	0,6 ± 0,01	0,7 ± ,0,01	1 ± 0,01	-16,8	-16,8	-13,3
pH 6	814 ± 93	676 ± 59	380 ± 13	0,8 ± 0,01	0,6 ± 0,01	0,4 ± 0,01	-21,2	-19,9	-19,7
pH 7	622± 43	550 ± 30	150 ± 4	0,5 ± 0,02	0,4 ± 0,01	0,32 ± 0,01	-22,9	-21.8	-18.9
pH 8	374 ± 30	275 ± 14	408 ± 14	0,4 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	-21,7	-21,2	-21,1
pH 9	171 ± 06	156 ± 08	248 ±08	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	-21,7	-22,6	-22.2
pH 11	109 ± 05	117± 05	372 ± 13	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	-20,9	-22,7	-23,2

Os resultados de DLS indicam que em pH 5 e concentração de 0,06 $mg.mL^{-1}$ as AgNPs tiveram tamanho de até 1351±57 nm de diâmetro, as maiores obtidas nos experimentos, e polidispersão de 0,72 ± 0,11 pdi e potencial zeta de -16,8 mV. Em experimento realizado por Velosová *et al*. (2016), observamos que os pH 4 e 6 tiveram alterações no tamanho das nanopartículas após 10 dias da síntese, ficando maiores neste período. É possível que o pH afete o recobrimento das nanopartículas, e isto pode comprometer a estabilização das AgNPs, prejudicando a sua aplicação e vida útil (KUMAR *et al* 2017; SIBIYA; MOLOTO, 2018). Outros autores também observaram que os pH ácidos formam nanopartículas maiores e com alta heterogeneidade de tamanhos e baixa estabilidade das AgNPs (SINGH; SINHA; MANDAL, 2009; CHITRA; ANNADURAI, 2014; VELGOSOVÁ *et al*. 2016; ANIGOL *et al*. 2017; KUMAR *et al*. 2017).

A partir do pH 7, os resultados em DLS, mostram a formação de nanopartículas menores e índices de polidispersão relativamente alto. Os resultados das análises em DLS para os pH 8, 9 e 11 mostram nanopartículas pequenas, quando comparadas aos pH ácidos, potencial zeta entre -20 e -30 mV e população de nanopartículas homogênea. O pH alcalino também aumentou a velocidade de síntese e o rendimento de AgNPs. Como notado em outros trabalhos, os pH alcalinos favorecem a síntese de nanopartículas altamente dispersas, pequenas e esféricas, também se nota estabilidade das partículas durante mais tempo (VEERASAMY et. al, 2011; KRISHNARAJ et. al, 2012; CHITRA; ANNARAI, 2014; KUMAR *et al*. 2017). No entanto, acima de pH 10, pode causar baixa estabilidade dos AgNPs (RAMESH; KOKILA; GEETHA,

2015). Já os pH entre 7 e 9 oferecem maior tempo de estabilidade para as AgNPs (SIBIYA; MOLOTO, 2018; NURFADHILAH *et al*. 2018).

A concentração de extrato mostrou ter influência no diâmetro das AgNPs sintetizadas. A concentração 0,12 $mg.mL^{-1}$ para os valores de pH 8, 9 e 11 formaram nanopartículas maiores que as outas concentrações, como visto nos resultados obtidos por DLS (Tabela1). O tamanho da partícula depende da proporção de íons de prata e agente estabilizador/recobrimento, com isto, é possível que a alta concentração de biomoléculas residuais no extrato comecem a ter uma interação secundária com as moléculas de recobrimento das AgNPs, assim, gerando nanopartículas maiores (TRIPATHY *et al*. 2010; AHMED *et al*. 2016; CHOUDHARY; KATARIA; SHARMA, 2018).

A alteração no pH resulta em uma mudança de carga nas biomoléculas contidas no extrato afetando sua capacidade de ligar e reduzir os cátions e ânions metálicos no decorrer da síntese. No que se refere, afetando a forma, tamanho, rendimento de nanopartículas e velocidade de síntese (MAKAROV *et al*. 2014; NURFADHILAH *et al*. 2018; SIBIYA; MOLOTO, 2018). Em pH alcalino existe uma maior disponibilidade de grupos funcionais doadores de elétrons e isso facilita que mais Ag^0 possa nuclear e posteriormente formar um grande número de nanopartículas com menor diâmetro. A utilização de extrato plantas para síntese de nanopartículas metálicas biogênica propõe a formação de um *capping* natural e não toxico, contendo entre diferentes substâncias proteínas, polifenóis, triperpenos, flavonoides, alcaloides, taninos, saponinas (SHARMA *et al*., 2009; PRASAD, 2017; QAYYUM *et al*., 2017; OVES *et al*., 2018; AZIZ *et al*., 2019; MASUM *et al*., 2019).

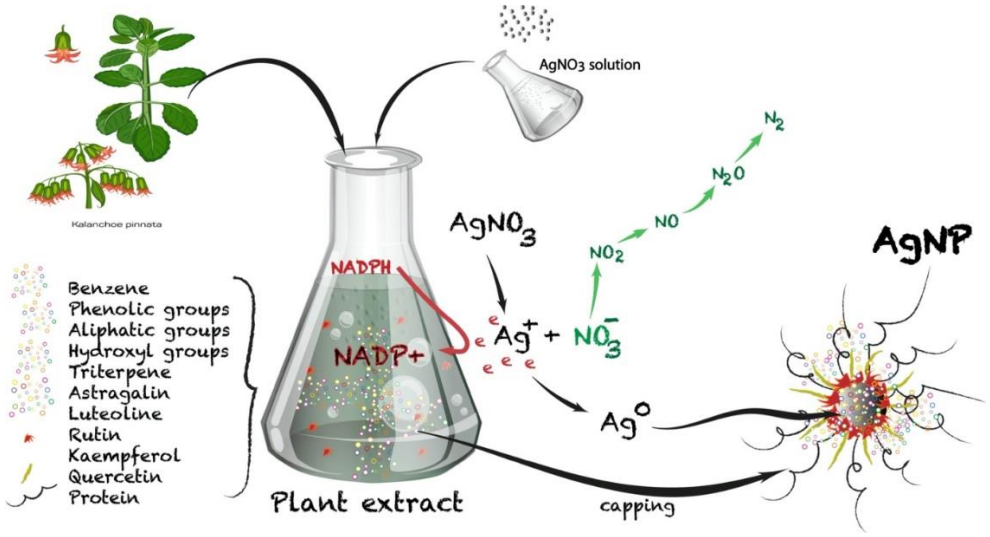
Em relação a *Kalanchoe pinnata*, estudos que avaliam seus extratos e sua capacidade bactericida mostram em meio etanólico, metanólico e aquoso apresentam diferente composição e apresentaram diferentes potenciais bactericidas (AKINSULIRE *et al*., 2007; MAJAZ *et al*., 2011; NWADINIGWE, 2011; PATTEWAR *et al*., 2013; IQBAL *et al*., 2016; LEBEDEVA *et al*., 2017). Pattewar *et al*. (2013) avaliaram o potencial bactericida de diferentes formas de extrato e verificaram que o extrato metanólico 60% das folhas foi o que apresentou melhores resultados. O estudo ainda mostrou que além de potencial bactericida os extratos apresentaram atividade fungicida.

Outros estudos descreveram diversos grupos funcionais como fenólicos, alifáticos, benzeno e hidroxilas, podendo estes serem os principais responsáveis pela redução e recobrimento das partículas (BAISHYA; SHARMA; BORA, 2012; PHATAK; HENDRE, 2015a; PHATAK; HENDRE, 2015b; AGARWAL 2019). Também há indícios de proteínas presentes no recobrimento de AgNPs, devido à presença de grupos carbonilas, os quais possuem

grande capacidade de se ligar com o metal, favorecendo a adsorção na superfície da partícula e gerando o recobrindo da nanopartícula (PHATAK; HENDRE, 2015a; PHATAK; HENDRE, 2015b)

Desta maneira a síntese biogênica de nanopartículas metálicas utilizando *K. pinnata* provavelmente ocorre por redução do sal $AgNO_3$ realizada com a ajuda de NADPH o qual forma a um cerne de prata metálica (Ag^0) e um *capping* formado pelas diferentes substâncias encontradas no extrato da planta utilizado para a síntese (Figura 3)0.

Figura 7 - Esquema da proposta de síntese biogênica utilizando K. pinnata como agente redutor e estabilizante, originando uma nanopartícula com um cerne de prata metálico e um capping formado pelas substâncias originadas do extrato.



Atividade antimicrobiana

No presente estudo, foram testadas a atividade das AgNPs biogênicas sintetizadas e os extratos da planta *K. pinnata* nos diferentes pH (2, 5, 6, 7, 8, 9 e 10). As bactérias utilizadas para o teste foi *S. aureus, E. Coli* e *P. aeruginosa*, responsáveis pela maioria das contaminações existentes que são empregadas como modelo inicial para testes de substâncias antimicrobianas.

Os resultados mostraram que praticamente todas as AgNPs sintetizadas mostram zona de inibição nos microrganismos testados (Tabela 2). As AgNPs também mostram ter maior ação inibitória quando comparados aos seus extratos redutores em seus devidos pH. Dentre todas as AgNPs sintetizadas, os pH 8 e 9 (0,06 $mg.mL^{-1}$) foram as que tiveram melhor atividade antimicrobiana. As AgNPs em pH 6 e 7 apresentaram atividade antimicrobiana moderada, com halos que variaram de 6 a 11 mm de diâmetro. Já as AgNPs sintetizadas em pH 2 e 5, não tiveram nenhuma atividade inibitória.

Há algum tempo já é conhecido que as AgNPs têm forte atividade antibacteriana contra bactérias tanto gram-negativas quanto gram-positivas, incluindo cepas multirresistentes (RAMESH; KOKILA; GEETHA, 2015; KUMAR *et al*., 2017). A atividade das nanopartículas é principalmente devido à capacidade destas se ligarem à superfície da membrana celular e perturbar a permeabilidade e as funções respiratórias da célula (DAKAL *et al*., 2016; DÚRAN *et al*., 2016; PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018; MEDICI *et al*. 2019).

Tabela 2 - Resultados das análises de disco difusão realizado com as diferentes nanopartículas sintetizadas neste estudo em diferentes valores de pH (6 a 11) e diferentes concentrações (0,03 a 0,12 mg.mL^{-1}). Os valores dos halos estão representados em milímetro do diâmetro (valores expressos em média de 3 ensaios).

AgNPs	***E. coli***			***P. aeruginosa***			***S. aureus***		
	Extrato mg.mL^{-1}								
	0,03	**0,06**	**0,12**	**0,03**	**0,06**	**0,12**	**0,03**	**0,06**	**0,12**
pH 6	10 ± 2	10 ± 2	10 ± 0	7 ± 2	9 ± 2	9 ± 2	6 ± 2	6 ± 1	6 ± 2
pH 7	10 ± 2	10 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	10 ± 0	6 ± 0	6 ± 1	6 ± 0	6 ± 0
pH 8	14 ± 1	**14 ± 2**	11 ± 1	10 ± 0	**11 ± 0**	9 ± 1	12 ± 1	**12 ± 1**	9 ± 0
pH 9	14 ± 1	**12 ± 1**	9 ± 1	14 ± 1	**14 ±** 1	9 ± 1	10 ± 1	**11 ± 1**	10 ± 1
pH 11	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	7 ± 1	8 ± 1	7 ± 1	6 ± 0
Extrato	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 0
Penicilina (300 U)		16 ± 3			17 ± 1			15 ± 2	

A hipótese sugerida para o melhor desempenho das nanopartículas sintetizadas no pH 9 se deve a sinergia do cerne metálico e o *capping* formado, sendo este mais estável e com um arranjo de componentes mais interessantes que as demais nanopartículas. Desta maneira esta nanopartícula mostrou ter melhor desempenho e características físico-química, sendo realizada a análise de NTA da mesma para obtenção da concentração de nanopartículas por mL, os resultados mostraram que a solução de nanopartículas apresentava 9 x 10^{10} NPs.mL^{-1}.

Outros trabalhos mostraram que a atividade antimicrobiana de AgNPs sintetizadas em meio alcalino tiveram melhor efeito contra bactérias gram-negativa que em gram-positivas (AJITHA; REDDY; REDDY, 2015; KUMAR *et al*. 2017; CHOUDHARY; KATARIA; SHARMA, 2018). Este fato pode ser explicado devido ao pH alcalino proporcionar a síntese de AgNPs menores, sendo estas caracterizadas por ter maior área de superfície disponível para interação, assim apresentam melhor efeito antibacteriano do que os AgNPs maiores. Também é possível que os AgNPs não apenas interajam com a superfície da membrana, mas que consigam romper a membrana, ou até mesmo possam penetrar dentro da bactéria levando a danos dos ribossomos e DNA (DÚRAN *et al*., 2016; PAREEK; GUPTA; PANWAR, 2018).

Algumas pesquisas mostram que nanopartículas sintetizadas a partir de extrato de plantas mostraram boa atividade bactericida, tanto para bactérias gram-positivas como gram-negativas, devido á sinergia apresentada pelo cerne metálico e o *capping* formado por moléculas

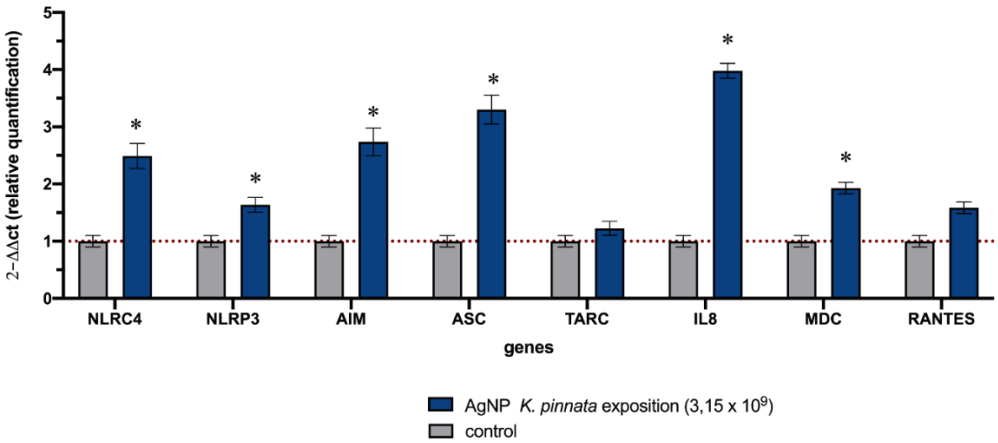
bioativas provenientes dos extratos, além de serem mais seguros por apresentarem menor toxicidade (ZHANG *et al*., 2016; AHMED *et al*., 2016).

Quantificação da expressão gênica

A expressão de genes ligados a resposta inflamatória apresentou alterações em relação ao controle (Figura 5). A expressão aumentada dos inflamossomos indica que estes foram estimulados por alguma alteração no microambiente, neste estudo é possível verificar uma resposta alterada de NLRC4, NLRP3 e AIM, também pode ser observada o aumento da expressão de ASC, o que era esperado, uma vez que, NLRP e AIM necessitam de ASC para que sejam ativados. Esta ativação leva a produção de procaspase e citocinas, em especial as quimiocinas (TARC, MDC, RANTES e IL8). Assim, foi possível observar o aumento de IL8 e MDC, o MDC pode estar ligado a tentativa de homeostase celular, pois não foi observado o aumento significativo da expressão, as quais contribuem para uma resposta inflamatória.

O aumento da expressão de IL8 é explicado devido à ativação dos inflamossomos, em especial das vias NLRP3 e AIM, pois estas levam a produção de caspase e aumento da expressão de IL-18 e IL-1β, esta última estimula a expressão de IL-8 que se encontra alterado em lesões cutâneas e atópicas. Esta alteração já foi observada por outros autores com nanopartículas de prata não biogênicas (BARANOVA *et al*., 2015; AHMED *et al*., 2017; GALBIATTI *et al*., 2018; CHEN *et al*., 2019).

Figura 8 – Resultados das análises quantitativa de expressão de genes ligados a inflamação.



De acordo com Chen *et al*. (2019) o aumento observado de IL-8 em culturas 2D de queratinócitos se deve ao estresse oxidativo ocorrido mediante a exposição as AgNPs em altas doses, porém o mesmo estudo realizado com culturas celulares 3D não mostram esta resposta, logo os autores sugerem que os estudos de exposição a AgNP devem ser avaliados utilizando

modelos epidérmicos 3D, pois estes podem fornecer melhores estimativas de condições in vivo do que 2D modelos.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que diferentes valores de pH e concentrações do extrato têm interferência direta na síntese das AgNPs biogênicas. Observamos que o pH alcalino aumenta a velocidade de redução de íons Ag^+, e isto favorece a formação imediata de núcleos (nucleação) e, consequentemente, influência a síntese de AgNPs com diâmetro menor e alto grau de homogeneidade. Outra observação é que a alta concentração do extrato da planta junto ao pH alcalino aumenta o diâmetro das AgNPs. Neste trabalho, a melhor condição de síntese foi em concentração de 0,06 $mg.mL^{-1}$ do extrato de planta e pH 9. Tais condições também melhoraram a ação antimicrobiana da AgNPs sintetizadas com *K. pinnata.*

Em comparação com os métodos químicos, os biológicos permitem maior facilidade no controle da forma, tamanho e distribuição das AgNPs através da otimização das condições de síntese. Desta foram, através de modificações no meio de síntese também podemos melhorar a ação bactericida das AgNPs. Pois, a atividade antibacteriana das AgNPs depende do tamanho, forma e concentração das partículas. Assim, as AgNPs sintetizadas em pH alcalino geram nanopartículas com melhor ação antibacteriana.

Por fim, vale ressaltar as vantagens da síntese biogênica, que possibilita o uso de um vasto recurso biológico, proporciona um menor de tempo de reação de síntese, obtenção de alta concentração de nanopartículas e estabilidade por longo prazo. Embora tenha sido observado alterações na expressão de genes de células expostas as nanopartículas existe a necessidade de maiores estudos para se avaliar a segurança da utilização delas.

REFERÊNCIAS

ABDELLAOUI, S.E. *et al*. Bioactive molecules in Kalanchoe pinnata leaves: extraction, purification, and identification. **Anal Bioanal Chem**. v. 398, p. 1329–1338, 2010.

AGARWAL; H.; SHANMUGAM, V. K. Synthesis and optimization of zinc oxide nanoparticles using Kalanchoe pinnata towards the evaluation of its anti-inflammatory activity. **J. of Drug Delivery Sci. and Tech**. v. 54, p. 1-8, 2019.

AHMED, K. B. R. *et al*. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. **Toxicology in Vitro**. v. 38, p.179-192, 2017.

AHMED, S. *et al*. Green synthesis of silver nanoparticles using Azadirachta indica aqueous leaf extract. **J. of Rad. Res. and App. Sci**. v. 9, p. 1-7, 2016.

AJITHA, B. REDDY, A.K; REDDY, P.S. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles with controlled particle size by pH variation. **Powder Tech**. v. 269, p. 110–117, 2015.

AKHTA, S. *et al*. Low-cost synthesis and characterization of silver nanoparticles for diverse sensing application. **Eng., Tech. & App. Sci. Res**. v. 9, n; 2, p. 3915-3917, 2019.

AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y. S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS sustainable Chem. and Eng.** v. 1, p. 591-602, 2013.

AKINSULIRE, O. R., I. E. *et al.* In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants Bryophyllum pinnatum and Kalanchoe crenata. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.** v. 4, n. 3, p. 338-344, 2007.

ANIGOL, L. B. *et al*. Effect of concentration and ph on the size of silver nanoparticles synthesized by green chemistry. **Organic & Med. Chem IJ.** v. 3, n. 5, 2017.

ARAÚJO, E.R.D *et al*. Local anti-inflammatory activity: topical formulation containing Kalanchoe brasiliensis and Kalanchoe pinnata leaf aqueous extract. **Biomed. & Pharm**. v. 113, p. 1-9, 2019.

AZIZ, N., *et al*. Illuminating the anticancerous efficacy of a new fungal chassis for silver nanoparticle synthesis. **Front Chem**. v. 7, p. 65-70, 2019.

BAISHYA, D; SHARMA, N.; BORA, R. Green synthesis of silver nanoparticle using Bryophyllum pinnatum (Lam.) and monitoring their antibacterial activities. **Arch. Appl. Sci. Res.** v. 4, p. 2019-2104, 2012.

BARANOVA L.A., ZHORNIK E.V., VOLOTOVSKI I.D. Influence of silver and titanium dioxide nanoparticles on the expression of genes of biomarkers of inflammatory responses and apoptosis. Biofizika. v. 60, n. 2, p. 234-41, 2015.

BARANOVA, L. A. *et al.* The influence of silver and titanium dioxide nanoparticles on the expression of genes that encode biomarkers of inflammation and apoptosis. **Biophysics**. v. 60, p. 181-187, 2015.

BARBOZA, T. J. S. *et al*. Cytotoxic, antibacterial and antibiofilm activities of aqueous extracts of leaves and flavonoids occurring in Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. **J. of Med. Plants Res**. v. 10, n. 41, p. 763-770, 2016.

BAWASKAR, M. *et al*. A new report on mycosynthesis of silver nanoparticles by fusarium culmorum. **Current Nanoscience.** v. 6, p. 376-380, 2010.

CHEN, L. *et al*. Skin Toxicity Assessment of Silver Nanoparticles in a 3D Epidermal Model Compared to 2D Keratinocytes. **Int J Nanomedicine**. v. 14, p. 9707-9719, 2019.

CHITRA. K., ANNADURAI, G. Antibacterial activity of ph-dependent biosynthesized silver nanoparticles against clinical pathogen. **BioMed Res.** Int. v. 2014, p. 1-6, 2014.

CHOUDHARY, M.K.; KATARIA J.; SHARMA, S. Evaluation of the kinetic and catalytic properties of biogenically synthesized silver nanoparticles. **J. of Cleaner Prod.**, 2018, https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.09.015.

COSTA, S. S. *et al*. Therapeutic potential of Kalanchoe species flavonoids and other secondary metabolites. **Nat. Product Comm**. v. 12, p. 2151-2164, 2008.

COUZON, N. *et al*. Photo-electrochemical behavior of silver nanoparticles inside mesoporous titania: plasmon induced charge separation effect. **Langmuir**. v. 35, n 7, p. 2517–2526, 2019.

CRUZ, B. P. *et al*. Effects of light intensity on the distribution of anthocyanins in Kalanchoe brasiliensis Camb. and Kalanchoe pinnata (Lamk.) Pers. Ann. Of the Braz. **Acad. Os Scie**. v. 84, n. 1, p. 211-217, 2012.

DAKAL, T. C. *et al*. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. **Front. Microbiol.** v. 7, n. 1831, 1-17, 2016.

ECKHARDT, S. *et al*. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. **Chem. Reviews.** v. 113, p. 4078-4754, 2013.

GALBIATTI, V. *et al.* In vitro assessment of silver nanoparticles immunotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**. v. 112, p. 363-374, 2018.

GOTHANDAM, K.M., AISHWARYA, R., KARTHIKEYAN, S. Preliminary screening of antimicrobial properties of few medicinal plants**. J of Phytology**. v. 2, n. 4, p. 1–6, 2010.

GUILGER, M. *et al*. Evaluation of silver nanoparticles: in vitro assays for cyto/genotoxicity in cell lines and ecotoxicity on zebrafish. **Int. J. of Global Adv. Materials & Nanotechnology**. v. 1, p. 31-42, 2018.

IQBAL, S. M. *et al.* Antioxidant, antibacterial and gut modulating activities of kalanchoe laciniate. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**. v. 73, n. 5, p. 1221-227, 2016.

KHAN, I; SAEED, K; KHAN, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities**. Arabian J. of Chem.**, 2017. < http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011 >

KHAN, M. J. *et al*. Rapid green synthesis and characterization of silver nanoparticles arbitrated by curcumin in an alkaline medium. **Molecules.** v. 24, n. 724, p. 1-12, 2019.

KIM, D-Y. *et al*. Green synthesis of silver nanoparticles using Laminaria japonica extract: characterization and seedling growth assessment. **J. of Cleaner Prod**. v. 172, p. 2910-2918, 2018.

KRISHNARAJ, C. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 93, p. 95–99, 2012.

KUMAR, M. *et al*. Synthesis, characterization, mechanistic studies and antimicrobial efficacy of biomolecule capped and pH modulated silver nanoparticles. **J. of Mol. Liquids**. v. 249, p. 1145–1150, 2018.

KUMAR, R. *et al*. Rapid green synthesis of silver nanoparticles (agnps) using (prunus persica) plants extract: exploring its antimicrobial and catalytic activities. **J Nanomed Nanotechnol**. v. 8, n. 4, p. 1-8, 2017.

LEBEDEVA, A. A. et al. Bactericide, Immunomodulating, and Wound Healing Properties of Transgenic Kalanchoe pinnata Synergize with Antimicrobial Peptide Cecropin P1 In Vivo. **J. Imun. Res.** v. 2017, p. 1-8, 2017.

MAJAZ, Q. *et al.* The miracle plant (Kalanchoe pinnata): a phytochemical and pharmacological review. **IJRAP**. v. 2, n. 5, p. 1478-1482, 2011.

MAKAROV, V.V. *et al*. Green nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. **Acta naturae**. v. 6, n. 20, p.35-44, 2014.

MALDOVAN, B. *et al*. Biosynthesis of silver nanoparticles using ligustrum ovalifolium fruits and their cytotoxic effects. **Nanomaterials**. v. 8, p. 627-638, 2018.

MASUM, M. M. I., *et al*. biogenic synthesis of silver nanoparticles using phyllanthus emblica fruit extract and its inhibitory action against the pathogen acidovorax oryzae strain rs-2 of rice bacterial brown stripe. **Front Microbiol.** v. 10, p. 820-825, 2019.

MAURICIO, M. D. *et al*. Nanoparticles in medicine: a focus on vascular oxidative stress. Oxidative **Med. and Cell. Longevity**, v. 2018, n. 1, p. 1-20, 2018.

MEDICI, S. *et al*. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coord. Chem. Rev**. 2014. < http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.08.002 >

MEDICI, S. *et al*. The medical uses of silver: history, myths and scientific evidence**. J. of Med. Chem**, 2019. < doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01439 >

MUHAMMAD, W. *et al*. Potential application of nanotechnology in health care: an insight. **Nanoscale Reports**. n.1, v. 2, p. 1-8, 2018.

MUKHERJI, S. *et al*. Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. **Physical Sci. Reviews**. v. 4, n. 1, p. 1-73.

MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles**. Langmuir**. v. 12, p. 788–800, 1996.

MULVANEY, P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. **Langmuir**. v. 12, p. 788-800, 1996.

NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its applications in medicine. **Med chem**, v. 2, n. 5, p. 81-89, 2015.

NURFADHILAH, M. *et al*. The role of ph in controlling size and distribution of silver nanoparticles using biosynthesis from diospyros discolor willd. (Ebenaceae). **Mat. Sci. and Eng**. v. 367, p. 1-6, 2018.

NWADINIGWE, A. O. Antimicrobial activities of methanol and aqueous extracts of the stem of Bryophyllum pinnatum Kurz (Crassulaceae). **African J. of Biotech**. v. 10, n. 72, p. 16342-16346, 2011.

OJEWOLE, J.A.O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of Bryophyllum pinnatum (Crassulaceae) leaf aqueous extract. **J. Ethnopharmacol**. v. 99, n. 1, p. 13-19, 2005.

OVES, M., *et al.* Antimicrobial and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized from the root hair extract of Phoenix dactylifera. **Mat. Sci. and Eng: C**. v. 89, p. 4429-4431, 2018.

PAREEK, V.; GUPTA, R., PANWAR, J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? **A review. Materials Science & Engineering C**. v. 90, p. 739-749, 2018.

PATTEWAR, S. V. *et al.* Formulation of herbal antibacterial cream by using extract from Kalanchoe pinnata leaves. **Res. J.of Topical and Cosmetic Sci**. v. 5, n. 1, p. 1-4, 2013.

PHATAK, R. S.; HENDRE, A. S. Green synthesis of silver nanorods using aqueous extract of kalanchoe pinnata fresh leaves and its synergistic effect with ciprofloxacin and antibiofilm activities. **Inter. J. of Phar. and Phar. Sci**. v. 8, n. 1, p. 168-174, 2015.

PHATAK, R. S.; HENDRE, A. S. Sunlight induced green synthesis of silver nanoparticles using sundried leaves extract of Kalanchoe pinnata and evaluation of its photocatalytic potential. **Der Pharmacia Lettre**. v. 7, n. 5, p. 313-324, 2015.

PRASAD, K. *et al*. Synergic bactericidal effects of reduced graphene oxide and silver nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria**. Scientific Reports**. v. 7, n. 1591, p. 1-11, 2017.

QAYYUM, S., et al. Obliteration of bacterial growth and biofilm through ROS generation by facilely synthesized green silver nanoparticles. **PLoS One**. v. 12, n. 8, 2017.

RAMESH, P. S., KOKILA, T., GEETHA, D. Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using Emblica officinalis fruit extract. **Spectrochimica Acta Part A: Mol. and Biomol. Spec**. v. 142, p. 339-343, 2015.

RHEDER, D. T. *et al*. Synthesis of biogenic silver nanoparticles using Althaea officinalis as reducing agent: evaluation of toxicity and ecotoxicity. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-12, 2018.

SHARMA, V. *et al.* Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Adv. in Colloid and Interface Sci**. v.145, n. 1-2, p. 83-96, 2009.

SIBIYA, P.N; MOLOTO, M.J. Green synthesis of ag2s nanoparticles: effect of ph and capping agent on size and shape of NPs and their antibacterial activity. **Digest J. of Nanomaterials and Biostructures**. v. 13, n. 2, p. 411-418, 2018.

SIDDIQI, K. S. *et al*. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. **J Nanobiotechnol**. v.16, n.14, p. 1-28,2018.

SILVA, J.G. *et al*. Atividade inibitória das folhas e caule de Kalanchoe brasiliensis Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. **Braz. J. of Pharmacognosy**. v. 19, n. 3, p. 790-794, 2009.

SINGH, A., DUBEY, S., DUBEY, H. K. Nanotechnology: the future engineering. **Inter. J. of Advance and Innovative Research**. v. 6, n. 2, p. 230-233, 2019.

SINGH, M; SINHA, I; MANDAL, R.K. Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles. **Materials Letters**. v. 63, p. 425-427, 2009.

SINGLA, R. *et al*. Metallic nanoparticles, toxicity issues and applications in medicine. In: YADA, S.K. Nanoscale Materials in **Targeted Drug Delivery, Theragnosis and Tissue Regeneration**. Hardcover: Springer, 2016. p. 41-80.

SWEET, H. M. *et al*. Silver nanostructures in medicine: synthesis and biological activity. In: GRUMEZESCU, A. M. **Antimicrobial Nano.: From Synthesis to App.**. Reino Unido: Elselvier, 2017. p. 358-378.

TRAIWATCHARANON, P.; TIMSORN; K.; WONGCHOOSUK, C. Effect of pH on the green synthesis of silver nanoparticles through reduction with Pistiastratiotes L. extract. **Adv. Mat. Res.**. v. 1131, p. 223-226, 2015.

TRIPATHY, A. *et al*. Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of Azadirachta indica (Neem) leaves. **J Nanopart Res**. v. 12, p. 237–246, 2010.

UMBUZEIRO-VALENT, G. *et al*. Mutagenic and antimutagenic evaluation of the juice of the leaves of bryophyllum calycinum (Kalanchoe pinnata), a plant with antihistamine activity. **Env. and Mol. Mutagenesis.** v. 33, pp. 325-327, 1999.

VANAJA, M. *et al*. Kinetic study on green synthesis of silver nanoparticles using Coleus aromaticus leaf extract. **Pelagia Res. Library**. v. 4, n. 3, p. 50-55, 2013.

VEERASAMY, R. *et al*. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **J. of Saudi Chem. Soc**. v. 15, p. 113–120, 2011.

VELOSOVÁ, O. *et al*. Influence of pH on green synthesis of Ag nanoparticles. **Materials Letters**. v. 180, p. 336-339, 2016.

ZHANG, X. *et al*. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **Int. J. of Mol. Sci**. v. 17, p. 1534-1568, 2016.

4.2 Artigo 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICA LIVRES E INCORPORADA EM HIDROGÉIS.

Resumo

As bactérias resistentes são um dos maiores desafios atuais da ciência. Neste cenário, as nanopartículas de prata (AgNPs) aparecem como alternativa a este confronto, pois possuem alta ação antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi sintetizar AgNPs biogênicas utilizando folhas da planta Kalanchoe pinnata, avaliar sua atividade antimicrobiana utilizando bactérias resistentes, verificar a citotoxicidade e genotoxicidade das nanopartículas e realizar a incorporação destas em hidrogel polimérico. As características físico-química foram avaliadas utilizando espalhamento dinâmico de luz (DLS) e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). A atividade antibacteriana realizada através de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e cinética de crescimento. Também foi verificado a capacidade das AgNPs inibir a formação de biofilme. Para avaliar a toxicidade foram utilizados ensaios de redução de tetrazolium (MTT), ensaio de vermelho neutro, ensaio cometa e teste de aberrações cromossômicas em células animais e em Allium cepa. Os resultados mostraram AgNPs apresentaram diâmetro médio 121 ± 6,5 nm e concentração de 9 × 1010 Np.mL-1. As AgNPs foram capazes inibir o crescimento das cepas resistentes em concentração a partir 0,8 × 1010 Np.mL-1 e segurar seu crescimento por um período de até 24 h. Também foi possível observar que a formação do biofilme foi interrompida. As AgNPs não mostraram citotoxicidade em células animais e foram citotóxicas apenas em concentrações acima de 4 × 1010 Np.mL-1 em células de Allium cepa. O ensaio cometa mostrou danos ao DNA a partir da concentração de 9 × 1010 Np.mL-1. As análises dos géis mostraram que a incorporação das AgNps alterou os perfis reológicos tanto para as análises em função da frequência quanto da temperatura, modificando a viscosidade e comportamento não Newtoniano do sistema. Após incorporação das nanopartículas, os géis passaram a apresentar ação antimicrobiana. Logo as AgNP sintetizada mostraram ser possíveis candidatas para utilização no auxílio ao combate de bactérias resistentes, pois mostram amplo espectro de ação antibacteriana, inclusive contra bactérias resistentes, e baixa toxicidade em células animais, sendo consideradas uma boa alternativa terapêutica no futuro.

Palavras-chaves: Bactérias resistentes. AgNPs. Biofilme. Kalanchoe pinnata. Hidrogéis.

INTRODUÇÃO

Diariamente, as pessoas são expostas a diversos microrganismos patogênicos que podem trazer complicações a saúde, entre eles o desenvolvimento de infecções graves (Sarmah et al., 2018). Atualmente, o modo mais eficaz de tratar infecções, sobretudo bacteriana, é a utilização de antibióticos. No entanto, os tratamentos com antibióticos estão mostrando não ter mais eficácia contra a maioria das bactérias, devido estas apresentarem resistência (Pereira, Pita, 2005; Ferreira et al., 2008; Aslam et al., 2018). Nos últimos anos, cada vez mais, são registradas novas bactérias resistentes, e as perspectiva para tratamento diminuem cada vez mais (Ventola et al., 2015; Michael et al., 2014; Sampaio et al., 2018). Portanto, é indiscutível encontrar novas estratégias terapêuticas para combater as bactérias resistentes (Baptista et al, 2018; Lima et al., 2019).

A nanotecnologia é uma das alternativas que podem auxiliar no enfrentamento da crise das bactérias resistentes, tendo como destaque as nanopartículas de prata (AgNPs) (Figueiras et al., 2014; Baptista et al., 2018; Lima et al., 2019). Antes dos antibióticos, a prata coloidal e o nitrato de prata eram bastante utilizados para prevenir e tratar infecções de feridas, devido a sua propriedade antimicrobiana comprovada (Klasen 2000; Lansdown 2006; Alexander 2009; Barilo, Marx, 2014; Ebrahiminezhad et al.,, 2016; Möhler et al., 2018; Medici et al.,, 2019). Quando a prata está em nanoescala suas propriedades físico-químicas são melhoradas, principalmente a sua ação antimicrobiana (Abassi et al; 2016; Alavi et al., 2019). As AgNPs já são usadas para prevenir, tratar e reduzir infecções bacterianas na pele, em queimaduras e para evitar a colonização bacteriana em dispositivos médicos e superfícies em geral (Carbone et al., 2016; Ballotin et al., 2017; Marassi et al., 2018; Wasef et al., 2019).

Desta maneira, AgNPs aparecem como uma alternativa aos antibióticos para contornar o problema das bactérias resistentes devido a seu amplo espectro de ação (Kurek et al., 2011; Okafor et al., 2013; Franci et al., 2015; Liao et al., 2019;Rolim et al., 2019). As AgNPs agem causando danos as bactérias através de vários mecanismos, entre os quais, o aumento da permeabilidade celular, oxidação de componentes celulares e proteínas, geração de espécies reativas de oxigênio, inativação de enzimas vitais e degradação de DNA (Dakal et al., 2016; Dúran et al., 2016; Pareek et al., 2018). Também, devido ao seu pequeno tamanho, as AgNPs conseguem interromper a formação de biofilme, formado quando as bactérias colonizam superfícies e sintetizam uma película de exopolissacarídeos (Mah and O’toole, 2001; Olsen, 2015; Singh et al., 2017). O biofilme serve como uma barreira para aumentar as defesas das bactérias ajudando os patógenos a evitarem a ação dos antibióticos e respostas imunológicas, o

que traz complicações para o paciente pois infecções crônicas de difícil tratamento podem ser estabelecidas (Mah; O'toole, 2001; Olsen, 2015; Singh et al., 2017; Li; Webster, 2018).

Entre diferentes sínteses de nanopartículas biogênica seria a mais indicada, devido à praticidade de produção, baixo custo e por não envolver substâncias tóxicas em seu processo de síntese (Iravani et al., 2011; Zhang et al., 2016; Paosen et al., 2019). Na síntese biogênica as proteínas, carboidratos, metabólitos secundários e os biopolímeros de plantas, bactérias ou fungos, atuam como agente redutor e estabilizante (Abdelghany et al., 2017). Este tipo de síntese também ameniza problemas em relação a aglomeração e sedimentação ao longo do tempo, que são observadas em nanopartículas de síntese química (Sevji et al., 2014; Berdou and Ferfera-Harrar, 2016; Mekkawy et al., 2017), fato que impossibilita sua ação com o tempo. Outro fato positivo da Síntese Biogênica é a baixa toxicidade observada em grande parte das nanopartículas de prata (Dúran et al., 2019).

A incorporação de nanopartículas em hidrogéis visa facilitar a utilização destas, assim como diminuir sua toxicidade. Os hidrogéis são compostos poliméricos tridimensionais que formam ligações cruzadas e absorvem uma grande quantidade de líquido. São utilizados na área médica para reparar tecidos biológicos, como a pele, também para liberação prolongada de medicamentos (Kabanov et al., 2002; Klouda and Mikos, 2008). Desta maneira, as AgNPs suspensas num substrato de suporte são impedidas de se aglomerarem e permanecem estáveis por um longo período (Mekkawy et al., 2017; Inoue et al., 2019; Tan et al., 2018; Rolim et al., 2019).

As plantas são os organismos mais utilizados para a síntese biogênica, pois tem baixo custo de cultivo, baixo tempo de síntese, possibilita sintetizar grandes volumes sendo geralmente biocompatíveis (Mohanty et al., 2012; Makarov et al., 2014; Hamidi et al., 2019). A planta *Kalanchoe pinnata* (Lam) *Pers* é bastante utilizada na medicina popular por apresentar ação anti-inflamatória, analgésica e atividade antimicrobiana (Ojewole, 2005; Costa et al., 2008; Abdellaoui et al., 2010; Gotahndam et al., 2010). As folhas de *K. pinnata* possuem substâncias químicas complexas, incluindo triterpenóides, esteróides, polifenóis e flavonóides que podem ajudar na síntese e contribuir com as características físico-químicas AgNPs (Cruz et al., 2012; Barboza et al., 2016, Araújo et al., 2019).

Neste estudo foram sintetizadas AgNPs biogênicas com extrato de *K. pinnata*, avaliadas sua atividade antimicrobiana contra bactérias resistentes, assim como, foram avaliadas sua cito e genotoxicidade. Ao final do estudo as nanopartículas foram incorporadas em matriz polimérica para facilitar sua utilização e emprego do produto final em tratamentos de ferimentos que necessitem de desinfecção imediata devido a risco de contaminação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

As mudas da planta *Kalanchoe pinnata* foram adquiridas da floricultura SL flores e Cia, da cidade Terra Boa, Paraná, Brasil. As mudas foram cultivadas conforme indicação do fornecedor, em vasos em ambientes internos e protegida da luz solar direta. As cepas de bactérias resistentes de *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, S. liquefaciens, K. pneumonie, Enterobacter clocae, Enterobacter aerogenes* foram cedidas pelo laboratório TriAnálises, na cidade de Sorocaba, todas apresentam laudos de resistência realizados através de antibiograma. As linhagens celulares (V79, HeLa, NIH-3T3 e HaCat) foram adquiridas no Banco de células do Rio de Janeiro.

Preparo extrato

Folhas da planta *K. pinnata* foram higienizadas com água destilada e deixadas para secar em temperatura ambiente. Após secagem, 20 g das folhas foram picadas e aquecidas em 30 mL de água ultrapura a 60ºC por 30 minutos. O extrato foi filtrado em papel filtro com porosidade de 0,2 mm. O extrato foi armazenado a 4 ºC até o momento da sua utilização.

Síntese de AgNPs

O extrato das folhas de *K. pinnata* foi ajustado para pH 9 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e a concentração final foi ajustada para 0,06 $mg.mL^{-1}$. Ao extrato foi adicionado $AgNO_3$ para concentração final de 1 mM. A solução foi deixada sob agitação por 24 h. A síntese foi acompanhada observando a mudança na coloração do meio de síntese ($AgNO_3$/extrato) e dos controles ($AgNO_3$ e apenas extrato). O protocolo utilizado seguiu Veerasamy et al., (2011) e Krishnaraj et al., (2012).

Preparo dos hidrogéis

Para a preparação dos hidrogéis, pesou-se massa adequada de poloxamer 407 (PL407), isolado ou em associação com poloxamer 403 (PL403), em concentrações finais de 20 % (PL407) e 18-2% (PL407-PL403). Os polímeros foram dispersos em água ultrapura, sob agitação magnética, e mantidos em banho de gelo até completa dissolução. Posteriormente, os recipientes foram acondicionados à temperatura de 8 °C por 12 h. Para ambas as composições, as nanopartículas de prata (1 $mg.mL^{-1}$) foram dispersas nos hidrogéis na razão de 1:4 (v/v) e armazenadas à temperatura ambiente até o uso.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Teste de disco-difusão

As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente pelo período de 24h. Para realização de teste de disco-difusão, os discos de papel filtro de 5 mm de diâmetro foram pré-embebidos em uma solução de AgNPs e colocados sobre uma placa de ágar já contendo as bactérias na concentração de 1 x 10^8 UFC.mL^{-1}. As placas foram incubadas a 35 ºC por 24 h. Ao final de 24 h os diâmetros dos halos foram medidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicada. Para os ensaios com o gel (AgNPs-PL) os procedimentos foram os mesmos citados acima, no entanto, os hidrogéis foram moldados em forma de disco de 9 mm de diâmetro sendo utilizados diretamente na placa.

Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração mínima bactericida (MBC)

Para determinar a eficiência antimicrobiana das AgNPs foi utilizado o ensaio Concentração Inibitória Mínima (CIM), o teste foi realizado utilizando diferentes bactérias resistentes. Em uma placa de microtitulação (placa de ELISA) foram adicionados de 5 x 10^5 UFC.mL^{-1} (conforme preconizado pela Anvisa). Foram testadas 6 diferentes concentrações de nanopartículas da prata, entre 9 x 10^8 a 4,5 x 10^{10} Np.mL^{-1}. A placas foram incubadas a 35º C por 24h, após este período, foram adicionados 10 µL de resazurina (6,75 mg.mL^{-1}) em cada um dos poços e incubado por mais 24 horas.

Para avaliar o MBC uma alíquota de cada poço foi plaqueada em placas contendo meio de cultura. Após 24 h foi observado se estas alíquotas apresentavam crescimento bacteriano. A MICcorresponde a menor concentração de AgNPs responsável por limitar o crescimento visível (atividade bacteriostática) e o MBC corresponde a concentração mínima que resulta na morte das bactérias, ou seja, concentração que as AgNPs são bactericidas.

Cinética de crescimento bacteriano

Para o ensaio foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, a qual permitiu o cultivo simultâneo e a análise do crescimento bacteriano. As concentrações testadas foram as que correspondiam a 1 vez o MIC de cada bactéria, os tempos avaliados foram 0, 3, 6, 12 e 24 horas após o início da exposição, as placas foram mantidas em uma temperatura de 35°C entre

as leituras. Para o teste, inicialmente foram inoculadas uma concentração 1×10^5 UFC.mL^{-1} de bactérias. O crescimento das bactérias foi detectado através da medição da densidade óptica (DO) pelo leitor de absorbância de microplacas em de 600 nm (Amin et al., 2009).

Ensaio de inibição de formação de biofilme

Para o ensaio de formação de biofilme a concentração bacteriana foi ajustada para 0,5 do padrão de McFarland (1 vez 10^8 UFC.mL^{-1}) e posteriormente 200 µL desta solução foi dispensado em cada poço da placa de 96 poços. As concentrações de AgNP testadas foram 0,09; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 e 0,35 $\times 10^{10}$ Np.mL^{-1}. Após exposição a placa foi incubada a 37° C por 48h. Ao final do período de incubação a suspensão bacteriana de cada poço foi removida, os poços foram lavados com 200 µL de solução salina tampão fosfato (PBS pH 7,2). Para visualização da aderência das bactérias à placa de cultura os poços foram corados com violeta de cristal (0,1%, p/v), após secagem o excesso foi retirado realizando lavagens com água ultrapura e as placas deixadas para secar em temperatura ambiente. Após secagem a cada poço foram adicionados etanol 95% e as placas foram lidas em leitor de microplacas a 590 nm. O valor da densidade óptica dos tratamentos foi considerado como a formação de biofilme na superfície da placa de cultura. A análise foi realizada em triplicata (Goswami et al., 2015).

Avaliação de toxicidade das nanopartículas

Viabilidade celular por MTT e Vermelho neutro

Para os ensaios de viabilidade MTT e Vermelho Neutro, foram plaqueadas 5 x10^5 células por mL em placa de 96 poços, após 24h já com as células aderidas foi realizada a exposição às AgNPs por um período de 24h. Ao final do período de exposição o meio de cultura foi removido e em cada poço foram adicionados 100 µL de solução de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium Bromide) a 5 mg.mL^{-1} ou Vermelho Neutro a 40 µg mL^{-1} em PBS. As placas foram deixadas pelo período de 4 h na estufa a 37°C, a seguir os corantes foram retirados e foram adicionados 100 µL de uma solução composta de 50% etanol, 49% água destilada e 1% ácido acético glacial por poço. A leitura foi realizada utilizando equipamento de leitura de microplacas à 540 nm. Com os valores obtidos foi calculado a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (considerado 100%).

$$Viabilidade\ Celular = Absorbância \frac{Tratamento}{Controle} X\ 100$$

Ensaio de genotoxicidade utilizando análise cometa

As células das linhagens V79 e HaCaT foram expostas por cerca de uma hora as AgNP nas concentrações de $9x10^9$, $4,5x10^9$ e $9x10^8$ $Np.mL^{-1}$. Após exposição das células uma suspensão celular (20 µL) foi homogeneizada em 120 µL de agarose baixo ponto de fusão (LMP) 0,8% e aplicadas em lâminas pré-gelificadas com 1,5% de agarose. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em solução de lise (1mL Triton-X + 10mL DMSO + 89 mL de solução: 2,5M NaCl; 100mM EDTA; 10mM Tris; 8g NaOH; 1% Na lauryl sarcosinato; pH 10), e deixadas por 40 min. Ao final da lise celular, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese e cobertas com tampão alcalino (30 mL NaOH 10N + 5 mL EDTA 200mM, pH 10 + 965 mL H_2O), seguida de eletroforese a 1,16V/cm por 20 min. Ao final da eletroforese foi realizado a neutralização em solução Tris 0,4M pH 7,5 e fixação em etanol. As laminas foram coradas com nitrato de prata e as análises realizadas em microscópio óptico. Para a leitura os parâmetros utilizados foram os proposto por Olive e Banáth (2006), onde os níveis de danos são classificados de 0 a 4. O índice de danos relativo foi calculado com base no valor do tratamento controle/negativo. Para a determinação do Índice de danos (ID) foi utilizada a equação abaixo:

$$ID = \frac{Valor\ de\ Score\ de\ células\ por\ categoria}{Total\ de\ células\ analisadas}$$

Ensaio de aberrações cromossômica em raízes de *Allium cepa*

Raízes de *Allium cepa* com 2 cm foram expostas as AgNp nas concentrações de 9×10^{10}, $4,5x10^{10}$, $2,210^{10}$, 0, $9x10^{10}$, $0,45x10^{10}$, $0,09x10^{10}$ $Np.mL^{-1}$ pelo período de 24 h. A seguir foram fixadas em Metanol: Ácido Acético (3:1) e submetidas a hipotonia ácida com HCl 1M. Após hipotonia as raízes foram coradas em reativo de Schiff, seguido de montagem das lâminas pela técnica de esmagamento onde uma gota de Carmim Acético foi utilizada. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com objetiva 20X, observando divisões celulares para calcular o Índice Mitótico, bem como observar aberrações cromossômicas, como a presença de cromossomos retardatários, pontes, micronúcleos entre outras. Os resultados do *Allium cepa* foram usados para calcular o Índice de Aberrações Cromossômicas, Índice Mitótico Relativo e Índice Relativo de Aberrações Cromossômicas.

Análise reológica: influência da composição na temperatura de transição sol-gel (Tsol-gel) e nos parâmetros reológicos

Para a caracterização estrutural de hidrogéis a base de PL uma das técnicas mais empregadas é a análise reológica, que estuda a deformação da matéria sob a influência de uma tensão. Os estudos reológicos permitem determinar a temperatura de transição sol-gel (Tsol-gel) dos sistemas, uma vez que os polímeros utilizados como bases para os hidrogéis, apresentam propriedades termsensíveis, fase em que ocorre uma transformação significativa nas propriedades reológicas das amostras, isto é, a temperatura relativa a maior variação entre os parâmetros elástico (G') e viscoso (G"), é acompanhada de uma variação pronunciada na viscosidade do sistema (Shriky et al., 2020).

A temperatura de transição sol-gel (Tsol-gel) foi determinada por análise reológica, sendo este ensaio essencial para caracterizar os sistemas e verificar a compatibilidade entre PL 407 isolado ou em associação com PL 403 (na presença ou ausência de AgNps). Para a execução dos ensaios foi utilizado um reômetro oscilatório com geometria do tipo cone-placa (Kinexus Lab., Malvern Instruments, localizado no Laboratório de Prospecção e Caracterização de Bioativos, Lab 503-3, UFABC, Santo André). As análises foram realizadas na faixa de temperatura de 0 °C a 50 °C, com variação de frequência (0,1 a 10 Hz) e, posteriormente, à frequência fixa de 1 Hz e temperatura de 37 °C, permitindo a obtenção de parâmetros relacionados ao módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G''). A temperatura onde foi observada a maior variação entre os parâmetros G' e G", foi considerada como a Tsol-gel (Akkari et al., 2016).

Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

A contagem de UFC foi adaptada de Alcantâra *et al.*, 2019. As cepas de *E. Coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e as cepas multirresistentes *P. aeruginosa, S. aureus, E. coli, K. pneumoniae, Serratia liquefaciens, Enterobacter cloacae e Enterobacter aerogenes* foram utilizados para avaliar o potencial antimicrobiano o hidrogel de poloxamer com AgNPs (AgNPs-PL). As colônias foram suspensas em meio nutriente até concentração de 1×10^5 $UFC.mL^{-1}$. Em seguida, 0,1 mL da suspensão de cada conjunto de bactérias foi colocado em 0,1 mL de hidrogel e espalhado em placas de ágar, que foram mantidas a 35 ° C por 24 h. Foram contadas o número de colônias formadas em cada tratamento.

Análises estatística

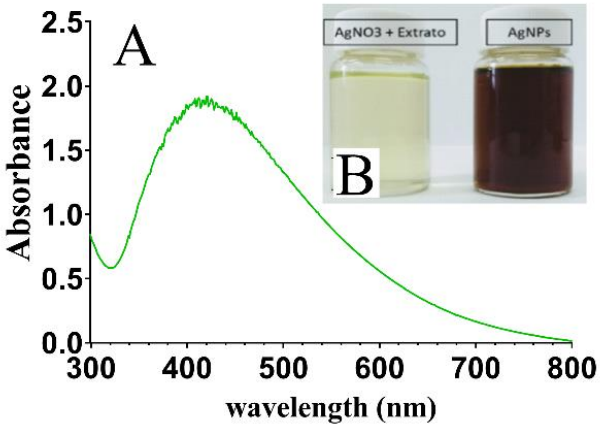
As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 7 utilizando análise de variância (one-way, anova com teste posterior de Tukey-Kramer), e foram consideradas diferenças significantes com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Síntese e Caracterização das nanopartículas

A redução de Ag^+ para Ag^0 foi indicada pela mudança de cor do meio de reação para castanho (Figura 1B) e pelos resultados de espectrofotômetro UV-Vis, que exibiram um espectro de ressonância plasmônica de superfície (SRP) variando de 430 a 460 nm de banda de absorção (Figura 1A). O DLS indicou síntese de nanopartículas de tamanho 179 ± 15 nm e índice de polidispersidade de 0,2 ± 0,1. Em relação ao potencial zeta este permaneceu em -23 mV. As análises de rastreamento de nanopartículas (NTA) mostraram nanopartículas de tamanho entre 121 ± 7 nm e a concentração de síntese igual a 9×10^{10} $Np.mL^{-1}$.

Figura 9 – (A) Leitura em UV-Vis mostra um pico de absorbância no comprimento de onda entre 430-450 nm, indicando a formação de AgNPs; (B) Foto do meio de reação ao iniciar a síntese ($AgNO_3$ + Extrato) e ao final da síntese (AgNPs), demonstrando a cor característica da formação de AgNPs.



Atividade bactericida das AgNPs

As AgNP apresentaram atividade bactericida, na concentração de $4,5 \times 10^{10}$ $Np.mL^{-1}$, contra dezessete diferentes bactérias resistentes provenientes de isolados clínicos (Tabela 1), gerando zona inibitória entre 10 mm a 15 mm de diâmetro. O extrato de *K. pinnata* (pH 9) foi utilizado como controle e não apresentou zona de inibição. O tratamento com o controle positivo (penicilina) não apresentou efeito inibitório sobre as bactérias resistentes *P.*

aeruginosa, E. coli, K. pneumoniae, Serratia liquefaciens, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes. Os resultados de difusão em ágar mostraram que as AgNPs sintetizadas com *K. pinnata* apresentaram maiores halos contra bactérias gram-negativas. A atividade antimicrobiana das AgNPs também foi avaliada em diferentes concentrações, mostrando existir forte atividade antimicrobiana dependente da dose contra os microrganismos de teste (Tabela 1).

Não foram observadas atividade antimicrobiana (MIC e MBC) do extrato de *K. pinnata* na concentração de 0,06 $mg.mL^{-1}$. Os valores de MIC ficaram em torno de 2,0 x 10^{10} $Np.mL^{-1}$, sendo apenas as *P. aeruginosa* 7.5 e 7.11 mais sensíveis apresentando MIC em 0,9 x 10^{10} $Np.mL^{-1}$. Porém as análises de MBC mostraram inibição de crescimento a 3,0 × 10^{10} $Np.mL^{-1}$ para a maioria das bactérias e 2,0 × 10^{10} $Np.mL^{-1}$ para *P. aeruginosa* 7.5 e 7.11.

Tabela 1 – Resultados dos ensaios de disco-difusão e concentração mínima inibitória.

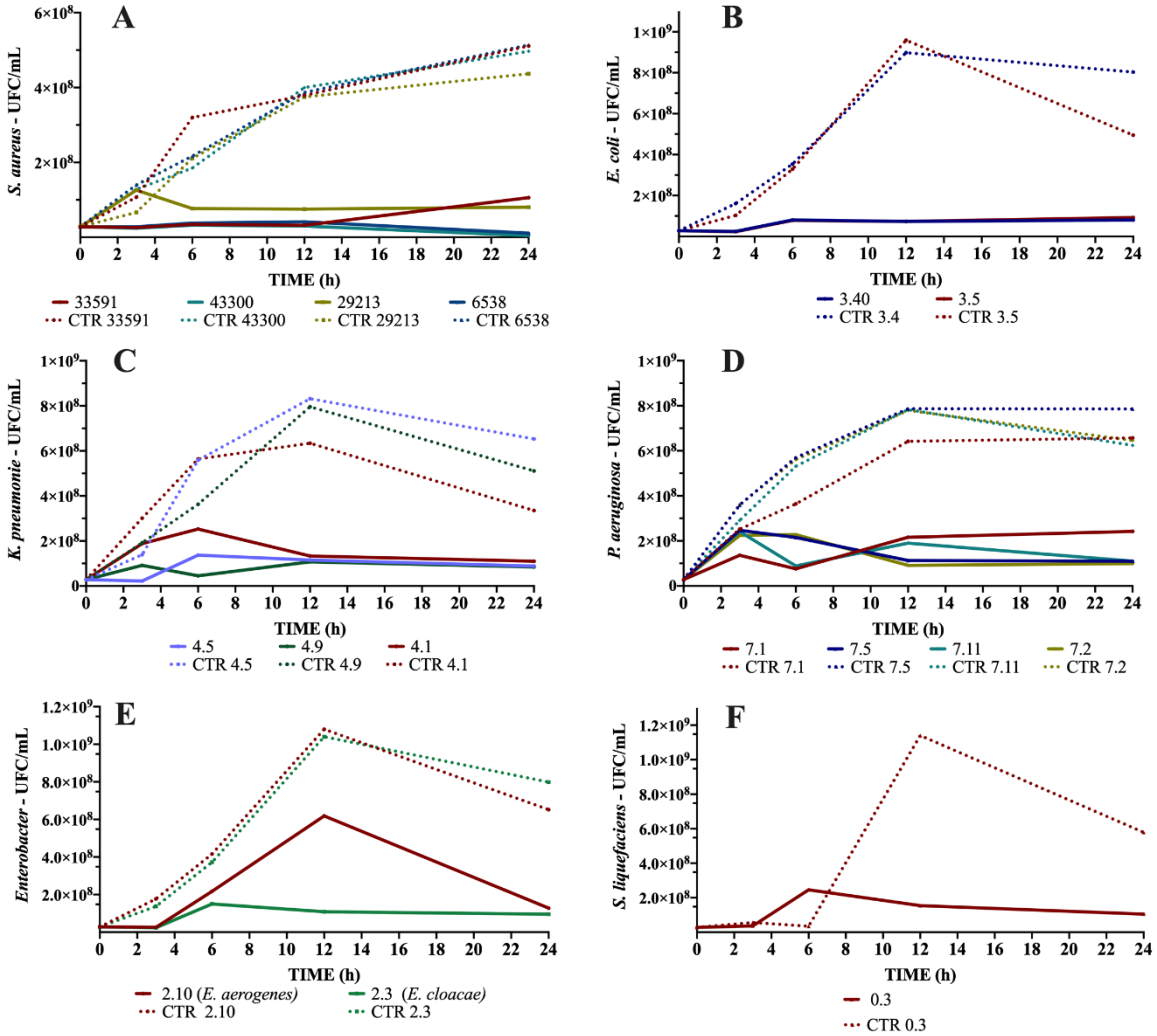
Cepa	Código	Disco-difusão Zona de inibição (mm)		MIC ($Np.mL^{-1}$)	CBM ($Np.mL^{-1}$)
		AgNPs	**Penicilina**		
P. aeruginosa	7.2	12	7	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	7.5	12	7	0,9 x 10^{10}	2,0 x 10^{10}
	7.8	11	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	7.11	13	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	15442 ATCC	13	16	0,9 x 10^{10}	2,0 x 10^{10}
S. aureus	14458	11	20	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	43300	10	15	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	6538	12	17	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	33591	10	20	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	29213	9	21	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	25923 ATCC	12	20	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
E. coli	3.05	14	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	3.40	12	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	25922 ATCC	15	16	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
K. pneumoniae	4.5	10	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	4.1	11	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
	4.9	10	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
Serratia liquefaciens	0.3	12	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
Enterobacter cloacae	2.3	13	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}
Enterobacter aerogenes	2.10	13	-	2,0 x 10^{10}	3,0 x 10^{10}

O resultado da cinética de crescimento mostrou que as AgNPs exerceram atividade bactericida gradual nas diferentes bactérias, melhores resultados foram obtidos após 6h de exposição (Figura 2). Embora cada bactéria tenha apresentado resposta diferenciada às AgNP, é possível observar que ao final de 24 h o crescimento foi inibido em todas as bactérias.

As *S. aureus* tratadas com as nanopartículas (Figura 2A) diminuíram em até 60% do crescimento ao final de 24 h. As *E. coli 3.5* (Figura 2B) não apresentaram crescimento ao logo do período de 24h, resultados semelhantes foram obtidos com a *K. pneumonie* (Figura 2C) que

até 12 horas de exposição os controles apresentaram grande crescimento bacteriano, já os tratamentos com as AgNPS o crescimento ocorreu deforma leva até as 6 h de exposição e após 12 h foi possível observar que não ocorreu o crescimento das bactérias. Nas cepas de *P. aeruginosa* (Figura 2D) foi notado um crescimento exponencial nos tratamentos com AgNPs até 3 h após o início do experimento, porém após este tempo foi possível observar que as AgNPs seguraram o crescimento das bactérias. No entanto, a cepa denominada *7.1* foi observado um aumento na quantidade de bactérias até as 12 h, mas esta quantidade decaiu ao logo do tempo. A cepa de *Enterobacter aerogenes 2.10* (Figura 2E) apresentou crescimento alto, porém não igual ao controle. Por outro lado, as bactérias *Enterobacter cloacae* (Figura 2E) e *S. liquefacieins* (Figura 2F) apresentaram melhor efeito, não permitindo crescimento das bactérias expostas em todo período do experimento.

Figura 10 - Cinética de crescimento bacteriano ao longo do tempo em exposição a AgNP biogênicas na concentração de 1 vez o MIC de cada bactéria. Os controles estão marcados com linhas tracejadas. (A) cepas de S. aureus; (B) cepas de E. coli; (C) cepas de K. pneumonie; (D) cepas de P. aeruginosa; (E) cepas de Enterbacter; (F) S. liquefaciens



O ensaio de biofilme mostrou que houve uma redução relevante na ligação microbiana à superfície como aumento da concentração de AgNPs. A densidade e agregação celular quando as bactérias foram expostas foi visivelmente menor que o controle (Figura 3). Os resultados do ensaio mostram que todas as concentrações testadas foram capazes de inibir, pelo menos em parte, a formação de biofilme pelas bactérias. A exposição das AgNPs após 24 horas em *S. aureus* resultou na diminuição da formação de biofilme a partir da concentração de 0,2 $\times 10^{10}$ Np.mL^{-1}, chagando a inibir cerca de 90% em concentrações mais altas. No entanto, a eficácia das AgNPs mostrou ser diferente quando comparamos as diferentes cepas testadas. No caso da *E. coli* (3.5) a maior concentração de exposição de AgNPs (0,35 $\times$ 10^{10} Np.mL^{-1}) apresentou a diminuição de apenas 38% do biofilme. Nas demais bactérias, a porcentagem de diminuição ficou entre 70% a 85% para a concentração de 0,35 $\times$ 10^{10} Np.mL^{-1}.

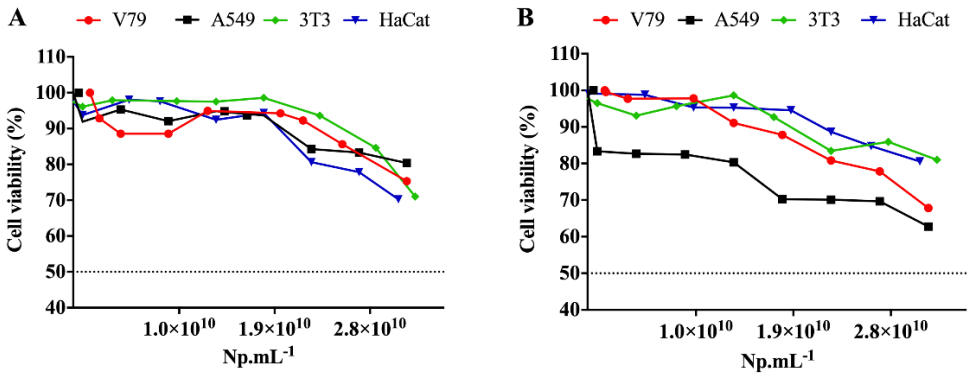
Figura 11 – Resultados da Inibição da formação de biofilme expostos a diferentes concentrações de nanopartículas, nos quadrados a porcentagem de biofilme encontrado após exposição.

	0.35 NPs.mL^{-1}	0.30 NPs.mL^{-1}	0.25 NPs.mL^{-1}	0.20 NPs.mL^{-1}	0.15 NPs.mL^{-1}	0.09 NPs.mL^{-1}	CTR 0 NPs.mL^{-1}
K. p (4.5)	15	23	31	56	64	70	100
K. p (4.1)	30	38	50	48	57	63	100
K. p (4.9)	29	27	42	63	66	75	100
E. clo (2.3)	12	31	31	43	51	65	100
E. a (2.10)	23	23	26	48	77	74	100
S. l (0.3)	29	24	27	53	68	74	100
E. coli (3.40)	20	28	32	44	47	61	100
E. coli (3.5)	35	38	57	62	67	65	100
P. a (7.1)	18	24	22	54	72	82	100
P. a (7.2)	18	25	32	53	66	76	100
P. a (7.11)	24	36	53	74	89	91	100
P. a (7.5)	19	23	42	57	71	81	100
S. a (3.3)	13	21	32	41	63	92	100
S. a (4.3)	8	19	37	51	76	80	100
S. a (2.9)	7	27	58	56	59	73	100
S. a (1.4)	23	26	41	53	91	92	100
S. a (6.5)	11	17	32	41	50	67	100

Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e genotoxicidade das AgNPs

A avaliação de citotoxicidade in vitro mostrou que nenhuma das concentrações de exposição das AgNPs realizadas chegou a apresentar inibição de 50% da viabilidade (IC_{50}). Estes resultados mostraram que as nanopartículas não são citotóxicas, havendo viabilidade das células acima de 70% pelo ensaio de redução do MTT e 65% pelo ensaio do VN até a maior concentração testada de $3{,}15 \times 10^{10}$ Np.mL^{-1} (Figura 4). A célula A549 pelo ensaio do VN foi a qual teve menor número de células viáveis seguida da V79.

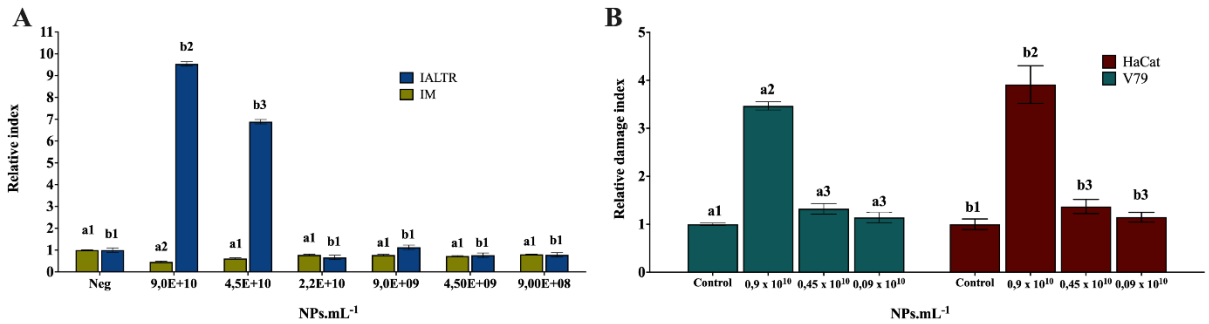
Figura 12 – Resultados de viabilidade celular. Na figura (A) resultados da avaliação por MTT e em (B) resultados da avaliação por Vermelho neutro.



Os resultados dos ensaios de genotoxicidade realizados por análise Cometa (Figura 4A) indicam que os danos encontrados foram significativos para a concentração de $0{,}9 \times 10^{10}$ Np.mL^{-1} em linhagens V79 e HaCaT ($p<0{,}05$).

Os resultados de *Allium cepa* (Figura 5B) mostraram que os índices mitóticos relativos foram inferiores nas raízes expostas as AgNPs para a maior concentração 9×10^{10} Np.mL^{-1}, sendo as demais exposições semelhantes ao controle. Em relação ao índice de danos foi possível observar que as raízes expostas apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, sendo a exposição na concentração 9×10^{10} Np.mL^{-1} a que apresentou maiores índices de danos.

Figura 13 – Em **A**) Resultados dos índices relativos do ensaio cometa em diferentes linhagens. As letras a e b indicam comparação do controle com a exposição em linhagens. Em **B**) Resultados obtidos no ensaio com raízes de Allium cepa. As letras a e b indicam comparação das raízes expostas com o controle.

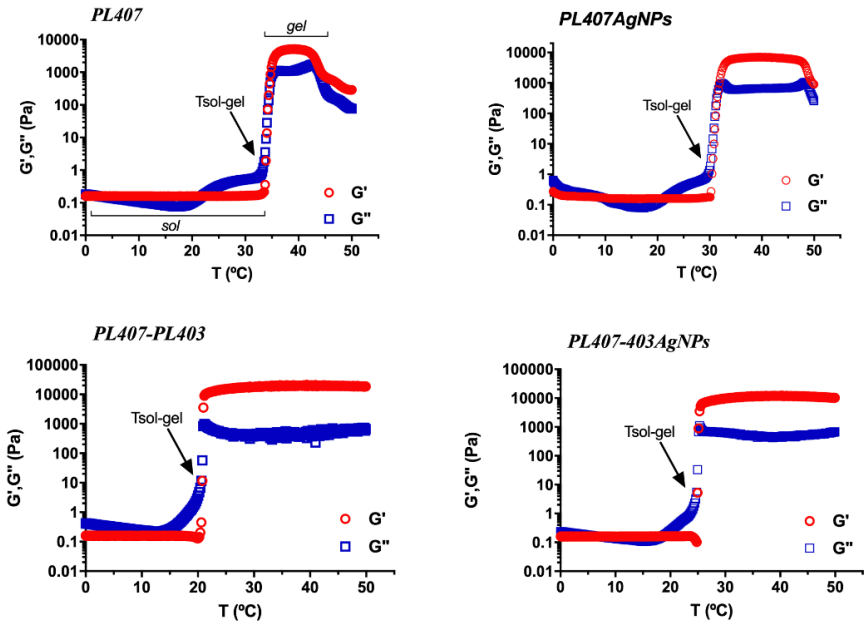


Análises reológicas e atividade antimicrobiana dos hidrogéis de poloxâmeros (PL)

Os resultados mostram que em 37 ºC (temperatura corporal), as formulações apresentaram-se estruturalmente líquido-viscosas, sendo obtidos valores maiores para o módulo elástico (G'), quando comparados ao módulo viscoso (G"), conforme apresentado na Tabela 3.

A Figura 6 apresenta os reogramas em função da temperatura para os sistemas antes e após a adição de AgNps. Os hidrogéis de PL407 isolado ou em sistema binário com PL403, mostraram comportamentos viscoelásticos, sempre predominando o módulo elástico (G') sobre o módulo viscoso (G"), com valores de G'>G" em até 2.10^4 x (Tabela 3). O módulo viscoso (G") apresentou perfil instável, onde essa oscilação parece ser reduzida com a inserção do copolímero PL 403 (2%) na formulação, um polímero mais hidrofóbico em relação ao PL407 (valores de HLB 8 e 22, para PL403 e PL407, respectivamente), o que aumenta a capacidade de estruturação do sistema. Com relação à viscosidade, as formulações mostraram valores constantes até a temperatura de aproximadamente 20 ºC, elevando a partir deste ponto até a fase de transição sol-gel, que ocorreu entre 21 e 34 ºC, mantendo-se regular até a máxima temperatura avaliada (50 °C), mesmo após a incorporação das AgNps.

Figura 14 - Análises reológicas em função da variação de temperatura para os hidrogéis a base de PL407, isolado ou em associação com PL403, antes e após a incorporação de nanopartículas de prata. As setas indicam a temperatura de transição so0l-gel (Tsol-gel) (n=3/amostra).



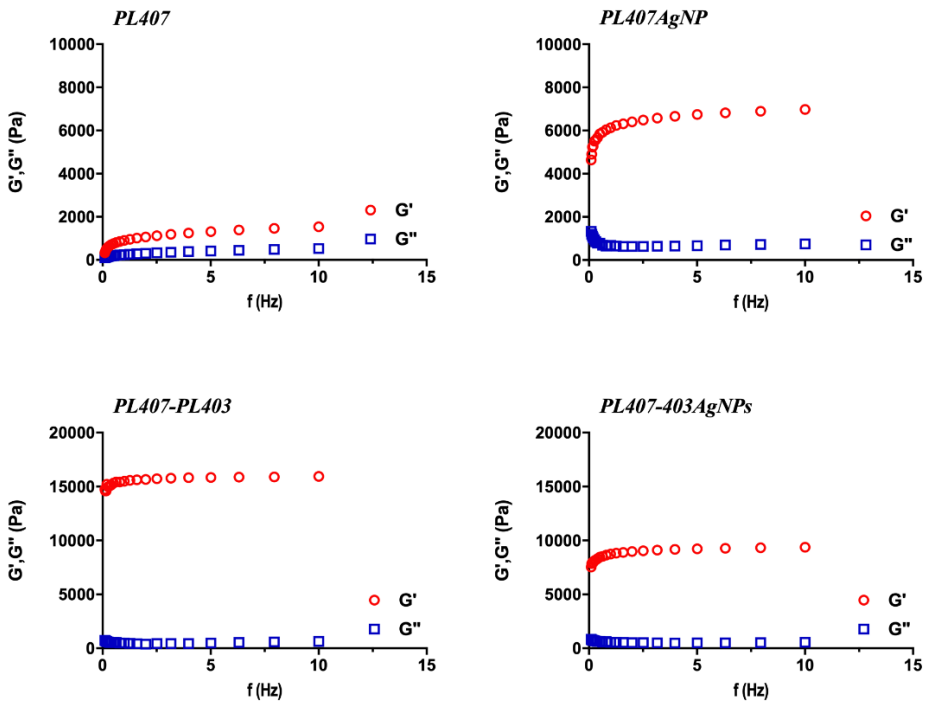
De forma diferencial, a incorporação das AgNps nos hidrogéis também alterou os perfis reológicos para as análises em função da frequência (Figuras 6). Com a inserção das AgNps

nos hidrogéis, o comportamento reológico tende a alterar, para ambos os sistemas, modificando o comportamento de não-Newtoniano (acima da temperatura de gelificação) para Newtoniano constante, resultando também em aumento nos valores de viscosidade (Figura 7), tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros reológicos obtidos para os hidrogéis a base de PL407, isolado ou em associação com PL403, antes e após a incorporação de nanopartículas de prata

GEL	G' (Pa)	G" (Pa)	G'/G"	Tsol-gel (°C)	η* (25°C, mPa.s)	η* (x10^2, 37°C, mPa.s)
PL407	726100	70,3	1032	34,2	577	760200
PL407-403	353300	829,2	427	21,0	2444	3230000
PL407AgNps	1769000	84,7	20885	31,1	68,7	1088000
PL407403AgNps	8845000	693,8	12748	25,1	178900	1897000

Figura 15 - Análises reológicas em função da variação de frequência para os hidrogéis a base de PL407, isolado ou em associação com PL403, antes e após a incorporação de nanopartículas de prata. A- PL407; B- PL407AgNps; C-PL407-PL403; D-PL407-403AgNps (n=3/amostra)



Atividade antimicrobiana dos Hidrogéis

Os resultados obtidos pelo método de diluição em caldo para testes de atividade microbiana dos hidrogéis de PL407AgNPs e PL 407/403AgNPs indicaram que as amostras testadas apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e S. aureus (ATCC 25923), assim como para as bactérias resistentes *P. aeruginosa (7.2), P. aeruginosa (7.5), P. aeruginosa (7.8), P. aeruginosa (7.11), S. aureus – 14458, S. aureus (43300), S. aureus (6538), S. aureus (33591), S. aureus (29213), E. coli*

(3.05), E. coli (3.40), K. pneumoniae (4.5), K. pneumoniae (4.1), K. pneumoniae (4.9), Serratia liquefaciens (0.3), Enterobacter cloacae (2.3), Enterobacter aerogenes (2.10). Os resultados de atividade dos hidrogéis de PL407AgNPs e PL407/403AgNPs indicam que estes têm atividade antibacteriana contra as bactérias testadas (Tabela 4). Os hidrogéis conseguiram inibir, mais que 50% do crescimento das bactérias em 24 horas de incubação na maioria das bactérias testadas.

Tabela 4 - Resultados dos ensaios diluição em caldo e de disco-difusão dos géis contendo AgNPs.

Cepa	Código	Disco-difusão Zona de inibição (mm)		Índice relativo de UFC.mL^{-1}	
		PL407AgNPs	**PL407/403AgNPs**	**PL407AgNPs**	**PL407/403AgNPs**
P. aeruginosa	7.2	14 ± 0	11 ± 0	0,42	0,50
	7.5	12 ± 1	10 ± 1	0,48	0,17
	7.8	10± 1	10± 1	0,52	0,56
	7.11	13 ± 1	10 ± 1	0,34	0,32
	15442 ATCC	11 ± 1	11 ± 1	0,42	0,40
S. aureus	14458	9 ± 1	9 ± 1	0,34	0,31
	43300	10 ± 1	9 ± 1	0,37	0,45
	6538	11 ± 1	9 ± 1	0,46	0,56
	33591	10 ± 1	10 ± 1	0,48	0,38
	29213	12 ± 1	10 ± 1	0,37	0,48
	25923 ATCC	11 ± 1	9 ± 1	0,59	0,53
E. coli	3.05	11 ± 1	11 ± 1	0,56	0,70
	3.40	10 ± 1	11 ± 1	0,52	0,58
	25922 ATCC	10 ± 1	11 ± 1	0,34	0,26
K. pneumoniae	4.5	10 ± 1	11 ± 1	0,54	0,61
	4.1	11 ± 1	10 ± 1	0,45	0,40
	4.9	10 ± 1	9 ± 1	0,45	0,58
Serratia liquefaciens	0.3	10 ± 1	11 ± 1	0,63	0,83
Enterobacter cloacae	2.3	10 ± 1	9 ± 1	0,43	0,54
Enterobacter aerogenes	2.10	12 ± 1	10 ± 1	0,55	0,43

Discussão

Os resultados aqui apresentados mostram que o extrato da planta *K. pinnata* adicionado ao nitrato de prata possibilita a formação de AgNPs, a qual foi confirmada por meio de espectrofotometria UV-vis. A concentração de 0,06 mg.mL^{-1} de extrato em pH 9 foram selecionadas devido a estudos anteriores do grupo mostrarem que tais condições favorece a síntese de AgNPs, assim como e têm papel importante na reação, influenciando nas características físico-químicas das partículas, outros autores também observaram esta influência de pH (Singh et al., 2009; Choudhary et al., 2018; Goyal et al., 2018; Kumar et al., 2018; Nurfadhilah et al., 2018; Masum et al., 2019), da mesma forma, existem relatos de que

o pH alcalino resulta no aumento da velocidade de redução dos Ag^+ para Ag^0, o que propicia AgNPs menores, homogeneidade de tamanho e alta concentração de AgNPs (Singh et al., 2009; Chitra and Annadurai, 2014; Velgosavá et al., 2016; Anigol et al., 2017; Sibiya and Moloto, 2018).

O PDI próximo a 0,1 é indicativo de distribuição homogênea (Ahmed et al., 2017). O potencial zeta com valor alto (-23 mV) sugere que exista repulsão entre as partículas e que estas estão dispersão no meio (Phatak and Hendre, 2016; Fatima et al., 2020), embora em relação as nanopartículas biogênicas exista indicativo de que a presença do capping leve a não aglomeração (Ahmad, et al. 2016).

Os resultados da atividade antibacteriana mostraram que as AgNPs sintetizadas com *K. pinnata* apresentaram ação antibacteriana eficaz contra as cepas resistentes de *P. aeruginosa, E. coli, K. pneumoniae, Serratia liquefaciens, Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes*, com zona de inibição entre 10 mm e 15 mm. Os resultados mostraram também que as AgNPs sintetizadas com *K. pinnata* apresentaram melhor atividade contra bactérias gram-negativas, onde as AgNPs conseguem inibir o crescimento das bactérias a partir da concentração de $0,9 \times 10^{10}$ $Np.mL^{-1}$, com diferentes valores para cada cepa ou espécie de bactéria. O fato de as AgNPs apresentarem concentrações inibitórias e bactericidas diferentes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, pode ser devido as diferenças na estrutura celular das bactérias (Phatak and Hendre, 2016; Quinteros et al., 2018).

A rápida reprodução das bactérias é uma das principais preocupações em relação a capacidade de infecção (Lara et al., 2010). Sabemos que o crescimento bacteriano é dividido em quatro fases: fase Lag onde há intensa atividade metabólica, sem divisão celular; fase logarítmica, onde células e massa celular dobram a uma taxa constante e rápida; fase estacionária, algumas células estão morrendo e outras ainda se dividindo, não há aumento ou diminuição no número de células; fase de declínio onde ocorre a morte de bactérias de forma exponencial (Kora et al., 2018). Em geral, as AgNPs conseguiram adiar a fase Log em todos as exposições realizadas, inibindo o crescimento das bacterias. Os resultados indicam que quando se trata de AgNPs para tratamento de infecções, pode-se pensar em uma única dose de tratamento ou então em períodos maiores de reaplicação do que dos antibióticos. Isto provavelmente ocorre porque as nanopartículas metálicas não são metabolizadas, não existindo necessidade de reposição de dose (Ma et al., 2017; Agrawal and Kulkarni, 2018; Rahman et al., 2019).

Em relação a contenção de formação de biofilme, uma possível explicação para o ocorrido seria o fato de que as AgNPs, além de inibir o crescimento bacteriano, também

apresentaram a capacidade de impedir a síntese de exopolissacarídeos, desta forma, as AgNPs impedem a formação de biofilme (Zhang et al., 2017; Galvez, et. al, 2019). A formação de biofilme desempenha um papel vital na virulência de bactérias patogênicas, através de vários mecanismos, como aumento do potencial de sobrevivência em condições inadequadas como pouca disponibilidade de nutrientes, desenvolvimento de resistência a antibacterianos e estímulo a colonização do hospedeiro (Masum et al., 2019). Portanto, os biofilmes são estruturas que dificultam o tratamento de feridas e pode ajudar as bactérias a aumentar a sua tolerância a agentes antimicrobianos (Gilbert et al., 2002; Flemming et al.,2016).

Estudo realizado por Kalishwaralal et al. (2010), utilizando concentrações de AgNPs abaixo do valor inibitório, em *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, mostrou que as AgNPs impediram a síntese de biofilme, mas não interferiram na viabilidade do organismo (Kalishwaralal et al., 2010). Da mesma forma, doses abaixo da MIC foram capazes de inibir a síntese de biofilme em *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermis*, mas não o crescimento bacteriano (Singh et al.,2018), ou seja, os microrganismos continuaram a crescer, mas sua capacidade de sintetizar exopolissacarídeos foi bloqueada, não permitindo a formação do biofilme. Desta maneira, além do seu potencial bacteriostático e bactericida, as AgNPs têm potencial para inibir a formação de biofilmes e impedir a adesão de bactérias à superfície, mesmo em concentrações abaixo de suas concentrações inibitórias. Este conjunto de características torna as AgNPs uma iminente opção para tratamento de infecções bacteriana.

Após a confirmação atividade antibacteriana contra bactérias resistentes, a segurança das AgNP foi estudada utilizando testes in vitro. Os resultados mostraram que não ocorreu citotoxicidade até a concentração de $3{,}3 \times 10^{10}$ $Np.mL^{-1}$. Estudo realizado por Rheder et al. (2018), utilizando AgNPs biogênicas sintetizadas com extrato de *Althaea ofcinalis*, mostraram que as nanopartículas não apresentaram nenhuma citotoxicidade em diferentes tipos celulares até a concentrações até $0{,}0138 \times 10^{10}$ $Np.mL^{-1}$, estudo que reforça a baixa toxicidade encontrada em reação as nanopartículas biogênicas. Outra observação é a resposta diferenciada em exposição a diferentes linhagens celulares, uma possível explicação para a diferença na sensibilidade das diferentes linhagens celulares pode ser a produção diferencial de antioxidantes naturais produzidos pelas células, os quais são a chave do mecanismo de defesa natural durante o estresse oxidativo (Lima et al., 2012; Rheder et al.; 2018; Guilger-Casagrande et al., 2019)

Alguns estudos mostraram que AgNPs comerciais são citotóxicas e imunotóxicas para células epiteliais de pulmão humano (A549), estes efeitos podem ter sido consequência da geração de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que levou a um estresse oxidativo celular (Suliman et al., 2015). Guilger et al. (2018) analisando as nanopartículas comerciais de

síntese química também citam a citotoxicidade de AgNPs em concentrações a partir de 6×10^{11} $Np.mL^{-1}$ em linhagem HeLa e a concentração $1,1 \times 10^{12}$ $Np.mL^{-1}$ em linhagem HaCaT.

Os resultados dos ensaios de genotoxicidade realizados por análise cometa indicam que na concentração de $0,9 \times 10^{10}$ $Np.mL^{-1}$ os danos encontrados foram significativos em linhagens V79 e HaCaT ($p<0,05$). A indução de danos no DNA por AgNPs pode ser devida à geração de radicais livres e estresse oxidativo, resultando em quebras de DNA e uma série de danos aos componentes celulares. No entanto, o ensaio cometa é considerado um pré-teste, devido a sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas, ou seja, os danos ainda não são permanentes e podem ser reparados durante a divisão celular (Kammann *et al.*, 2001). Os resultados obtidos da exposição das AgNPs a concentrações de $4,5 \times 10^{9}$ e 9×10^{8} $Np.mL^{-1}$ mostraram baixa toxicidade (Figura 4).

Os resultados de *Allium cepa*, considerado de excelência pela sociedade científica (Cabrera and Rodrigues, 1999), mostraram que nas concentrações 9×10^{10} $Np.mL^{-1}$ e $4,5 \times 10^{10}$ $Np.mL^{-1}$, ocorreu uma redução do índice mitótico em torno de 40%, sendo nas demais concentrações o índice mitótico manteve-se entre 75% a 90%. Na avaliação de danos cromossômicos foram consideradas as C-metáfase, fragmentos, metáfase pegajosa, cromossomos retardatários, anáfases com ponte, anáfase desarranjada e micronúcleos. Nas concentrações 9×10^{10} $Np.mL^{-1}$ e $4,5 \times 10^{10}$ $Np.mL^{-1}$ foi observado grande número de metáfase pegajosa seguida de C-metáfase.

Esta alta frequência de aberrações cromossômicas pode ser atribuída a interação das AgNPs com os grupos tiol dos microtubos, resultando no rompimento da ligação do fuso com os cromossomos, uma vez que, as AgNps comerciais mostraram interagir com as fibras do fuso das cromátides levando ao aparecimento de metáfase pegajosa ou divisão desigual do material genético (Babu et al., 2008; Kumari et al., 2009), já o aparecimento de C-metáfase provavelmente se deve à perda de ligação dos microtúbulos aos eixos (Nagaonkar et al., 2015).

Outros estudos mostram que algumas AgNPs são capazes de atravessar a membrana celular e adentrar a célula, interagindo desta maneira, de forma direta ou indireta com o material genético, levando ao aparecimento de ponte cromossômica, quebras cromossômicas, C-metáfase, metáfase pegajosa, atraso cromossômico, entre outros (Kumari et al., 2009; Panda et al., 2011; Patlolla et al., 2012). Os resultados de Panda et al., (2011) indicaram que AgNP biogênicas e comerciais exibiram efeitos similares em causar baixa citotoxicidade e maior genotoxicidade do que apenas íon Ag^{+}. Outros resultados também identificaram que a exposição de AgNPs a *Vicia faba* aumentou significativamente o número de aberrações cromossômicas, micronúcleos e diminuiu o índice mitótico, quando comparados ao grupo

controle (Patlolla et al., 2012). Pesnya (2013) estudando AgNPs detectou anormalidades mitóticas, cromossômicas e micronúcleos na concentração de 50 mg/L. Acredita-se que as alterações nos indicadores de índice mitótico, índice de anormalidades nucleares e índice de micronúcleos, dependam do diâmetro das AgNPs e de sua forma de síntese, revelando que os efeitos citotóxicos e genotóxicos em *Allium cepa* aumentam com a redução do diâmetro das nanopartículas, sendo as próprias AgNPs as principais responsáveis pela citotoxicidade e genotoxicidade, não sendo estas causadas por um processo secundário, como por exemplo a geração de ROS (Scherer et al., 2019).

Para a utilização das AgNps em matrizes de hidrogéis poliméricos, fez-se necessária a caracterização reológica dos sistemas e a avaliação dos efeitos da incorporação das AgNps na estrutura. Os hidrogéis de PL podem exibir dois tipos de comportamentos reológicos: Newtoniano (líquidos, abaixo da Tsol-gel), ou seja, em baixas concentrações de polímero (ou decorrentes de alterações no meio de dissolução, concentração de sais etc) e não-Newtoniano (gel, acima da Tsol-gel) em altas concentrações de polímero. Dessa forma, a concentração do polímero, a incorporação de aitivos (nanocarreadores, moléculas bioativas, entre outos) bem como a temperatura podem influenciar diretamente o comportamento reológico dos mesmos e, consequentemente, a manutenção dos hidrogéis no local de aplicação, como a pele, por exemplo. Altas concentrações de polímero, como 20 a 30 %, favorecem o aumento da viscosidade do gel, resultando em um comportamento pseudoplástico, que pode ser observado de forma macroscópica, onde o material pode apresentar uma redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, favorecendo a formação de filmes pós-aplicação (Ricci, et al., 2002; Antunes, et al., 2011). Os resultados corroboram com relatos da literatura, onde maiores concentrações de PL407 apresentaram resultados de Tsol-gel entre 26 e 29 ºC (Dorraj and Moghimi, 2013; Akkari et al., 2016).

Também foi possível observar que a adição do PL 403 induziu um aumento nos valores de G’, com consequente aumento da relação G’/G”, uma vez que, é um polímero mais hidrofóbico que o PL 407, o que proporciona uma maior organização nas estruturas micelares dos géis, devido o aumento de viscosidade (Tabela 3). A incorporação das AgNps nos hidrogéis também alterou os perfis reológicos para as análises em função da frequência. Com a inserção das AgNps nos hidrogéis, o comportamento reológico apresentou alteração em ambos os sistemas, modificando o comportamento não-Newtoniano para Newtoniano constante, resultando também em aumento nos valores de viscosidade até atingir a consistência de gel.

A atividade antibacteriana dos hidrogéis foi testada por meio do ensaio de disco-difusão em ágar e contagem de colônias. Os resultados mostram que os hidrogéis possuem efeitos

bactericidas sobre as bactérias resistentes. O desempenho dos hidrogéis está relacionado a capacidade do polímero em carrear e liberar AgNPs no meio (Patil et al., 2012). No experimento com as nanopartículas em meio líquido, a difusão de AgNPs ao redor do disco é mais visível, sugerindo que partículas em meio são mais difusíveis do que em gel, devido ao fato de o meio líquido permitir maior contato entre células e partículas bacterianas. Por outro lado, a redução no escoamento e menor difusão das AgNps no gel, permite a manutenção da matriz-gel em contato com o local de aplicação, como por exemplo, feridas na pele, o que promoveria a potencialização do efeito local das AgNps. Outros trabalhos utilizando diferentes tipos de polímeros para a produção de hidrogéis também demostram a efetividade da incorporação de AgNPs (Nagaich et al., 2016; Abdallah et al., 2020).

CONCLUSÃO

As AgNPs foram sintetizadas e apresentaram alta homogeneidade de tamanho, também foi possível observar ação antimicrobiana contra bactérias resistentes de alta importância clínica. Além disso, foram capazes de inibir o crescimento bacteriano e inibir a formação de biofilme bacteriano. A citotoxicidade de genotoxicidade mostraram baixa toxicidade nos ensaios.

A incorporação das AgNPs em gel permitiu que este apresentasse propriedades bactericidas, fato que faz deste uma possível opção para utilização preventiva ou para descontaminação local rápida, da pele. Desta maneira a utilização de nanopartículas biogênicas para aplicação cutânea pode ser uma opção interessante em casos de descontaminação local ou tratamento de feridas com alto risco de contaminação.

Material Suplementar

ANEXO I

Tabela S1 – Relação da resistência aos antibióticos.

Espécie	Código	Resistente a
Pseudomonas aeruginosa	7.2	Amicacina, Aztreonan, Cefepime, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem, Levofloxacina, Meropenem, PIP/Tazo, Piperacillin, Ticar/K CLAV, Tobramicina
	7.5	Ciprofloxacina, Amicacina, Ampicilina, Lomefloxacina, Ertapenen, Gentamicina
	7.8	Ciprofloxacina, Amicacina, Ampicilina, Lomefloxacina, Ertapenen, Gentamicina
	7.11	Amicacina, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenen,
E. Coli	3.5	Ácido Pipemidico, Ceftriaxona, Sulfazotrim, Aztreonan, Ácido Nalidixico, Ciprofloxacina, Cefotaxima, Cefalotina, Norfloxacin, Ampicilina
	3.40	Amoxacilina/Ácido Clavulanico, Ampicilina, Cefoxitina, Cefuroxime, Piperacillin, Trimeth/Sulfa
Enterobacter cloacae	2.3	Amicacina, Ampiclina, Cefazolina, Cefepime, Cefotaxima, Cefoxitina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina, Pip/Tazo, Piperacillin, Tetraciclina, Ticar/K Clav, Tobramicina, Trimeth/Sulfa
Enterobacter aerogenes	2.10	Cefuroxima, Ceftriaxona, Ampicilina, Amox/Ác. Clav, Sulfazotrim, Gentamicina, Cefalotina
Serratia liquefaciens	0.3	Sulfazotrim, Amoxacilina/Ácido Clavulanico, Ampicilina, Cefalotina, Ceftriaxona, Gentamicina
Klebsiella pneumoniae	4.1	Amicacina, Ampicilina, Cefepime, Cefuroxime, Ciprofloxacina, Getamicina, Piperacillin, Trombamicina
	4.5	Amicacina, Ampicilina, Cefazolina, Cefepime, Cefuroxime, Ertapenen, Trombamicina, Trimeh/Sulfa
	4.9	Amox/Ac Clav, Ampicilina, Cefepime, Cefuroxime, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Pip/Tazo, Piperacillin, Tetraciclina, Ticar/K Clav, Trombamicina, Trimeth/Sulfa
S. aureus	14458	Meticilina, Vancomicina
	43300	Meticilina, Vancomicina
	6538	Meticilina, Vancomicina
	33591	Meticilina, Vancomicina
	29213	Meticilina, Vancomicina

REFERÊNCIAS

ABDEL-AZEEM, E. A.; ELSAYED, B. A. Phytotoxicity of silver nanoparticles on Vicia faba seedlings. **New York Science Journal**. v. 6, n. 12, p. 148-156, 2013.

ABDELGHANY, T. M. *et al*. Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. **BioNanoScience**. v. 8, n. 1, p. 5-16, 2018.

AGNIHOTRI, S. *et al*. Photocatalytic and antibacterial potential of silver nanoparticles derived from pineapple waste: process optimization and modeling kinetics for dye removal. **Applied Nanoscience**. v. 8, n. 8, p. 2077-2092, 2018.

AGRAWAL, P; KULKARNI, N. Studies on Bacterial Synthesis of Silver Nanoparticles and its Synergistic Antibacterial effect with antibiotics against Selected MDR Enteric Bacteria. **J. Life. Sci. Scienti. Res**. v. 4, n. 4, p. 1897-1904, 2018.

AKTER, M. *et al*. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. **Journal of Advanced Research**. v. 9, p. 1-16, 2018.

ALEXANDER, J. W. History of the medical use of silver. **Surgical infections.** v. 10, n. 3, p. 289-292, 2009.

ANIGOL, L. B. *et al*. Effect of Concentration and pH on the Size of Silver Nanoparticles Synthesized by Green Chemistry. Organic & Medicinal Chem IJ. v. 3, n. 5, 2017.

ARAYA, G. *et al*. Green synthesis of silver nanoparticles using Prosopis juliflora bark extract: reaction optimization, antimicrobial and catalytic activities. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**. v. 46, n. 5, p. 985-99, 2018.

ASLAM, B. *et al*. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**. v. 11, p. 1645-1658, 2018.

BABU, K. *et al*. Effect of Nano-Silver on Cell Division and Mitotic Chromosomes: A Prefatory Siren. **The Internet Journal of Nanotechnology**. v. 2, n. 2, p. 1-7, 2008.

BAPTISTA, P. V. *et al*. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria-"A Battle of the Titans". **Front. Microbiol**. v. 9, n. 1441, p. 1-26, 2018.

BASTOS, V. *et al*. Genotoxicity of citrate-coated silver nanoparticles to human keratinocytes assessed by the comet assay and cytokinesis blocked micronucleus assay. Genotoxicity of citrate-coated silver nanoparticles to human keratinocytes assessed by the comet assay and cytokinesis blocked micronucleus assay. **Environ Sci Pollut Res.** v. 24, p. 5039-5048, 2017.

CABRERA GL, RODRIGUEZ DMG. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant biossays. **Mutat Res.** V. 426, p. 211-214, 1999.

CARBONA, M. *et al*. Silver nanoparticles in polymeric matrices for freshfood packaging. **Journal of King Saud University Science**. v. 28, n. 4, p. 273-279, 2016.

CHITRA. K., ANNADURAI, G. Antibacterial Activity of pH-Dependent Biosynthesized Silver Nanoparticles against Clinical Pathogen. **BioMed Research** Int. v. 2014, p. 1-6, 2014.

DAKAL, T. C. *et al*. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. **Front. Microbiol.** v. 7, n. 1831, 1-17, 2016.

DAS, B. *et al*. Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 10, p. 862-876, 2015.

DEVI, G, K. *et al*. A Review on Metallic Gold and Silver Nanoparticles. **Research J. Pharm. and Tech**. v. 12, n. 2, p. 935-943, 2019.

DONG, P. V. *et al*. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. **International Nano Letters**. v. 2, n. 9, p. 1-9, 2012.

DURÁN, N. *et al*. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med**. v.12, p. 789-799, 2016.

EBRAHIMINEZHAD, A. *et al*. Ancient and novel forms of silver in medicine and biomedicine. **Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies**. v. 2, n. 1, p. 122-128, 2016.

FATIMA, R. *et al*. Biosynthesis of silver nanoparticles using red algae Portieria hornemannii and its antibacterial activity against fish pathogens. **Micro. Patho.** v. 138, p. 1-7, 2020.

FAYAZ, A. M. *et al*. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bactéria. Nanomedicine. v. 6, n. 1, p. 103-9, 2010.

FERREIRA, M. V.C. *et al*. Penicilina: oitenta anos. **Rev Med**. v. 87, n. 4, p. 272-6, 2008.

FRANCI, G. *et al*. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules.** v. 20, p. 8856-8874, 2015.

GOPINATH, V. *et al*. Biogenic synthesis, characterization of antibacterial silver nanoparticles and its cell cytotoxicity. **Arabian J. of Chem.** v. 10, p. 1107–1117, 2017.

GOSWAMI, S. *et al*., Biocompatible nanocarrier fortified with a dipyridinium-based amphiphile for eradication of biofilm. **ACS Appl. Mater. Interfaces**. v. 6, n. 18, p. 16384–16394, 2014.

GOYAL, S. *et al*. Antibacterial, anticancer and antioxidante potential of silver nanoparticles engineered using Trigonella foenum-graecum seed extract. **IET Nanobiotechnol**. v. 12, n. 4, p. 526-533, 2018.

GUILGER, M. *et al*. Evaluation of Silver Nanoparticles: In Vitro Assays for Cyto/Genotoxicity in Cell lines and Ecotoxicity on Zebrafish. Int. J. of Global Adv. **Materials & Nanotechnology**, v. 1, p. 31-42, 2018.

HABAS, K. *et al*. Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Human Keratinocyte Cell Line HaCaT in Vitro. Nanoscale Reports. v. 2, n. 2 , p.1-9, 2019.

IRAVANI, S. *et al*. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in Pharmaceutical Sciences**. v. 9, n.6, p. 385-406, 2014.

KIM, LH. *et al*., Physicochemical interactions between rhamnolipids and Pseudomonas aeruginosa biofilm layers. **Environ. Sci. Technol**. v.49, n. 6, p. 3718–3726, 2015.

KORA, A. J; SASHIDHAR, R. B. Biogenic silver nanoparticles synthesized with rhamnogalacturonan gum: Antibacterial activity, cytotoxicity and its mode of action. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 11, p. 313-323, 2018.

KRISHNARAJ, C. *et al*. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. Spectrochimica Acta Part A. v. 93, p. 95-99, 2012.

KRISHNARAJ, C. *et al*. Synthesis of silver nanoparticles using Acalypha indica leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 76, p. 50-56, 2010.

KUMAR, M. *et al*. Synthesis, characterization, mechanistic studies and antimicrobial efficacy of biomolecule capped and pH modulated silver nanoparticles. **Journal of Molecular Liquids**. v. 249, p. 1145–1150, 2018.

KUMARAM, S. *et al*. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous flower extracts of Polianthes tuberosa and their antibacterial and cytotoxicity activity. **International Journal of Research and Analytical Reviews**. v. 5, p. 4, p. 407-414, 2018.

KUMARI, M. *et al*. Genotoxicity of silver nanoparticles in Allium cepa**. Science of the Total Environment**. v. 407, p. 5243-5246, 2009.

KUREK, A. *et al*. New Antibacterial Therapeutics and Strategies. **Polish Journal of Microbiology.** v. 60, n. 1, p. 3-12, 2011.

LARA, H. H. *et al*. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bactéria. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 26, p. 615-621, 2010.

LI, B., WEBSTER, T. J. Bacteria Antibiotic Resistance: New Challenges and Opportunities for Implant-Associated Orthopaedic Infections. J Orthop Res. v. 36, n. 1, p. 22-32, 2018.

LIMA, R., DEL FIOL F.S. AND BALCÃO V.M. Prospects for the Use of New Technologies to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. **Front. Pharmacol**. 10:692. doi: 10.3389/fphar.2019.00692.

MA, Y. *et al*. Antibacterial evaluation of sliver nanoparticles synthesized by polysaccharides from Astragalus membranaceus roots. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 89, p. 351-357, 2017.

MAKAROV, V.V. *et al*. Green Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. **Acta naturae**. v. 6, n. 20, p.35-44, 2014.

MANIRAJ, A. *et al*. Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Effective Utilization in Fabricating Functional Surface for Antibacterial Activity Against Multi-Drug Resistant Proteus mirabilis. **Journal of Cluster Science**. p. 1–12, 2019. < https://doi.org/10.1007/s10876-019-01582-z >

MANOSALVA, N. *et al*. Green synthesis of silver nanoparticles: effect of synthesis reaction parameters on antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v. 35, n. 88, p. 2-9, 2019.

MARASSI, V. *et al*. Silver nanoparticles as a medical device in healthcare settings: a five-step approach for candidate screening of coating agentes. **R. Soc. open sci**. v. 5, n. 171113, p. 1-21, 2017.

MARKOWSKA, K. *et al*. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. **Acta Biochim Pol**. v. 60, n. 4, p. 523-530, 2013.

MEDICI, S. *et al*. Medical uses of silver: history, myths, and scientific evidence. **J. Med. Chem**. v. 62, p. 5923−5943, 2019.

MICHAEL CA, DOMINEY-HOWES D, LABBATE M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Front Public Health**. v. 2, n.145, p. 1-8, 2014.

MOHANTA, Y. K. *et al*. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by Leaf Extract of Erythrina suberosa (Roxb.). Front. Mol. Biosci. v. 4, n. 14, p. 1-9, 2017.

MOHANTY, S. *et al*. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticle. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.** v. 8, p. 916-924, 2012.

MÖHLER, J. S. *et al*. Silver bullets: A new lustre on an old antimicrobial agente. **Biotechnology Advances.** v. 36, n. 5, p. 1391-1411, 2018.

MUKHERJEE, S. *et al*. Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. **Physical Sciences Reviews**. v. 4, n. 1, p. 1-73, 2018.

MUKHERJI, S. *et al*. Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. **Physical Sciences Reviews**. 2018. https://doi.org/10.1515/psr-2017-0082

NAGAONKAR, D.; SHENDE, S.; RAI, M. Biosynthesis of Copper Nanoparticles and Its Effect on Actively Dividing Cells of Mitosis in Allium cepa. **Biotechnol. Prog**. v. 00, n. 00, p. 1-9, 2015.

NATHAN C, CARS O. Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects. **N Engl J Med**. v. 371, n. 19, p. 1761-1763, 2014.

OKAFOR, F. *et al*. Green Synthesis of Silver Nanoparticles, Their Characterization, Application and Antibacterial Activity. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** V. 10, p. 5221-5238, 2013.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 34, p. 877-886, 2015.

OLUWANIYI, O.O. *et al*. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of Thevetia peruviana Juss and its antimicrobial activities. **Appl Nanosci**. v. 6, p. 903-912, 2016.

OUAY, B. L STELLACCI, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. **Nano Today**. v. 10, p. 339-354, 2015.

PANDA, K. K. *et al*. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. **Toxicology in Vitro**. v. 25, p. 1097-1105, 2011.

PAREEK, V.; GUPTA, R., PANWAR, J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? **A review. Materials Science & Engineering C**. v. 90, p. 739-749, 2018.

PATIL, M. P. *et al*. Antibacterial potential of silver nanoparticles synthesized using Madhuca longifolia flower extract as a green resource. **Microbial Pathogenesis**. v. 121, p. 184-189, 2018.

PATLLOLA, A. K. *et al*. Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Vicia faba: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 9, p. 1649-1662, 2012.

PEREIRA, A. L; PITA, J. R. Alexander fleming (1881-1955). Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras e História**. v. 6, p. 129-151, 2005.

PESNYA, D. S. Cytogenetic effects of chitosan-capped silver nanoparticles in the Allium cepa test. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**. v. 66, n. 3, p. 275-281, 2013.

QIOU, Z. *et al*. Silver nanoparticles with pH induced surface charge switchable properties for antibacterial and antibiofilm applications. **J. Mater. Chem. B**. v. 7, p. 830-810, 2019.

QIU, W,-Y *et al*. pH dependent green synthesis of gold nanoparticles by completely C6-carboxylated curdlan under high temperature and various pH conditions. International Journal of Biological **Macromolecules**. v. 106, p. 498-506, 2018.

QUINTEIROS, M. A. *et al*. Biosynthesized silver nanoparticles: decoding their mechanism of action in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Biosynthesized silver nanoparticles: decoding their mechanism of action in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 104, p. 87-93,2018.

RAHEMAN, F. *et al*. Silver nanoparticles: Novel antimicrobial agent synthesized from an endophytic fungus Pestalotia sp. isolated from leaves of Syzygium cumini (L). **Nano Biomed. Eng**. v. 3, n. 3, p. 174-178, 2011.

RAHMAN, A. U. *et al*. Tuber extract of Arisaema flavum eco-benignly and effectively synthesize silver nanoparticles: Photocatalytic and antibacterial response against multidrug resistant engineered E. coli QH4. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. v. 193, p. 31-38, 2019.

RAMALINGAM, B. *et al*. Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure and nanomechanical properties of gram-negative bacteria viz. Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. **ACS Appl. Mater. Interfaces.** v.8, p. 4963-4976, 2016.

RHEDER, D. T. *et al*. Synthesis of biogenic silver nanoparticles using Althaea officinalis as reducing agent: evaluation of toxicity and ecotoxicity. Scientific Reports, v. 8, p. 1-12, 2018.

ROLIM, W. R. *et al*. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles:Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science**. v. 463, p. 66-74, 2019.

SAMPAIO, P.S. *et al*. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Cad. Saúde Colet**. v. 26, n. 1, p. 15-22. 2018.

SARMA, P. *et al*., A Review on common pathogenic microorganisms and their impact on human health. **Electronic Journal of Biology**. v. 14, n. 1, p. 50-58, 2018.

SCHERER, M. D. *et al*. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of Allium cepa roots: A close analysis of particle size dependence. **Science of the Total Environment**. v. 660, p. 459-467, 2019.

SIBIYA, P.N; MOLOTO, M.J. Green synthesis of ag2s nanoparticles: effect of ph and capping agent on size and shape of NPs and their antibacterial activity. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**. v. 13, n. 2, p. 411-418, 2018.

SIDDIQUI I A *et al*. Impact of nanotechnology in cancer: emphasis on nanochemoprevention. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7, p. 591-605, 2012.

SIKDER, M. *et al*. A rapid approach for measuring silver nanoparticle concentration and dissolution in seawater by UV–Vis. Sci Total Environ. v. 15, v. 618, p. 597-607, 2017.

SINGH, S. *et al*. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**. v. 11, p. 53-62, 2017.

SULIMAN, A. O. *et al*. Evaluation of Cytotoxic, Oxidative stress, Proinflammatory and Genotoxic Effect of Silver Nanoparticles in Human Lung Epithelial Cells. **Environmental Toxicology.** v. 30, n. 2, p. 149-160, 2015.

VANAJA, M. *et al*. Kinetic study on green synthesis of silver nanoparticles using Coleus aromaticus leaf extract. **Pelagia Research Library**. v. 4, n. 3, p. 50-55, 2013.VELOSOVÁ, O. *et al*. Influence of pH on green synthesis of Ag nanoparticles. **Materials Letters**. v. 180, p. 336-339, 2016.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis Part 1: causes and threats. **Pharm Ther**. v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

WAKSHLAK, R. B. *et al*. Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the "zombies" effect. **SCIENTIFIC REPORTS**. v. 5, n. 9555, p. 1-5, 2015.

WASEF, L. G. *et al*. Effects of Silver Nanoparticles on Burn Wound Healing in a Mouse Model. **Biological Trace Element Research.** doi: 10.1007/s12011-019-01729-z.

XIN, L. *et al*. Increased oxidative stress and activated heat shock proteins in human cell lines by silver nanoparticles. **Human and Experimental Toxicology**. v. 34, n. 3, p. 315-323, 2015.

YAH, C., S; SIMATE, G., S. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. **J. of Pharma. Sci**. v. 23, n. 43, p. 1-14, 2015.

ZHANG, L. et. al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clinical pharmacology & therapeutics**. v. 83, n. 5, p. 761-769, 2008.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram sintetizadas AgNPs através do método biológico utilizando extrato das folhas da planta *Kalonchoe pinnata*. Os resultados obtidos mostram que a concentração do extrato e diferentes pH tem um papel importante na síntese das AgNPs biogênicas. Foi observado que o pH alcalino proporciona melhor de redução de íons Ag^+, o que favorece a formação imediata de núcleos, portanto, de nanopartículas. Em consequência a isto, ocorre a formação de nanopartículas com diâmetro menor e alto grau de homogeneidade, características que melhoraram o potencial antimicrobiano das AgNPs. Neste trabalho, a melhor condição de síntese obtida foi em concentração de 0,06 $mg.mL^{-1}$ do extrato de planta, pH 9 e concentração final de $AgNO_3$ de 1mM.

As análises em UV-vis confirmaram a presença de nanopartículas ao gerar pico de absorbância em comprimentos de onda entre 430 e 450 nm. Os resultados em DLS e NTA mostraram que as AgNPs possuem tamanho de 121 ± 6,5 nm de diâmetro, distribuição de tamanho uniforme com 0,2 pdi, e alta concentração de partículas por mL, chegando a $9x10^9$ $Np.mL^{-1}$.

Os ensaios de atividade antimicrobiana claramente indicam que as AgNPs possuem ação antimicrobiana contra bactérias a partir de concentrações de $9x10^8$ $Np.mL^{-1}$, demostrado melhores resultados contra as gram-negativas. Além disso, as AgNPs foram eficientes contra bactérias resistentes, sendo capazes de inibir o crescimento bacteriano durante período de 24h e inibir em até 90% a formação de biofilme bacteriano.

Os estudos de toxicidade *in vitro* das AgNPs realizados em células animais mostraram baixa toxicidade nos ensaios, mantendo a viabilidade das células acima 70% em ensaios por MTT e vermelho neutro. No ensaio do cometa e índice mitótico em HaCat, os resultados mostraram valores significativo de toxicidade em concentrações a partir de $3x10^{10}$ $Np.mL^{-1}$. Os resultados ainda indicam que as AgNPs interferem no índice mitótico e no aparecimento de aberrações cromossômicas em células de raízes de *Allium cepa*, em concentrações de $4,5x10^{10}$ $Np.mL^{-1}$.

A incorporação das nanopartículas em hidrogéis termorreversível mostrou que estes mantiveram características desejáveis de viscosidade e ainda apresentaram atividade bactericida. Desta maneira, utilização de hidrogéis com AgNPs são candidatas para tratar e descontaminar infecções cutâneas , embora exista a necessidade de mais estudos sobre AgNPs em hidrogéis.

6 REFERÊNCIAS

ABASSI, E. *et al*. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 42, n. 2, p. 173-180, 2016.

ABBASZADEGA, A. *et al*. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. **Journal of Nanomaterials**. v.16, n. 1, p. 1-8, 2015

AFIFI, M. *et al*. Toxicity of silver nanoparticles on the brain of Oreochromis niloticus and Tilapia zillii. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 23, p. 754-760, 2016.

AKTER, M. *et al*. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. **Journal of Advanced Research.** v. 9, p. 1-16, 2018.

ALAVI, M. E RAI, M. Recent advances in antibacterial applications of metal nanoparticles (MNPs) and metal nanocomposites (MNCs) against multidrug-resistant (MDR) bactéria. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 17, n. 6, p. 419-428, 2019.

ALEXANDER, J. W. History of the medical use of silver. **Surgical infections.** v. 10, n. 3, p. 289-292, 2009.

AMINOV, R. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in microbiology**. v. 1, n. 134, p. 1-7, 2010.

ANIGOL, L. B. *et al*. Effect of Concentration and pH on the Size of Silver Nanoparticles Synthesized by Green Chemistry. Organic & Medicinal Chem IJ. v. 3, n. 5, 2017.

ASLAM, B. *et al*. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**. v. 11, p. 1645-1658, 2018.

BALLOTIN, D. *et al*. Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against Candida and Xanthomonas. **Materials Science and Engineering C**. v. 75, p. 582–589, 2017.

BAPTISTA, P. V. *et al*. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria-"A Battle of the Titans". **Front. Microbiol**. v. 9, n. 1441, p. 1-26, 2018.

BARILO, D.J; MARX, D.E. Silver in medicine: A brief history BC 335 to presente. **Burns.** v. 40, p. S3-S8, 2014.

BASSETTI, M. *et al*. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 22-36, 2013.

BEG,M. *et al*. Green synthesis of silver nanoparticles using Pongamia pinnata seed: Characterization, antibacterial property, and spectroscopic investigation of interaction with human serum albumin**. J. Mol. Recognit**. p. 1-8, 2016.

BELL, V. Medicamentos e vida privada na primeira metade do século xx: o combate às infeções antes e depois da penicilina. **Revista Portuguesa de História**. v. 2016, p. 359-379, 2016.

BERDOUS, D. & FERFERA-HARRAR, H. Green synthesis of nanosilver-loaded hydrogel nanocomposites for antimicrobial application**. Inter. J. of Bio, Biomol, Agricul., Food and Biotech Eng**. v. 10, n. 8, p. 529-536, 2016.

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

BHOWMIK, A. D. *et al*. Cytotoxic and mutagenic efects of green silver nanoparticles in cancerand normal cells: a brief review. **Nucleus**. 2019. https://doi.org/10.1007/s13237-019-00293-0

BLAIR, J. M. A. *et al*. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**. v. 13, n. 1, p. 42-51, 2016.

BLANCO, P. *et al*. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants**. Microorganisms**. v. 4, n. 14, 1-19, 2016.

BRAAKHUIS, H. M. *et al*. Identification of the appropriate dose metric for pulmonary inflammation of silver nanoparticles in an inhalation toxicity study. **Toxicology Letters.** v. 258, p. S272-S276, 2016.

CALIXTO, G. M. F. *et al*. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules.** v. 21, n. 342, p. 1-18, 2016.

CANIAUX, I., et.al. MCR: modern colistin resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 36, n. 3, p. 415–420, 2017.

CARBONA, M. *et al*. Silver nanoparticles in polymeric matrices for freshfood packaging. **Journal of King Saud University Science**. v. 28, n. 4, p. 273-279, 2016.

CASSINI, A. *et al*. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **Lancet Infect Dis**. v. 19, p. 56-66, 2019.

CAUCCI, S. *et al*. Seasonality of antibiotic prescriptions for outpatients and resistance genes in sewers and wastewater treatment plant outflow. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 92, n. 5, p. 1-10, 2016.

CHAIN, E. *et al*. The classic: penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940**. Clin. Orthop. Relat. Res**. v. 439, p. 23-26, 2005.

CHAUDHURI, S.K., CHANDELA, S., MALODIA, L. Plant mediated green synthesis of silver nanoparticles using tecomella undulata leaf extract and their characterization. **Nano Biom. Eng**. v. 8, n. 1, p. 1-8, 2016.

CHITRA. K., ANNADURAI, G. Antibacterial Activity of pH-Dependent Biosynthesized Silver Nanoparticles against Clinical Pathogen. **BioMed Research** Int. v. 2014, p. 1-6, 2014.

CHO, D. Y. *et al*. Triphenylphosphonium-Conjugated Poly(ε-caprolactone)-Based Self-Assembled Nanostructures as Nanosized Drugs and Drug Delivery Carriers for Mitochondria-Targeting Synergistic Anticancer Drug Delivery. **Adv. Funct.Mater**. v. 25, p. 5479–5491, 2015.

CHOPRA, I. *et al*. "Discovery and development of new anti-bacterial drugs," in **Pharmacochemistry Library**, Vol. 32, Trends in Drug Research III, ed. H. van der Goot (Amsterdam: Elsevier), p. 213-225, 2002.

CIESIELSKI, A., CZAJKOWSKI, K. M., SWITLIK, D. Silver nanoparticles in organic photovoltaics: Finite size effects and optimal concentration. **Solar Energy**. v. 184, p. 477-488, 2019.

DAKAL, T. C. *et al*. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. **Front. Microbiol.** v. 7, n. 1831, 1-17, 2016.

DANHIER, F. *et al*. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**. v. 161, p. 505–522, 2012.

DARAAE, H. *et al*. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. v. 44, n. 1, p. 381-391, 2016.

DIAS, I.O.V. *et al*. Analysis of the potential bactericide and bacteriostatic of silver sulphadiazine. **Rev Bras Queimaduras**. v. 12, n. 4, p. 278-285, 2013.

DURÁN, N. *et al*. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine**. v. 12, n. 3, p. 789-799, 2016.

EBRAHIMINEZHAD, A. *et al*. Ancient and novel forms of silver in medicine and biomedicine. **Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies**. v. 2, n. 1, p. 122-128, 2016.

ECKHARDT, S. *et al*. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. **Chemical Reviews.** v. 113, n. 7, p. 4708-4754, 2013.

ECONOMOU, V., GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bactéria. **Infection and Drug Resistance**. v. 8, p. 49-61, 2015.

FERREIRA, H. S. e RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Quim. Nova**. v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FERREIRA, M. A. M., FILIPE, J. A., COELHO, M. & CHAVAGLIA, J. Nanotechnology applications in industry and medicine. **Acta Scientiae et Intellectus**. v.3, n. 2, p. 31-50, 2017.

FERREIRA, M. V.C. *et al*. Penicilina: oitenta anos. **Rev Med**. v. 87, n. 4, p. 272-6, 2008.

FIGUEIRAS, A.R. R. *et al*. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas**. Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 14-26, 2014.

FLEMMING, H. *et al*. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**. v. 14, p. 563-575, 2016.

FRANCI, G. *et al*. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules.** v. 20, p. 8856-8874, 2015.

GAJBHIYE , S; SAKHARWADE, S. Silver Nanoparticles in Cosmetics. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications.** v. 6, p. 48-53, 2016.

GARCIA, F. M. Avanços da nanomedicina: a nova fronteira da medicina – artigo de atualização. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança**. v. 12, n. 1, p. 110-117, 2014.

GARIMELLA, R. e ELTORAI, A. E.M. Nanotechnology in orthopedics. **Journal of Orthopaedics.** v.14, p. 30–33, 2017.

GE, l.,*et al*. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. **International Journal of Nanomedicine**. v. 9, p. 2399-2407, 2014.

GIEDRAITIENĖ, A. *et al*. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. **Medicina**. v. 47, n. 3, p. 137-146, 2011.

GILBERT, P., ALLISON, D.G, MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**. v. 92, p. 98-110, 2002.

GOPINATH, M.S. *et al*. Biological synthesis, characterization and application of silver nano particles - a review. **Int. J. Phar. Appl**. v. 4, n. 1, p. 19-28, 2013.

GRIFFITT, R. J. *et al*. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. **Toxicological Science**. v. 107, n. 2, p. 404-415, 2015.

GUILGER, M. *et al*. Evaluation of Silver Nanoparticles: In Vitro Assays for Cyto/Genotoxicity in Cell lines and Ecotoxicity on Zebrafish. Int. J. of Global Adv. **Materials & Nanotechnology**, v. 1, p. 31-42, 2018.

GUPTA, A. *et al*. Combatting antibiotic-resistant bactéria using nanomaterials. **Chem. Soc. Rev**. v. 48, p. 415-427, 2019.

HALL, B. G., BARLOW, M. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. **Drug Resist. Updat**. v. 7, p. 111-123, 2004.

HEILIGTAG, F.J e NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**. v. 16, n. 7/8, 2013.

HEYDRNEJAD, M. S. *et al*. Toxic Effects of Silver Nanoparticles on Liver and Some Hematological Parameters in Male and Female Mice (Mus musculus). **Biol Trace Elem Res**. v.165, p. 153-158, 2015.

HIGUCHI A *et al*. Bio-inert surface of Pluronic-immobilized flask for preservation of haematopoietic stem cells. **Biomacromolecules**. v. 7, p.1083–1089, 2006.

HOFMANN-AMTENBRINK, M. *et al*. Nanoparticles in medicine: Current challenges facing inorganic nanoparticle toxicity assessments and standardizations. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v.11, p. 1689–1694, 2015.

HOLMES, A. H. *et al*. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **Lancet**. v. 387, p. 176-87, 2016.

INOUE, A. *et al*. Silver nanoparticles stabilized with a silicone nanocrystal shell and their antimicrobial activity**. RSC Adv**. v., 9, p. 15171 -155176, 2019.

JUGANSON, K. *et al*. Mechanisms of toxic action of silver nanoparticles in the protozoan Tetrahymena thermophila: From gene expression to phenotypic events. **Environmental Pollution.** v. 225, p. 481-489, 2017.

KABAVOV, A.V. *et al*. Pluronic (R) block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Releas**. v. 82, n. 2-3, p. 189-212, 2002.

KASSIROV I.S. *et al*. Sonochemical nanostructuring of antibiotics is a new approach to increasing their effectiveness against resistant strains. **Russian Journal of Infection and Immunity**. v.8, n. 4, 604.

KHAN, I., SAED, K., KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry.** http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011 **,** 2017.

KHAN, M. *et al*. Toxicity of silver nanoparticles in fish: a critical review. **J. Bio. & Env. Sci**. v. 6, n. 5, p. 211-227, 2015.

KIM, Y. S. ,*et al*. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhal Toxicol.** v. 20, p. 575-583, 2008

KLASEN H. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. **Burns.** v. 26, n. 2, p. 117-130, 2000.

KLEBOWSKI, B. *et al*. Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine. **Int. J. Mol. Sci**. v. 19, p. 4031-4047, 2018.

KLOUDA L, MIKOS A.G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 68, p. 34-45.2008.

KOJIMA, S., NIKAIDO, H. Permeation rates of penicillins indicate that Escherichia coli porins function principally as nonspecific channels. **Proc. Natl Acad. Sci**. v. 110, p. E2629-E2634, 2013.

KONOP, M. et. al. Certain aspects of silver and silver nanoparticles in wound care: a minireview. **Journal of Nanomaterials.** v. 2016, p. 1-10,2016. https://doi.org/10.1155/2016/7614753.

KUMAR, M. *et al*. Synthesis, characterization, mechanistic studies and antimicrobial efficacy of biomolecule capped and pH modulated silver nanoparticles. **Journal of Molecular Liquids**. v. 249, p. 1145–1150, 2018.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57, n. 10, p. 1471-1485, 2005.

LANSDOWN, A. B. G. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. **Journal of wound care**. v. 11, n. 4, p. 125-130, 2002.

LANSDOWN, A. B. G. Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety in Use. **Biofunctional Textiles and the Skin.** V. 33, pp 17–34, 2006

LARA, H. H. *et al*. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bactéria. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 26, p. 615–621, 2010.

LEE, K. C. *et al*. History of burns: The past, present and the future. **Burns & Trauma.**, v. 2, n. 4, 169-180, 2014.

LI, B., WEBSTER, T. J. Bacteria Antibiotic Resistance: New Challenges and Opportunities for Implant-Associated Orthopaedic Infections. **J Orthop Res**. v. 36, n. 1, p. 22-32, 2018.

LIAO, S. *et al*. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. **International Journal of Nanomedicine.** v. 14, p. 1469-1487, 2019.

LIMA, R., DEL FIOL F.S. AND BALCÃO V.M. Prospects for the Use of New Technologies to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. **Front. Pharmacol**. 10:692. doi: 10.3389/fphar.2019.00692

LIN, J. *et al*. Mechanisms of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, n. 34, 1-3, 2015.

LIU B, POP M. ARDB antibiotic resistance genes database. **Nucleic Acids Res.** v. 37, p. D443-D447, 2009.

LOPEZ-CARRIZALES, M. *et al*. In vitro synergism of silver nanoparticles with antibiotics as an alternative treatment in multiresistant uropathogens. **Antibiotics**. v. 7, p. 50-63, 2018.

LUZ, C. M. *et al*. Poly-lactic acid nanoparticles (PLA-NP) promote physiological modifications in lung epithelial cells and are internalized by clathrin-coated pits and lipid rafts. **J Nanobiotechnol**. v. 5, n. 11, p. 1-18, 2017.

MAH, T. C., O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agentes. **TRENDS in Microbiology**. v. 9, n. 1, p. 43-39, 2001.

MANSOORI, G. A e SOELAIMAN, T. A. F. Nanotechnology – An Introduction for the Standards Community. **Journal of ASTM International**. v. 2, n. 6, p. 1-21, 2005.

MARTENS, E; DEMAIN, A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. **The Journal of Antibiotics**. v. 70, p. 520-526, 2017.

MARX, D.E; BARILLO, D. J. Silver in medicine: The basic Science. **Burns journal of the International Society for Burn Injuries.** v. S9-S18, p. 1-11, 2014.

MATTEIS, L. *et al*. Nanotechnology in Personalized Medicine: A Promising Tool for Alzheimer's Disease Treatment. **Current Medicinal Chemistry**. v. 25, p. 4602-4615, 2018.

MCSHAN, D. *et al*. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. **Journal of food and drug analysis**. v. 22, p. 116-127, 2014.

MEDICI, S. *et al*. Medical uses of silver: history, myths, and scientific evidence. **J. Med. Chem**. v. 62, p. 5923−5943, 2019.

MEHRAN, A.; MAHENDRA, R. Recent advances in antibacterial applications of metal nanoparticles (MNPs) and metal nanocomposites (MNCs) against multidrug-resistant (MDR) bacteria**, Expert Review of Anti-infective Therapy**, DOI: 10.1080/14787210.2019.1614914.

MEKKAWY, A.I. *et al*. In vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. **Inter. J. of Nanomedicine**. v. 12, p. 759–777, 2017.

MICHAEL CA, DOMINEY-HOWES D, LABBATE M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Front Public Health**. v. 2, n.145, p. 1-8, 2014.

MÖHLER, J. S. *et al*. Silver bullets: A new lustre on an old antimicrobial agente. **Biotechnology Advances.** v. 36, n. 5, p. 1391-1411, 2018.

MOSER, H. *et al*. Evolution of silver dressings in the treatment of partial thickness burns. **Rev Bras Queimaduras**. v.12, n. 2, p. 60-67, 2013.

MUKHERJEE, S. *et al*. Synthesis and characterization of size- and shape-controlled silver nanoparticles. **Physical Sciences Reviews**. v. 4, n. 1, p. 1-73, 2018.

MUNITA, J. M., ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance**. Microbiol Spectr**. v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.

NANDA, A. *et al*. Biosynthesis of silver nanoparticles from Staphylococcus aureus and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 5, p. 452–456, 2009.

NANO.ORG**. What is nanotechnology?,** Disponível em: < http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition> Acesso em 06 mai. 2019.

NATHAN C, CARS O. Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects. **N Engl J Med**. v. 371, n. 19, p. 1761-1763, 2014.

NEU, H.C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**. v. 257, p. 1064-1073, 1992.

NURFADHILAH, M. *et al*. The Role of pH in Controlling Size and Distribution of Silver Nanoparticles using Biosynthesis from Diospyros discolor Willd. (Ebenaceae). **Materials Science and Engineering**. v. 367, p. 1-6, 2018.

OKAFOR, F. *et al*. Green Synthesis of Silver Nanoparticles, Their Characterization, Application and Antibacterial Activity. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v.10, p. 5221-5238, 2013.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 34, p. 877-886, 2015.

OUAY, B. L; STELLACCI, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. **Nano Today**. v. 10, p. 339-354, 2015.

PAREEK, V.,GUPTA, R., PANWAR, J. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. **Materials Science & Engineering C**. v. 90, p. 739-749, 2018.

PARVEEN, S. *et al*. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 8, p. 147–166, 2012.

PATIL, A. *et al*. Nanotechnology Derived Nanotools in Biomedical Perspectives: An Update. **Current Nanoscience**. v.15, n. 2, p. 137-146, 2019.

PEREIRA, A. L; PITA, J. R. Alexander fleming (1881-1955). Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras e História**. v. 6, p. 129-151, 2005.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 20-51, 2005.

PRASAD, K. *et al*. Synergic bactericidal effects of reduced graphene oxide and silver nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bactéria**. Scientific Reports**. v. 7, n. 1591, p. 1-11, 2017.

PULIT, J., BANACH, M., KOWALSKI, Z. Nanosilver-Making Decisions. Journal Ecological **Chemistry and Engineering**, v.18, v. 20, p. 185-194, 2011.

RAFIQUE, M. *et al*. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. v. 45, n.7, 1272-1291, 2016.

RAI, M. *et al*. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. **Crit Rev Microbiol**. v. 42, n, 5, p. 696–719, 2015.

RAJKUMAR, K. S. *et al*. Toxicity assessment on haemotology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish Labeo rohita. **Appl Nanosci**. v. 6, p. 19-29, 2016.

RAMALINGAM, B. *et al*. Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure and nanomechanical properties of gram-negative bacteria viz. Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. **ACS Appl. Mater. Interfaces.** v.8, p. 4963-4976, 2016.

RANGASAMY, M. Nano Technology: A Review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 01, n. 02, p. 08-16, 2011.

REZVANI, E. *et al*. Adverse effects of nanosilver on human health and the environment. **Acta Biomaterialia**. v. 94, p. 145-159, 2019.

RHEDER, D. T. *et al*. Synthesis of biogenic silver nanoparticles using Althaea officinalis as reducing agent: evaluation of toxicity and ecotoxicity. Scientific Reports, v. 8, p. 1-12, 2018.

ROLIM, W. R. *et al*. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles:Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science**. v. 463, p. 66-74, 2019.

ROSSOLINI, G. M. *et al*. Update on the antibiotic resistance crisis. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 18, p. 56-60, 2014.

SAMBALE, F. *et al*. Investigations of the Toxic Effect of Silver Nanoparticles on Mammalian Cell Lines. **Journal of Nanomaterials**. v. 2015, p. 1-9, 2015.

SAMPAIO, P.S. *et al*. Implementação da nova regulamentação para prescrição e dispensação de antimicrobianos: possibilidades e desafios. **Cad. Saúde Colet**. v. 26, n. 1, p. 15-22. 2018.

SÁNCHEZ, G. R. *et al*. Leaf extract from the endemic plant Peumus boldus as an effective bioproduct for the green synthesis of silver nanoparticles. **Mat. Lett**. v. 183, p. 255-260, 2016.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**. v. 13, p. 64-70, 2004.

SATALKAR, P., ELGER, B. S., SHAW, D. M. Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter? **Sci Eng Ethics**. v. 22, p. 1255–1276, 2016.

SCHMOLKA I.R. J. Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns**. Biomed. Mater. Res**. v. 6, p. 571-582, 1972.

SEIFFERT, J. *et al*. Pulmonary Toxicity of Instilled Silver Nanoparticles: Influence of Size, Coating and Rat Strain. **PLoS ONE**. v. 10, n. 3, p. 1-17, 2015.

SEVJI, M. *et al*. Topical Antimicrobials for Burn Infections – An Update. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**. v. 8, n. 3, p. 161–197, 2013.

SHARMA, D., KANCHI, S., BISETTY, K. Biogenic synthesis of nanoparticles: **A review. Arabian Journal of Chemistry**. http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.002 , 2015.

SHIRONMANI, A e DANIEL, K. Silver nanoparticles – universal multifunctional nanoparticles for bio sensing, imaging for diagnostics and targeted drug delivery for therapeutic applications. In: KAPETANOVIC, I. M. **Drug Discovery and Development – Present and Future.** Rijeka: InTech, 2011. p. 463-488.

SIDDIQUI I A *et al*. Impact of nanotechnology in cancer: emphasis on nanochemoprevention. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7, p. 591-605, 2012.

SINGH, A., DUBEY, S., DUBEY, H. K. Nanotechnology: the future engineering. **Inter. J. of Advance and Innovative Research**. v. 6, n. 2, p. 230-233, 2019.

SINGH, M; SINHA, I; MANDAL, R.K. Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles. **Materials Letters**. v. 63, p. 425-427, 2009.

SINGH, S. *et al*. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**. v. 11, p. 53-62, 2017.

SLAVIN, Y. N. *et al*. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity**. J Nanobiotechnol**. v. 15, n. 65, p. 1-20, 2017.

SOLANO-UMAÑA, V. *et al*. Gold and silver nanotechnology on medicine. **Journal of Chemistry and Biochemistry**. v. 3, n. 1, p. 21-33, 2015.

SONG, K. S *et al*. Recovery from silver-nanoparticle-exposure-induced lung inflammation and lung function changes in Sprague Dawley rats. **Nanotoxicology**. v. 7, p. 169-180, 2013.

SOUZA, G. D. *et al*. silver: brief history, properties and applications. **Educ. quím**. v. 24, n. 1, p. 14-16, 2013.

SPELLBERG, B. The Future of Antibiotics and Resistance. **N Engl J Med**. v. 368; n. 4, p. 299-302, 2013.

STARK, W. J. *et al*. Industrial Applications of Nanoparticles. **Chemical Society Reviews**. v. 44, n. 16, p. 5793-5805, 2015.

SULIMAN, A. O. *et al*. Evaluation of Cytotoxic, Oxidative stress, Proinflammatory and Genotoxic Effect of Silver Nanoparticles in Human Lung Epithelial Cells. **Environmental Toxicology.** v. 30, n. 2, p. 149-160, 2015.

TANG, J. *et al*. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. **J. Nanoscience and nanotechnology.** v. 9, n. 8, p. 4924-4932, 2009.

VANAJA, M. *et al*. Kinetic study on green synthesis of silver nanoparticles using Coleus aromaticus leaf extract. **Pelagia Research Library**. v. 4, n. 3, p. 50-55, 2013.

VARGIU, A. V., NIKAIDO, H. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. **Proc. Natl Acad. Sci**. v. 109, p. 20637-20642, 2012.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis Part 1: causes and threats. **Pharm Ther**. v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

VERMA, S e SEIVASTAVA, J.N. Phycosynthesized Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Effect. **Res. Paper**. v. 5, n. 3, p. 273-276, 2016.

WAKSHLAK, R. B. *et al*. Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the "zombies" effect. **SCIENTIFIC REPORTS**. v. 5, n. 9555, p. 1-5, 2015.

WANG, G. Nanotechnology: The New Features. **arXiv.** 2018. Disponivel em: https://arxiv.org/pdf/1812.04939.pdf. Acessado em: 03 ago. 2019.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? Uso racional de medicamentos: temas selecionados, Brasília, v. 1, n. 4, mar. 2004. Disponível em: http://www.opas.org.br/medicamentos/temas

WEBBER, M. A., PIDDOCK, J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 51, p. 9-11, 2003.

WEINAND, C,*et al*. Hydrogel-b-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering. **Bone**. v. 38, p.555-563, 2006.

WHO**. Antimicrobial resistance: global report on surveillance**, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Acesso em: 13 mai. 2019.

WILKINSON, L. J. *et al*. Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: a review of efficacy and safety. **Journal of Wound Care**. v. 20, n. 11, p. 543-549, 2001.

WOZNIAK, A. *et al*. Porin alterations present in noncarbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance. **J. Med. Microbiol**. v. 61, p. 1270-1279, 2012.

YANG, C. *et al*. Silver Nanowires: From Scalable Synthesis to Recyclable Foldable Electronics. **Adv. Mater**. v. 23, p. 3052–3056, 2011.

YU, S. *et al*. Silver nanoparticles in the environment. **Environ. Sci.: Processes Impacts**. v. 15, n. 78, 2013.

ZHANG, L. et. al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clinical pharmacology & therapeutics**. v. 83, n. 5, p. 761-769, 2008.

ZHANG, T. *et al*. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. **Yonsei Med J.** v. 55, n. 2, p. 283-291, 2014.

ZHANG, X. *et al*. Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model. **Int. J. Mol. Sci**. v. 17, n. 1603, 1-26, 2016.