



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCAS MARCELINO DOS SANTOS SOUZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE  
SELÊNIO SINTETIZADAS A PARTIR DE EXTRATOS DE *Al-  
lium cepa*, *Malpighia emarginata* E *Vernonia condensata*.**

LUCAS MARCELINO DOS SANTOS SOUZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE SELÊNIO SINTETIZADAS A PARTIR DE EXTRATOS DE *Allium cepa*, *Malpighia emarginata* E *Vernonia condensata*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina  
2021

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

S729a Souza, Lucas Marcelino dos Santos.  
Atividade antimicrobiana de nanopartículas de selênio sintetizadas a partir de extratos de *Allium cepa*, *Malpighia emarginata* e *Vernonia condensata*. / Lucas Marcelino dos Santos Souza. - Londrina, 2021.  
64 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Antibacteriano - Tese. 2. Nanotecnologia - Tese. 3. Biossíntese - Tese. 4. Nanopartículas - Tese. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

LUCAS MARCELINO DOS SANTOS SOUZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE SELÊNIO SINTETIZADAS A PARTIR DE EXTRATOS DE *Allium cepa*, *Malpighia emarginata* E *Vernonia condensata*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Renata Katsuko Takayama Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Leonardo Pinto Medeiros  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina 23 de fevereiro de 2021

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, principalmente minha mãe que desde sempre me deu apoio e ajuda em todas as horas.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato por dedicar um pouco do seu tempo para me orientar

À todos os integrantes do NIP 3 que de alguma forma contribuíram para a elaboração desse projeto.

Aos órgãos de fomento, CAPES e Fundação Araucári, que subsidiaram minha manutenção para finalizar o trabalho.

Meu muito obrigado a todos.

SOUZA, Lucas Marcelino dos Santos, **Atividade antimicrobiana de nanopartículas de selênio sintetizadas a partir de extratos de *Allium cepa*, *Malpighia emarginata* e *Vernonia condensata***. 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um grande problema para a saúde pública e a nanotecnologia vem sendo empregada no controle do crescimento bacteriano, incluindo os multirresistentes. Nesse contexto estudos com nanopartículas de diferentes elementos, principalmente metais, como: prata, ouro e ferro, apresentam desejável atividade antimicrobiana. Outro elemento que vem se destacando é o selênio (Se), cuja nanopartículas possui alta bioatividade e ação antibacteriana. Portanto, o objetivo do trabalho foi realizar a biossíntese de nanopartículas de selênio (SeNps) a partir de extratos de três plantas: *Allium cepa* (cebola), *Malpighia emarginata* (Acerola), e *Vernonia condensata* (boldo-baiano). As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas por *dynamic light scattering* (DLS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram utilizadas. A atividade antibacteriana foi avaliada pelos métodos de microdiluição em caldo e curva de sobrevivência contra cepas padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) BEC 9393, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os efeitos citotóxicos das SeNps sintetizadas foram avaliados através da capacidade hemolítica. As SeNps apresentaram tamanho entre 219 a 340 nm e morfologia majoritariamente esférica, também tiveram ação contra todas as bactérias Gram positivas com CIM variando de 6,125 a 98 µg/ml, porém sem ação nas Gram negativas testadas. E em relação à hemólise as CC50 variaram de 0,82 a 2,1 mg/ml. Esses resultados indicam que elas podem ser usadas contra bactérias Gram positivas por possuírem boa atividade antimicrobiana, além de possuírem baixa concentração hemolítica abrindo uma grande variedade de opções para suas aplicações.

**Palavras-chave:** antibacteriano; nanotecnologia; biossíntese.

SOUZA, Lucas Marcelino dos Santos, **Antibacterial activity of selenium nanoparticles synthesized from *Allium cepa*, *Malpighia emarginata* e *Vernonia condensata* extracts**. 2021. 64 p. Dissertation (Master's degree in Microbiology – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021).

## ABSTRACT

Bacterial resistance to antimicrobials is a major problem for public health and nanotechnology has been used to control bacterial growth, including multi-resistant ones. In this context, studies with nanoparticles of different elements, mainly metals, such as silver, gold and iron, have a desirable antimicrobial activity. Another element that stands out is selenium (Se), whose nanoparticles have high bioactivity and antibacterial action. Therefore, the objective of the work was to perform the biosynthesis of selenium nanoparticles (SeNps) from extracts from three plants: *Allium cepa* (onion), *Malpighia emarginata* (Acerola), and *Vernonia condensata* (boldo-baiano). The synthesized nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). Were used. Antibacterial activity was evaluated by broth microdilution and survival curve methods against standard strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) BEC 9393, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The cytotoxic effects of the synthesized SeNps were evaluated through hemolytic capacity. The SeNps had a size between 219 to 340 nm and mostly spherical morphology, also had action against all Gram-positive bacteria with MIC ranging from 6.125 to 98 µg/ml, but without action in the tested Gram-negative. Regarding hemolysis, CC50s ranged from 0,82 to 2,1 mg/ml. These results indicate that they can be used against Gram-positive bacteria because they have good antimicrobial activity, in addition to having a low hemolytic concentration, opening a wide variety of options for their applications.

**Key-words:** antibacterial; nanotechnology; biosynthesis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura molecular da quercetina .....	20
<b>Figura 2</b> – Gráfico da curva padrão de glicose.....	30
<b>Figura 3</b> – Síntese de nanopartícula de selênio com extratos de cebola + acerola e boldo + acerola no dia 0. ....	32
<b>Figura 4</b> – Síntese de nanopartícula de selênio com extratos de cebola + acerola e boldo + acerola no dia 3. ....	33
<b>Figura 5</b> – Síntese de nanopartícula de selênio com extratos de cebola + acerola e boldo + acerola no dia 6. ....	34
<b>Figura 6</b> – Imagens da microscopia eletrônica de varredura das SeNps produzidas com sal da marca S. ....	35
<b>Figura 7</b> – Imagens da microscopia eletrônica de varredura das SeNps produzidas com sal da marca A. ....	36
<b>Figura 8</b> – Tamanho médio das SeNps medidas por software ImageJ das imagens de microscopia eletrônica de varredura. ....	39
<b>Figura 9</b> – Tamanho médio das SeNps medidas por software ImageJ das imagens de microscopia eletrônica de varredura. ....	40
<b>Figura 10</b> – Tamanho médio hidrodinâmico das SeNps realizadas por DLS .....	42
<b>Figura 11</b> – Gráficos curva de sobrevivência de <i>S. agalactiae</i> em contato com as SeNps. ....	47
<b>Figura 12</b> – Gráficos curva de sobrevivência de <i>S. aureus</i> em contato com as SeNps. ....	48
<b>Figura 13</b> – Gráficos curva de sobrevivência de <i>S. aureus</i> BEC9393 em contato com as SeNps. ....	49
<b>Figura 14</b> – Gráfico do teste de hemólise.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição da cebola .....	20
<b>Tabela 2</b> – Concentrações de composto fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas .....	22
<b>Tabela 3</b> – Concentração de açúcares totais e redutores presentes nos extratos de acerola, boldo e cebola .....	30
<b>Tabela 4</b> – Tamanho médio das SeNps medidas por software ImageJ das imagens de microscopia eletrônica de varredur .....	38
<b>Tabela 5</b> – Tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta das SeNps realizadas por DLS .....	41
<b>Tabela 6</b> – Concentração inibitória mínima das nanopartículas de selênio produzidas com selenito de sódio da marca S .....	45
<b>Tabela 7</b> – Concentração inibitória mínima das nanopartículas de selênio produzidas com selenito de sódio da marca A .....	45
<b>Tabela 8</b> – CC50 das SeNps feito por regressão linear .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

b10a	Síntese feita com extrato de boldo a 10 mM de selenito de sódio da marca A
b10s	Síntese feita com extrato de boldo a 10 mM de selenito de sódio da marca S
b20a	Síntese feita com extrato de boldo a 20 mM de selenito de sódio da marca A
b20s	Síntese feita com extrato de boldo a 20 mM de selenito de sódio da marca S
BHI	Brain Heart Infusion
c10a	Síntese feita com extrato de cebola a 10 mM de selenito de sódio da marca A
c10s	Síntese feita com extrato de cebola a 10 mM de selenito de sódio da marca S
c20a	Síntese feita com extrato de cebola a 20 mM de selenito de sódio da marca A
c20s	Síntese feita com extrato de cebola a 20 mM de selenito de sódio da marca S
CBM	Concentração bactericida mínima
CC50	Concentração citotóxica que inviabiliza 50% das células
CIM	Concentração inibitória mínima
DLS	Espalhamento de luz dinâmico( Dynamic Light Scattering)
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
LPS	lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MH	Mueller-Hinton
MHA	Ágar Muller-Hinton
PBS	Tampão fosfato-salino
Pdl	Índice de polidispersividade (Polydispersity Index)
pH	Potencial Hidrogeniônico
Se	Selênio
SeNps	Nanopartícula de selênio
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	SELÊNIO .....	13
2.1.1	DISPONIBILIDADE GLOBAL.....	14
2.1.2	Formas de Se Encontradas .....	14
2.1.3	Nanopartículas de Selênio.....	15
2.1.4	Possíveis Mecanismos de Ação .....	15
2.1.5	Tipos de Síntese das Nanopartículas .....	16
2.2	PLANTAS DE INTERESSE .....	18
2.2.1	<i>Allium cepa</i> (Cebola) .....	18
2.2.2	<i>Vernonia condensata</i> (Boldo) .....	20
2.2.3	<i>Malpighia emarginata</i> (Acerola).....	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
4.1	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS .....	24
4.2	QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES NOS EXTRATOS .....	24
4.3	SÍNTESE DAS SENPs .....	25
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULA .....	25
4.4.1	ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (DYNAMIC LIGHT SCATTERING, DLS) .....	25
4.4.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	25
4.5	CEPAS TESTADAS .....	26
4.6	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) .....	26
4.7	CURVA DE SOBREVIVÊNCIA .....	27
4.8	TESTE DE HEMÓLISE .....	27
4.9	ESTATÍSTICA .....	28

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	29
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SENPS	29
5.1.1	Síntese das Nanopartículas	31
5.1.2	Imagens da Microscopia Eletrônica (MEV)	31
5.1.3	DLS	37
5.2	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	43
5.2.1	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima	43
5.2.2	Curva de Sobrevivência	46
5.3	TESTE DE HEMÓLISE	50
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	54
	<b>REFERÊNCIAS</b>	55
	<b>ANEXOS</b>	60
	ANEXO A -PARECER SUBSTANCIADO DO CEP	61

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias resistentes aos antimicrobianos são uma grande preocupação e se tornaram um problema a nível global de grande complexidade. Sendo algumas das consequências desse problema: a dificuldade e encarecimento do tratamento de pacientes com infecções e elevação da taxa de mortalidade e morbidade dos afetados causando impacto negativo na economia e em setores da saúde.

As medidas relacionadas a sua solução consistem, principalmente, no desenvolvimento de compostos e terapias alternativas, além de políticas de conscientização da utilização de antibióticos, estudos epidemiológicos da aquisição de resistência por bactérias e monitoramento de casos de bactérias multirresistentes ( MACK; BELICKI, 2019)

A produção de terapias com novos compostos vem mostrando-se uma grande ferramenta no combate a esse problema. Principalmente, compostos de origem natural e relacionados à nanotecnologia como, por exemplo, nanopartículas de prata, ouro e selênio com propriedades antimicrobianas (NGUYEN et al., 2017; SCANDORIEIRO et al., 2016; SHAMAILA et al., 2016).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo realizar a biossíntese de nanopartículas de selênio (SeNps) com diferentes extratos de plantas, caracterizá-las e analisar sua atividade antimicrobiana frente a algumas cepas bacterianas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SELÊNIO

O elemento químico selênio (Se) foi descoberto pelo químico Jacob Berzelius em 1817 na Suécia. Ele trabalhava em uma fábrica produtora de ácido sulfúrico e ácido nítrico que produzia sedimentos em seu processo de síntese, e ao analisar esses sedimentos, encontrou um composto vermelho que chamou sua atenção (ZHANG, 2019)

O químico verificou que o sedimento continha uma mistura de telúrio e um elemento desconhecido na época, o qual o nomeou de selênio devido a palavra grega *selene* que significa lua. Provavelmente, o nome teve relação ao telúrio, encontrado junto ao selênio no sedimento, derivado da palavra grega *tellus* que significa terra (ZHANG, 2019).

O selênio pertence ao grupo dos calcogênios (grupo 16) na tabela periódica, onde também são encontrados: oxigênio, enxofre, telúrio, polônio e livermório. Possui características fotoelétricas e semicondutoras bem definidas e pode ser utilizado em muitas áreas da indústria, principalmente na confecção de componentes eletrônicos, células solares, metalúrgica, produção de vidro e fabricação de pigmentos (MASTALERZ et al., 2004; ZHANG et al., 2004). Além de sua grande importância na indústria, o Se também é um micronutriente essencial para o metabolismo dos animais, participa de vias antioxidantes, aumenta a função do sistema imunológico e melhora a função da tireoide contra doenças cardíacas (SCHWARZ; FOLTZ, 1957).

Devido a sua grande importância biológica, o Se é bem visado pela indústria farmacêutica (HATFIELD; BERRY; GLADYSHEV, 2011; HOLUBOVÁ et al., 2006). Como é um micronutriente essencial sua ingestão diária recomendada é próxima a 300 µg / dia, entretanto sua janela terapêutica é baixa, sendo a ingestão acima de 950 µg / dia considerada tóxica (FILIPPINI et al., 2018; YANG et al., 1989). Além disso, é utilizado como complemento nutricional, sua deficiência pode afetar a espermatogênese ocasionando queda na qualidade dos espermatozoides.

### 2.1.1 DISPONIBILIDADE GLOBAL

O Se é encontrado na litosfera, atmosfera e hidrosfera e sua distribuição varia muito entre as localidades. A principal forma de liberação e espalhamento de selênio no ambiente se dá pela erosão de rochas contendo o minério, emissão de gases vulcânicos e decomposição de material orgânico rico em Se, que produz compostos voláteis como seleneto de hidrogênio e óxido de selênio (KIELISZEK, 2019).

A média global da concentração de Se presente na superfície varia de 0,22 a 2 mg/kg de solo. Regiões temperadas possuem uma quantidade maior do elemento, já áreas áridas e semiáridas possuem deficiência do mesmo, algumas áreas deficitárias são: Argentina, China, Chile, África do sul e sudoeste dos Estados Unidos (DOS REIS et al 2017; MASON et al., 2018)

Em algumas dessas regiões, são reportadas doenças causadas pela baixa ingestão do elemento. Na China, por exemplo, foi registrada a doença de Keshan (KD), primeiramente, vista no município de Keshan em 1935 e ela consiste em uma cardiomiopatia ( ZHOU et al., 2018)

### 2.1.2 Formas de Se Encontradas

O Se possui diversas formas sendo elas inorgânicas como: selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), selenido ( $\text{Se}^{2-}$ ) e selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) e orgânicas como: selenometionina e selenocisteína que compõem aproximadamente 25 selenoproteínas. (DHANJAL; CAMEOTRA, 2010).

As mudanças de estado das formas inorgânicas são influenciadas por diversos fatores como: pH, umidade, concentração de oxigênio e potencial redox. Basicamente, em ambientes ácidos e com oxigênio, há a formação de compostos mais oxidados, já em ambientes com menos oxigênio e pH alcalino os compostos menos oxidados são mais produzidas (KIELISZEK; BŁAŻEJAK, 2016).

Já em relação às selenoproteínas as principais identificadas são: a glutathione peroxidases (GSH-Px), tioredoxina redutases (TRXR) e tetraiodotironina desidase (DIO). A GSH-Px possui grande importância no organismo com sua função antioxidante que protege as células contra agentes oxidantes que podem

ocasionar processos mutagênicos e/ou promover a morte celular, já a TRXR é necessária para regulação do sistema redox de inúmeros processos celulares, em relação à DIO são um grupo de enzimas importantes na regulação do hormônio da tireoide triiodotironina (T3), essa enzima tem ação clivando tiroxina (T4) em T3 aumentando sua disponibilidade no organismo, sem ela podem ocorrer inúmeras disfunções metabólicas no corpo (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2008).

Além das formas apresentadas, o Se também pode adquirir características de nanopartículas (SeNps). Nanopartículas são partículas em escala nanométrica sendo comumente apresentadas com tamanhos variando de 1 – 100 nm, no entanto muitos autores consideram partículas até 1000 nm como nanopartículas ou nanomateriais. Elas possuem características físico-químicas distintas do elemento em escala macro como: ponto de fusão, condutibilidade elétrica/térmica e absorção luminosa possibilitando seu uso em inúmeros campos da ciência (JEEVANANDAM et al., 2018).

### 2.1.3 Nanopartículas de Selênio

As SeNps possuem uma grande biodisponibilidade e uma toxicidade menor em comparação às demais formas inorgânicas e orgânicas (MENON et al., 2018).

Por apresentar tais características, sua ação antimicrobiana já foi testada mostrando-se relevante contra *Staphylococcus aureus* (NGUYEN et al., 2017). Khiralla e El-Deeb (2015) verificaram que as SeNps produzidas com o sobrenadante de *Bacillus licheniformis* apresentaram ação contra 6 bactérias patogênicas de origem alimentar, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. Estudos com SeNps estabilizadas com quercetina e acetilcolina também foram feitos e mostraram grande atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E.coli* (HUANG et al., 2016).

### 2.1.4 Possíveis Mecanismos de Ação Antimicrobiana

Os reais mecanismos de ação das SeNps ainda não estão totalmente elucidados, no entanto, existem algumas hipóteses de como ocorre essa atividade antimicrobiana. Huang et al (2019) constataram a produção de EROs, depleção de ATP e mudança de polaridade da membrana em *S. aureus*, após tratamento com

SeNps. As EROs podem lesar o DNA, membrana e proteínas da bactéria inibindo seu metabolismo e conseqüentemente levando-a à morte.

#### 2.1.5 Tipos de Síntese das Nanopartículas

A produção de nanopartículas possui duas principais classificações: *Bottom-up* (de baixo para cima) e *Top-down* (de cima para baixo). A síntese *top-down* ocorre com moléculas grandes que são degradadas para formarem partículas em escala nanométrica. Normalmente, são empregados métodos de moagem e deposição física de vapor. Já a abordagem *bottom-up* é feita a partir de íons que são reduzidos, se aglomeram e formam as nanopartículas (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Na síntese *bottom-up* é necessário que haja um agente redutor e moléculas de revestimento. O agente reduz os íons para seu estado elemental, essas partículas se juntam criando um centro de nucleação, à medida que ocorre a redução do precursor de selênio o centro de nucleação começa crescer, para que não ocorra o crescimento indefinido dessa nanopartícula há a adição das moléculas de revestimento que controlam o tamanho das nanopartículas produzidas. (IRAVANI et al., 2014; KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

A produção de nanopartículas também pode ser dividida em: química, física ou biológica (IKRAM et al., 2021).

A síntese química utiliza-se de reagentes químicos para reduzir os íons precursores presentes no sal e sintetizar nanopartículas, é um método rápido que não produz muitas diferenças entre os lotes fabricados, no entanto, pode ocorrer a produção ou descarte de produtos tóxicos ao meio ambiente, pois muitos reagentes utilizados são ou podem se tornar tóxicos. A utilização de síntese química para produção de SeNps é, normalmente, feita com ácido ascórbico e algum polímero como glucomannan ou quitosana (IKRAM et al., 2021).

Já a síntese física não utiliza reagentes químicos, mas utiliza equipamentos caros e há um maior gasto energético no processo de síntese, a ablação por laser pulsado é um exemplo de síntese física, já a fotocatalítica é um processo de síntese físico-química (CHAUDHARY; UMAR; MEHTA, 2016).

A técnica de ablação por laser é feita com um equipamento que emite feixes de laser pulsado de alta energia focado na amostra. Quando o feixe de luz atinge o material, ele cria diversas microexplosões na superfície da amostra liberando micro e nanopartículas, portanto, além de física também pode ser classificada como *Top-down* (AMENDOLA; MENEGHETTI, 2009). Esse método, segundo Quintana et al. (2002), pode ser facilmente ajustado conforme a necessidade de tamanho, forma e densidade da nanopartícula sintetizada, além de ser utilizado para obtenção de selênio trigonal com alta pureza.

O método fotocatalítico é feito com ajuda de um Reagente catalisador sensível à luz que promove uma série de reações de oxidorredução ao sofrer irradiação luminosa. A síntese acontece à temperatura ambiente em poucos segundos e é possível controlar o tamanho das SeNps (CHAUDHARY; UMAR; MEHTA, 2016). Triantis et al. (2009) sintetizaram SeNps utilizando esse método, eles irradiaram uma solução contendo polioxometalato (catalisador), promovendo sua redução, adicionaram selenito de sódio agitando por 3 s e obtiveram SeNps com 60 nm.

A síntese biológica, biogênica, verde ou biossíntese recebe esse nome por ser produzida, principalmente, por bactérias, fungos e extratos de plantas. É considerada “*eco friendly*” por não produzir resíduos tóxicos. No entanto, a taxa de fidelidade entre os lotes pode sofrer variações devido a diferenças na composição dos extratos dependendo das características do cultivo do microrganismo ou da época de plantio e colheita da planta utilizada.

Muitos microrganismos são capazes de produzir nanopartículas metálicas, o selênio, por exemplo, pode ser reduzido por *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus terreus*, *Enterococcus faecalis* e inúmeros outros (SHOEIBI; MASHEREGHI, 2017 ; ZARE et al., 2013).

Alguns microrganismos são capazes de promover a redução do  $\text{Se}^{+4}$  para  $\text{Se}^0$  (selênio elemental), sendo que na natureza essa redução ocorre como mecanismo de defesa contra o selênio para transformá-lo em uma forma menos tóxico (HOSNEDLOVA et al., 2018)

Os microrganismos capazes de realizar a redução o fazem por meio de diversas enzimas que determinam as diferentes características morfológicas das

SeNps, resultando em nanopartículas complexas e exclusivas, impossível, muitas vezes, de se conseguir através da síntese química (OREMLAND et al., 2004).

Já a síntese com extratos de plantas possui algumas vantagens em relação às outras, ela não requer condições especiais como, por exemplo, o cultivo de microrganismos, equipamentos sofisticados nem reagentes tóxicos.

Para realizar a biossíntese com extratos de plantas é necessário verificar a capacidade redutora do extrato, caso seja fraca ou insuficiente é necessário a adição de algum tipo de redutor que supra essa carência, analisar as possíveis moléculas de revestimento presentes no extrato, pois de acordo com o objetivo da síntese o revestimento das nanopartículas é crucial.

Existem na literatura biossínteses feitas com extratos de *Allium sativum* (alho), folhas de limão, feno grego, folhas de *Terminalia arjuna*, entre outros (EZHUTHUPURAKKAL et al., 2017; PRASAD et al 2014; PRASAD et al., 2013; RAMAMURTHY et al., 2013;

Por apresentar grandes vantagens, principalmente ao minimizar impactos ao meio ambiente e ser de fácil realização, a síntese verde com extratos de plantas vem sendo bastante visada e focada nas pesquisas (HOSNEDLOVA et al., 2018).

## 2.2 PLANTAS DE INTERESSE

### 2.2.1 *Allium cepa* (Cebola)

*Allium cepa*, popularmente conhecido como cebola, é uma planta herbácea com folhas tubulares e lisas, possui um bulbo grande formado pelas bainhas das folhas que se sobrepõem, essa estrutura é responsável pelo armazenamento de nutrientes.

É considerada uma cultura anual para produção de bulbos e seu plantio ocorre em uma extensa área do território brasileiro (TRANI; BRESA; FACTOR, 2014). Tendo o Brasil a oitava maior produção de cebola, sendo China e Índia as primeiras (BARBOSA et al., 2018).

A cebola é rica em vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina), tendo quantidades medianas de vitamina C (ácido ascórbico) como visto na Tabela 1 e possui inúmeros minerais (REIS FILGUEIRA et al, 2000). Também possui grandes

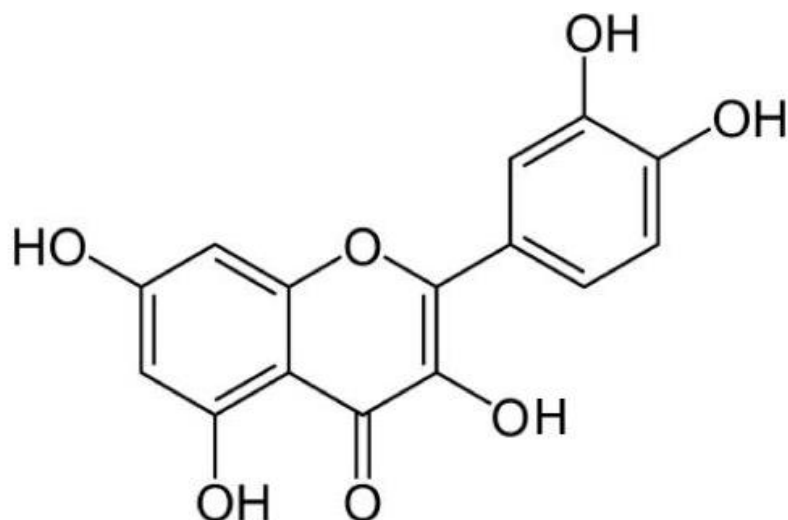
quantidades de flavonoides como: antocianinas (presentes na cebola roxa) e quercetina (promove a coloração amarelada da cebola) (COSTA; DE RESENDE, 2007).

Devido a esses compostos, e muitos outros não listados, a cebola pode ser usada no tratamento de aterosclerose, câncer, obesidade, hipertensão e diabetes (MURAYYAN et al., 2017; RABINOWITCH; CURRAH, 2002). A quercetina (Figura 1), encontrada em grandes quantidades na cebola, é um flavonoide polifenólico, que quando purificado tem aspecto de pó amarelado, possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica e antimicrobiana (GALO et al., 2018). Na literatura, já existem relatos de SeNps sintetizadas com quercetina purificada que demonstraram aumento da atividade antimicrobiana contra *S.aureus* em comparação às nanopartículas revestidas com acetilcolina (HUANG et al, 2016).

Nanopartículas metálicas produzidas com extrato de cebola já foram reportadas. Wu et al. (2019) sintetizaram nanopartículas de óxido de zinco com extrato aquoso de cebola e verificaram sua ação protetora em queratinócitos contra raios UVB. Gomaa (2017) biossintetizou nanopartículas de prata com extrato aquoso de cebola e constatou atividade antibacteriana contra diversas bactérias Gram positivas e negativas. Jini et al. (2020) sintetizaram nanopartículas de prata e testaram sua atividade antidiabética, mostrando-se uma alternativa no tratamento da doença.

Como visto, existem vários trabalhos com diferentes finalidade acerca da produção de nanopartículas metálicas com extrato de cebola, essa variedade se deve às muitas substâncias/moléculas com diferentes propriedades farmacêuticas presentes na planta.

Figura – 1 Estrutura molecular da quercetina



Fonte: MARUNAKA et al. (2017)

Tabela 1: Composição da cebola (cada 100 g)

Componentes	Quantidade
Proteína	1,60 g
Cálcio	32,00 mg
Fosforo	44,00 mg
Ferro	0,50 mg
Vitamina A	120 U.I.
Tiamina	50 µg
Riboflavina	50 µg
Niacina	0,50 mg
Vitamina c	32,00 mg

Fonte: REIS FILGUEIRA(2000)

### 2.2.2 *Vernonia condensata* (Boldo)

A *Vernonia condensata*, também conhecida como boldo baiano, pertence à família Asteraceae. É uma árvore de porte pequeno que atinge até 5 metros de altura com ciclo de vida perene. Encontra-se distribuída no Brasil nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (VICENTE et al., 2009). E pode ser utilizada

como analgésico, antiinflamatório antitérmico, antibacteriano e digestiva (DA SILVA et al., 2011).

Suas atividades farmacológicas são atribuídas principalmente à presença de saponinos, taninos, alcaloides, compostos fenólicos e flavonoides (LOPES; DA CAMARA; DE MORAIS, 2019). Com relação à sua atividade antibacteriana, alguns trabalhos analisaram a ação dos extratos etanólicos e metanólicos das folhas do boldo contra Gram positivas e negativas tendo melhor atividade em *S. aureus* com concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de 10 e 5 mg/ ml para cada extrato respectivamente (BRASILEIRO et al., 2006; FABRI et al., 2011).

No entanto, apesar do amplo espectro de aplicações do boldo baiano em diversas áreas, não há, até o presente momento, estudos a respeito de sua utilização como extrato para a síntese de nanopartículas metálicas.

### 2.2.3 *Malpighia emarginata* (Acerola)

A *Malpighia emarginata* conhecida como acerola, é um fruto de uma arvoreta de até 3 metros de altura originária das ilhas do Caribe, Américas do sul e central ( RITZINGER: RITZINGER, 2011). A acerola é uma das frutas com maior teor de ácido ascórbico (Tabela 2) tendo cerca de 3% do peso de sua polpa composta de vitamina C. Possui também em sua composição carotenoides, antocianina, tiamina, riblofavina niacina e alguns minerais (ALVAREZ-SUAREZ et al. 2017).

A quantidade das substâncias presentes na acerola depende dos cultivares analisados e o estágio de sua maturação. Os compostos presentes na fruta possuem atividade antioxidante, principalmente o ácido ascórbico, além de atividade anti-inflamatória que diminui o risco de doenças vasculares e previne doenças (LEFFA et al 2017).

A síntese de nanopartículas metálicas utilizando extratos de acerola já foi descrita. Kumar et al. (2020) sintetizaram nanopartícula de óxido de cobre e relataram sua atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*. Kiruba et al. (2015) produziram nanopartículas de prata com tamanho médio de 10 nm com o objetivo de usá-las em conjunto com carvão para filtragem de água.

Como visto, a polpa de acerola possui grandes quantidades de ácido ascórbico viabilizando-a como uma grande candidata na produção de nanopartículas metálicas.

Tabela 2: Concentrações de composto fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas.

Amostras	Compostos fenólicos (mg/g de fruto)	Ácido ascórbico (mg/100 g de fruto)
Acerola in natura	14,89 ± 1,01	1457,69 ± 279,92
Acerola polpa congelada	10,79 ± 0,31	778,1 ± 74,13
Caju	2,48 ± 0,15	219 ± 29,48
Caju polpa congelada	2,34 ± 0,11	153 ± 43,99
Morango in natura	2,41 ± 0,02	71,8 ± 9,22
Morango polpa congelada	2,29 ± 0,00	44,4 ± 8,55
Goiaba in natura	1,24 ± 0,04	218 ± 45,77
Goiaba polpa congelada	1,56 ± 0,06	69,7 ± 2,71

Fonte: FREIRE et al.(2013)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar uma metodologia de síntese verde de SeNps a partir de extratos de *Allium cepa*, *Malpighia emarginata* e *Vernonia condensata*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar a síntese de SeNps de acordo com a marca do sal precursor (selenito de sódio) , concentração de sal e extratos de plantas;

Caracterizar as SeNps sintetizadas quanto ao tamanho, forma, potencial zeta e polidispersividade;

Avaliar a atividade antimicrobiana e cinética de atuação das SeNps;

Verificar a hemólise das nanopartículas produzidas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Foram comprados no comércio 100 g de polpa de acerola (*Malpighia emarginata*) (Polpasul), e 200 g de cebola roxa (*Allium cepa*). O boldo baiano (*Vernonia condensata*) foi colhido, lavado em água destilada e seco. Foram produzidos três extratos hidroalcoólicos com etanol (Merck) a 80 % (v/v), sendo um extrato para cada planta citada. As plantas (polpa de acerola, folha de boldo e bulbo de cebola) foram colocadas separadamente, cada uma em uma solução hidroalcoólica, na proporção de 100 g de planta para 100 ml de solução. Em seguida, foram trituradas em liquidificador e deixadas macerando por 48 h com agitação esporádicas a cada 24 h. Posteriormente, os extratos foram filtrados em papel filtro e filtro de 0,22 µm (MF-Millipore) e estocados na geladeira com temperatura de 4 °C para realização dos testes.

### 4.2 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES NOS EXTRATOS

A quantificação de açúcares totais foi feito de acordo com Santos et al. (2017) e Maldonade, De Carvalho, Ferreira (2013), com modificações. Para açúcares totais, 1 ml das amostras (extratos de cebola, extrato de boldo e extrato de acerola) foram tratadas com 1 ml de HCl (2 N) (Merck), colocadas em banho maria fervente por 10 min, resfriadas em gelo e acrescidas de 1 ml de NaOH (2 N) (Merck). Foram colocados 25 µl das amostras tratadas e não tratadas (para açúcares redutores), todas diluídas 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100, em microplaca de polietileno de 96 poços (Kasvi), junto de 25 µl de reagente DNS (1 % ácido 3,5-dinitrosalicílico e 30 % tartarato duplo de sódio e potássio em 0,4 mol/l de NaOH).

Para a curva padrão, foram feitas cinco concentrações de glicose (0,5 a 2,5 mg/ml) e colocadas com o DNS. A microplaca com as amostras e glicose foi fechada com filme adesivo para microplacas (Axygen), colocada em banho fervente por 5 min, resfriada em gelo e adicionado 250 µl de água destilada em todos os poços. Em seguida, foi feita a leitura dos poços em espectrofotômetro (Biotech Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader) em 490 nm.

### 4.3 SÍNTESE DAS SENPS

Como precursor de Se, foi utilizado selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) de duas marcas (A e S). Foi realizada uma solução estoque de selenito de sódio 0,3 M de ambas as marcas com água destilada, as soluções foram filtradas em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (MF-Millipore) e estocados na geladeira.

Foram realizadas oito sínteses diferentes, quatro sínteses utilizando selenito de sódio da marca S e quatro da marca A em concentrações de 10 e 20 mM com duas combinações de extratos (boldo + acerola e cebola + acerola). Para a síntese com os extratos de boldo + acerola, o extrato de boldo foi adicionado em agitador magnético junto com o selenito de sódio para concentração final do sal de 10 e 20 mM. A solução foi agitada por 30 s, ainda em agitação, foi colocado, paulatinamente, o extrato de acerola na proporção de 1:1 com a solução, ajustou-se o pH para 7 e a solução foi deixada na estufa à 30 °C por 6 dias. Para a síntese com os extratos de cebola + acerola foi realizado o mesmo processo descrito anteriormente apenas com a substituição do boldo pela cebola.

As sínteses foram nomeadas com a primeira letra do extrato utilizado, seguido da concentração de sal e da marca do sal, portanto, b10s se refere a síntese feita com boldo + acerola na concentração de 10 mM com sal da marca S. c20a se refere a síntese com extrato de cebola + acerola com sal na concentração de 20 mM da marca A e assim por diante, as outras abreviações seguem o mesmo padrão.

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

#### 4.4.1 Espalhamento Dinâmico da Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS)

A mensuração da média do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas acompanhado do potencial zeta e índice de polidispersividade (Pdl) foi realizada por DLS, as amostras foram enviadas para Universidade Federal do ABC para serem analisadas no equipamento ZetaSizer Nano ZS, Malvern® Brasil.

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

Foi realizada a verificação da morfologia e tamanho através da MEV, as amostras de SeNps sintetizadas foram diluídas com água deionizada a uma concentração de 1 mM, alíquotas de 10  $\mu\text{l}$  foram colocadas em lâminas revestidas

com poli lisina (1 %) e deixadas secar. Posteriormente, foram fixadas com 0,1 M de solução tampão de cacodilato de sódio (Merck) (pH 7,2) com 2 % de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) e 2 % de paraformaldeído (Merck) por 20 h e pós fixadas com tetróxido de ósmio (Merck) a 1 % por 2 h. As lâminas, após todo procedimento de fixação, foram expostas às concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100 °GL) para desidratação. Após isso, foram submetidas à desidratação por ponto crítico com CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), cobertas com ouro (BALTEC SDC 050 SputterCoate) e analisados em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

#### 4.5 CEPAS TESTADAS

Foram utilizadas cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) BEC 9393, pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da UEL. As amostras foram estocadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Acumedia) contendo 20% de glicerol (Sigma-Aldrich) à -80 °C.

#### 4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Foi realizado o teste de microdiluição em caldo para obter as CIMs das SeNps sintetizadas frente as cepas já citadas de acordo com *Clinical & Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2015) com algumas modificações. As cepas bacterianas de *S. aureus*, MRSA, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram semeadas em ágar *Muller-Hinton* (MHA) (Acumedia), enquanto que *S. agalactiae* foi semeada em ágar BHI. As bactérias semeadas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Foram retiradas de duas a cinco colônias bacterianas do ágar e adicionadas em salina (0,85 % de NaCl) obtendo a turbidez 0,5 da escala Mc Farland ou  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.

O teste de microdiluição foi realizado em placa de polietileno de 96 poços, 50 µl de caldo MH (Acumedia) foram adicionados em todos os poços, 50 µl das SeNps foram colocados nos primeiros poços totalizando 100 µl, com essa solução foram feitas diluições seriadas com 8 faixas de concentrações, variando de 1,5 a 196 µg/ml, ao final as salinas com as bactérias solubilizadas foram diluídas à

concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml em caldo MH. 50  $\mu$ l dessa solução bacteriana foi colocada em cada poço, completando assim a diluição dos compostos. A placa foi incubada a 37 °C por 18 a 24 h em estufa bacteriológica. Os testes foram realizados em triplicata contendo controle positivo (somente bactéria), controle de esterilidade (somente meio de cultura), controle dos extratos (apenas extratos sem nanopartículas) e controle do selenito de sódio (somente o sal selenito de sódio nas mesmas concentrações das nanopartículas), a leitura da CIM foi feita pela visualização da turbidez.

A CBM foi feito retirando uma alíquota de 10  $\mu$ l dos poços da placa após incubação, feito o plaqueamento em MHA e posterior contagem do número de colônias. Considera-se a CBM quando a quantidade de morte bacteriana for  $\geq 99,9$  % em 24 h de tratamento.

#### 4.7 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

O teste foi feito de acordo com NCCLS (1999). Todas as cepas foram cultivadas em meio MHA a 37°C, durante 18-24 h, exceto *S. agalactiae* que foi cultivado em ágar BHI. Colônias das culturas cultivadas foram suspensas em salina esterilizada (NaCl a 0,85 %) atingindo a turbidez 0.5 da escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). Em seguida, a suspensão bacteriana foi diluída em caldo MH obtendo  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL. As SeNps foram adicionadas à cultura bacteriana na concentração dos seus respectivos CIMs para cada cepa bacteriana diluindo a concentração bacteriana para  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Os tubos dos testes foram incubados a 37 °C. Alíquotas foram retiradas em diferentes tempos de incubação (0 h, 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 9 h, 12 h e 24 h) diluídas em salina e plaqueadas em triplicatas em ágar MH para a determinação da UFC/ml. Uma curva logarítmica de sobrevivência foi construída em função do tempo de incubação e tratamento.

#### 4.8 TESTE DE HEMÓLISE

O teste de hemólise foi feito de acordo com Izumi et al. (2012) com modificações. O sangue foi coletado de um doador humano saudável em tubos heparinizados com aprovação do comitê de ética humano (CAAE47661115.0.0000.5231, No. 1.268.019 – UEL) encontrado no anexo A. Os tubos com sangue foram centrifugados a 2700 g, 4 °C por 5 min. Após

centrifugação, o plasma foi descartado e as hemácias foram diluídas em PBS (pH 7,4) para ficarem a uma concentração de 6 % (v/v).

Foram colocados 100 µl de PBS em todos os poços de uma placa de 96 poços. Posteriormente, foram adicionados 100 µl de SeNps nos primeiros poços para realização de diluições seriadas. Após isso, 100 µl das hemácias a 6% foram adicionadas nos poços, promovendo a diluição das hemácias para 3 % e deixando as SeNps com concentrações finais de 1,5 a 196 µg/ml. A placa foi incubada a 37 °C por 3 horas. Após isso foi realizada a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro (Biotek Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader) no comprimento de 550nm. Foi utilizado como controle positivo o Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 1 % representando 100 % de hemólise e controle negativo apenas com hemácias e PBS, representando 0 % de hemólise.

#### 4.9 ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados em software PAST (4.03) foi realizado análise de variância (ANOVA) entre os grupos de dados e pós teste de Tukey, foram considerados estatisticamente significativo  $p < 0,05$ . Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SENPS

Foi determinada a concentração de açúcares totais e redutores nos extratos através da função  $y = 1,2224x - 0,1204$ , obtida por regressão linear da curva feita no software Excell (Figura 2). As concentrações encontradas estão na Tabela 3.

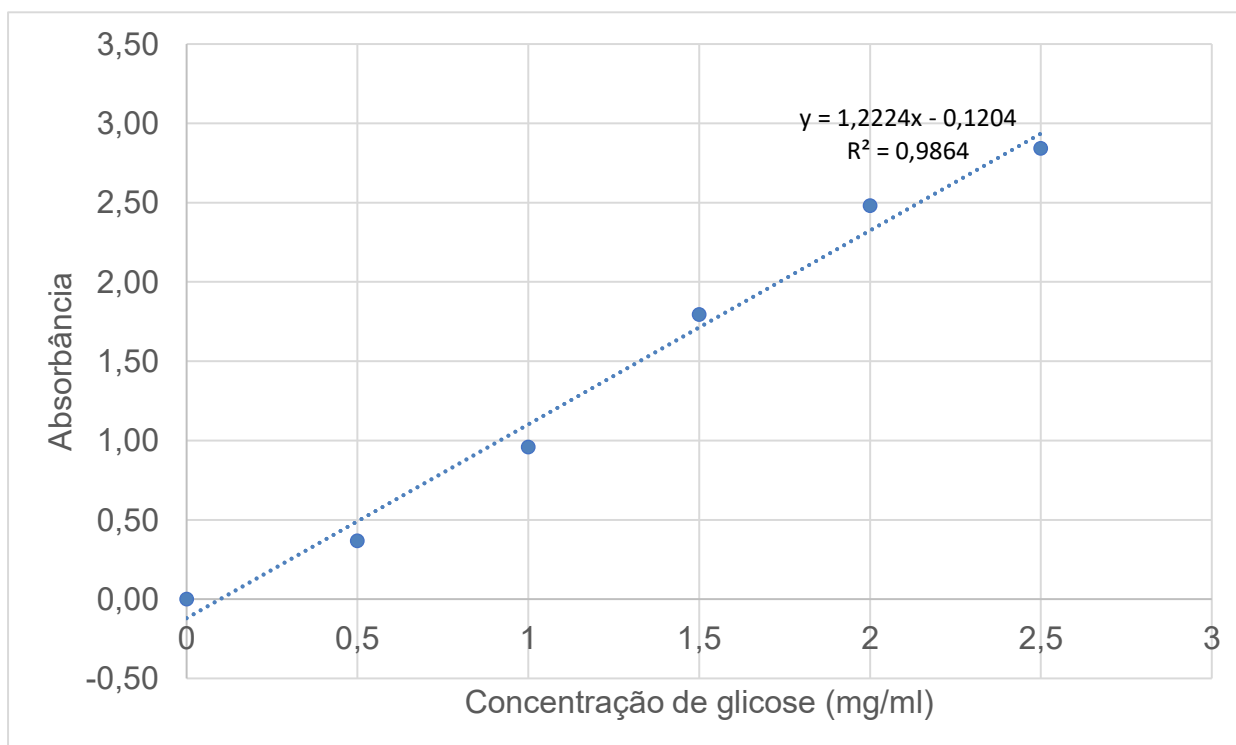
Como visto, as maiores concentrações de açúcares redutores estão presentes nos extratos de cebola e acerola. Apesar da grande quantidade de açúcares redutores, cerca de 29,9 mg/ml, o extrato de cebola sozinho não foi capaz de promover a redução dos íons de selênio em nanopartículas (a princípio, os extratos de cebola e boldo foram testados sozinhos quanto a sua capacidade de produzirem SeNps, mas não foram capazes de reduzir o  $Se^{+4}$  para  $Se^0$ ).

Foi necessário a adição de redutores mais fortes como ácido ascórbico (vitamina C), encontrado em frutas cítricas como o extrato da polpa de acerola, que possui uma grande quantidade de vitamina C variando próximo de 1-3 % da matéria da polpa (MOURA et al., 2018). O extrato de acerola foi escolhido para complementar o extrato de cebola e o extrato de boldo na síntese das nanopartículas por apresentar altas concentrações de agentes redutores e assim auxiliar na síntese de SeNps.

A cebola, mais especificamente a cebola roxa, e o boldo possuem altas quantidades de quercetina além de outros compostos. A quercetina é um flavonoide que possui atividade antimicrobiana contra algumas bactérias Gram positivas. A síntese química de SeNps estabilizadas com quercetina purificada já foi realizada e demonstrou eficácia antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli* (HUANG et al, 2016).

No presente trabalho, foram escolhidos 3 extratos, 1 por sua grande capacidade redutora (acerola) e os outros dois por apresentarem potencial estabilizante para as SeNps.

Figura 2 - Gráfico da curva padrão de glicose



Fonte: Próprio autor

Tabela .3: Concentração de açúcares totais e redutores presentes nos extratos de acerola, boldo e cebola

Extratos	Açúcares totais (mg/ml)	Açúcares redutores (mg/ml)
Acerola	22,04	22,00
Boldo	1,89	0,68
Cebola	37,20	29,90

Fonte: Próprio autor

### 5.1.1 Síntese das Nanopartículas

A síntese das SeNps foi acompanhada por 6 dias (Figuras 3, 4 e 5) observando a coloração da solução de selenito de sódio com os extratos. A mudança de cor da solução para vermelha indica a redução de  $\text{Se}^{+4}$  para  $\text{Se}^0$  (WANG et al., 2010). Essa mudança ocorreu com bastante intensidade no dia 3 (Figura 4) e não houve mudança de coloração entre os dias 3 e 6 (Figura 4 e 5), indicando o fim da síntese de SeNps. A coloração adquirida, também pode revelar a morfologia das nanopartículas, soluções vermelhas tendem a ser monocíclicas ou amorfas, soluções escuras e pretas tendem a apresentar formato trigonal, linear ou bastão (CAO et al., 2004; HO et al., 2010; DONG et al., 2014).

A síntese utilizada é classificada como biológica, também chamada de verde ou biossíntese, pode ser feita também com ajuda de microrganismos. Em relação à síntese química, a biossíntese tem um melhor custo benefício e é ambientalmente segura (SHOEIBI et al., 2017).

### 5.1.2 Imagens da Microscopia Eletrônica (MEV)

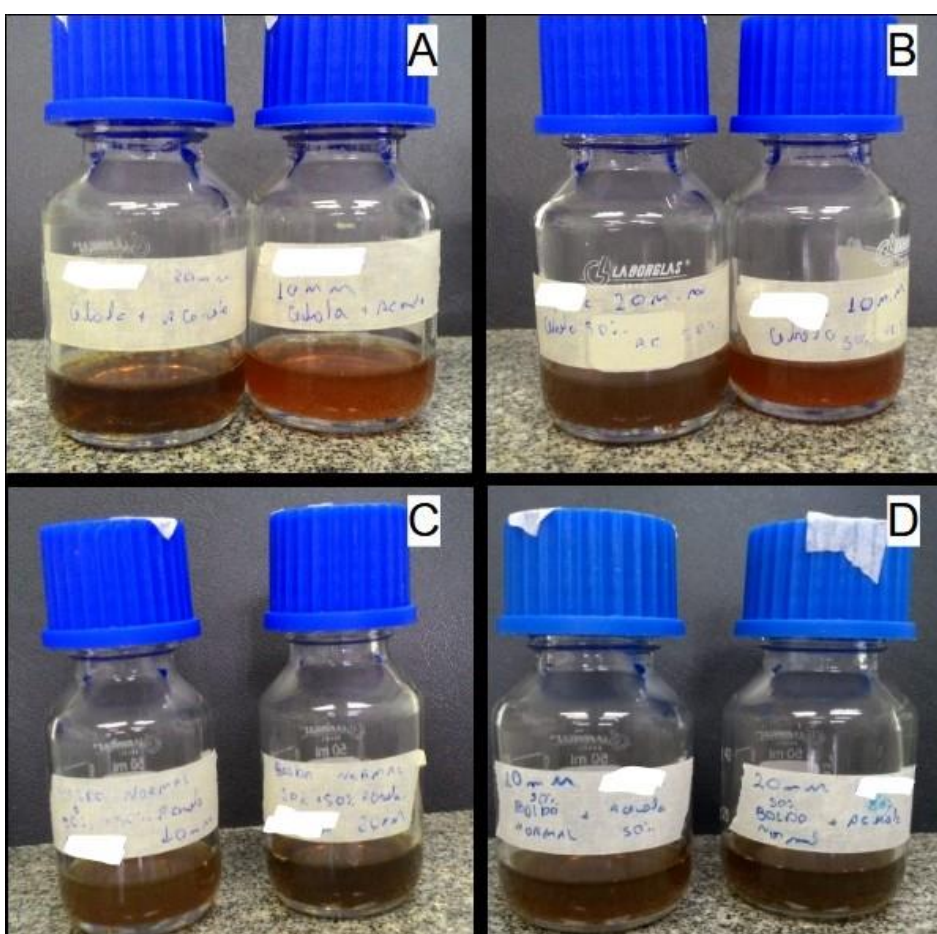
A caracterização foi feita por Microscopia eletrônica de varredura. As soluções sintetizadas (Figuras 6 e 7) foram analisadas quanto sua morfologia e tamanho, todas apresentaram morfologia aproximadamente esférica não demonstrando, visualmente, alterações de formas nos diferentes extratos, concentrações ou marcas dos sais utilizados.

O diâmetro das nanopartículas foi medido com software ImageJ variando de 219 a 340 nm, apresentados na Tabela 4 e Figura 8. Não houve diferença significativa  $p < 0.05$  relacionado ao tamanho médio das SeNps sintetizadas com as diferentes marcas de sais, indicando que em condições iguais, ou seja, com a utilização do mesmo extrato, temperatura, concentração de sal, pH e tempo de síntese há a produção de nanopartículas com tamanhos parecidos. No entanto, houve diferença significativa entre as SeNps produzidas com extrato de boldo na concentração de 10 mM das demais nanopartículas (Figura 9), provavelmente, as moléculas presentes no extrato de boldo com uma menor concentração de sal (10mM) permitam uma agregação maior e um crescimento aumentado em relação às encontradas no extrato de cebola nas mesmas condições.

Foram descritos na literatura tamanhos de SeNps de 250 nm, produzidas de forma biológica utilizando cloreto de selênio junto a *Klebsiella pneumoniae*, a bactéria promove a redução do selênio e produz proteínas que atuam como revestimento estabilizando a síntese (FESHARAKKI et al., 2010).

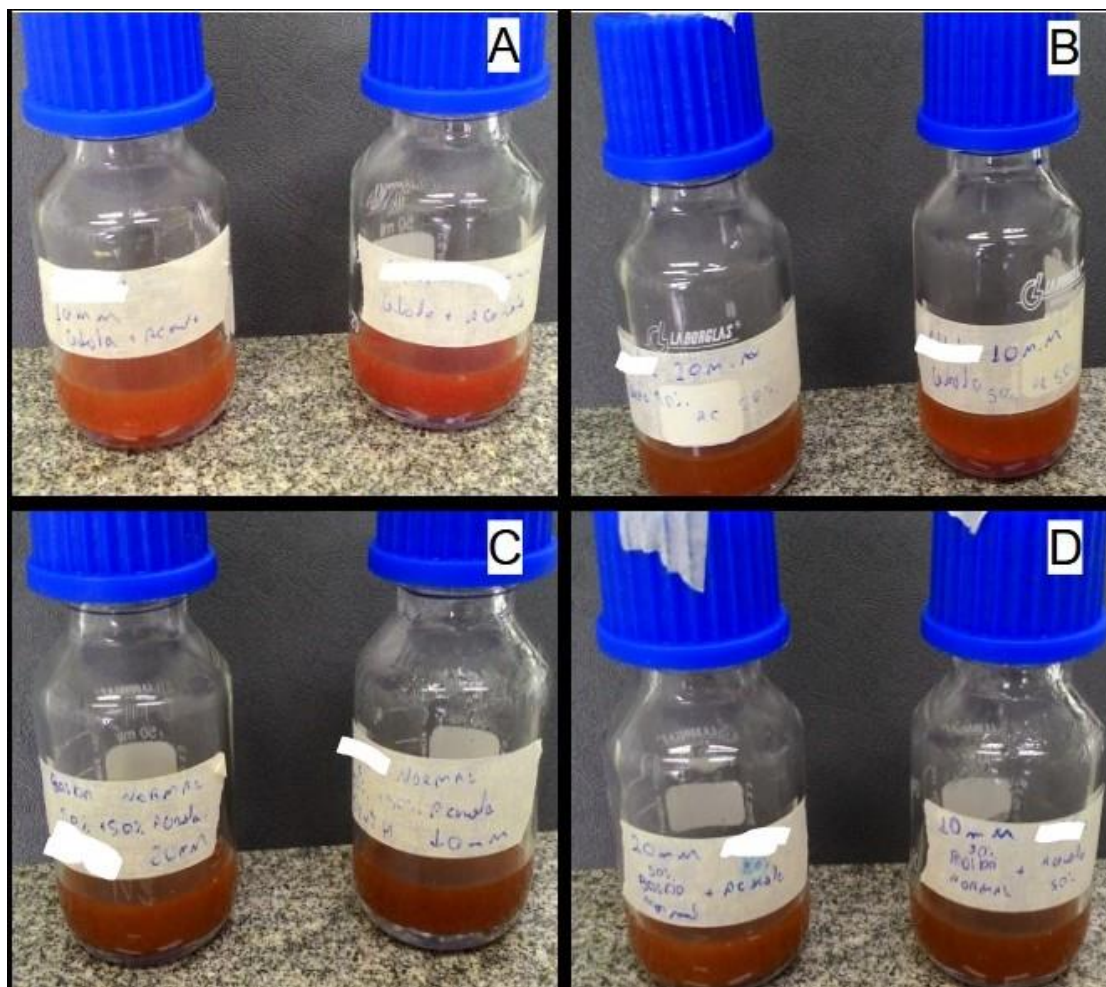
Outro estudo utilizando extrato de feno grego e ácido ascórbico produziu nanopartículas com tamanhos entre 50 e 150 nm (RAMAMURTHY et al., 2013). Prasad et al (2013) utilizaram folhas de limão para sintetizar SeNps de aproximadamente 80 nm. Como pode ser visto, o tamanho das nanopartículas produzidas é influenciado pelo tipo de agente redutor e estabilizantes utilizados que, no caso da síntese verde com plantas, são encontrados nos extratos.

Figura 3 – Síntese de nanopartícula de selênio com extratos de cebola + acerola e boldo + acerola no dia 0. (A) Sal S com extrato de cebola + acerola a 10 mM e 20 mM. (B) Sal A com extrato de cebola + acerola a 10 mM e 20 mM. (C) Sal S com extrato de boldo + acerola a 10 mM e 20 mM. (D) Sal A com extrato de boldo + acerola a 10 mM e 20 mM



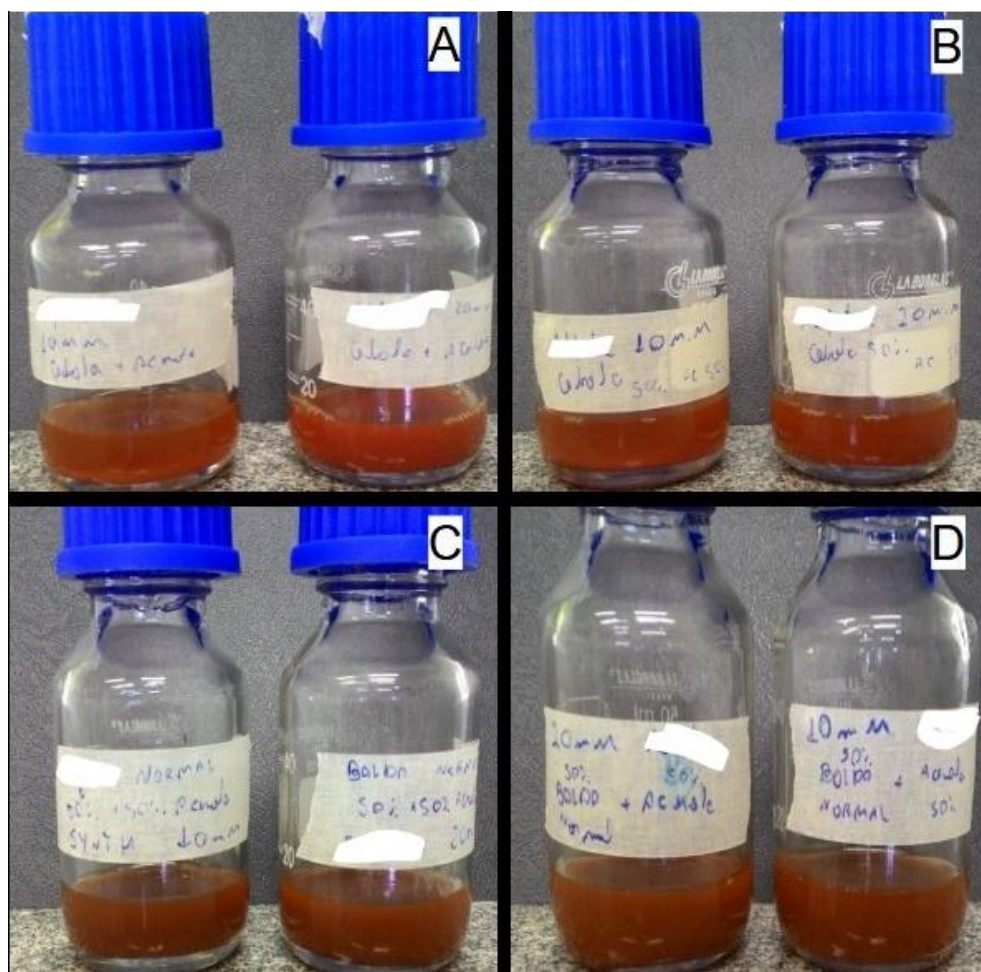
Fonte: Próprio autor

Figura 4 – Síntese de nanopartícula de selênio com extratos de cebola + acerola e boldo + acerola no dia 3. (A) Sal S com extrato de cebola + acerola a 10 mM e 20 mM. (B) Sal A com extrato de cebola + acerola a 10 mM e 20 mM. (C) Sal S com extrato de boldo + acerola a 10 mM e 20 mM. (D) Sal A com extrato de boldo + acerola a 10 mM e 20 mM



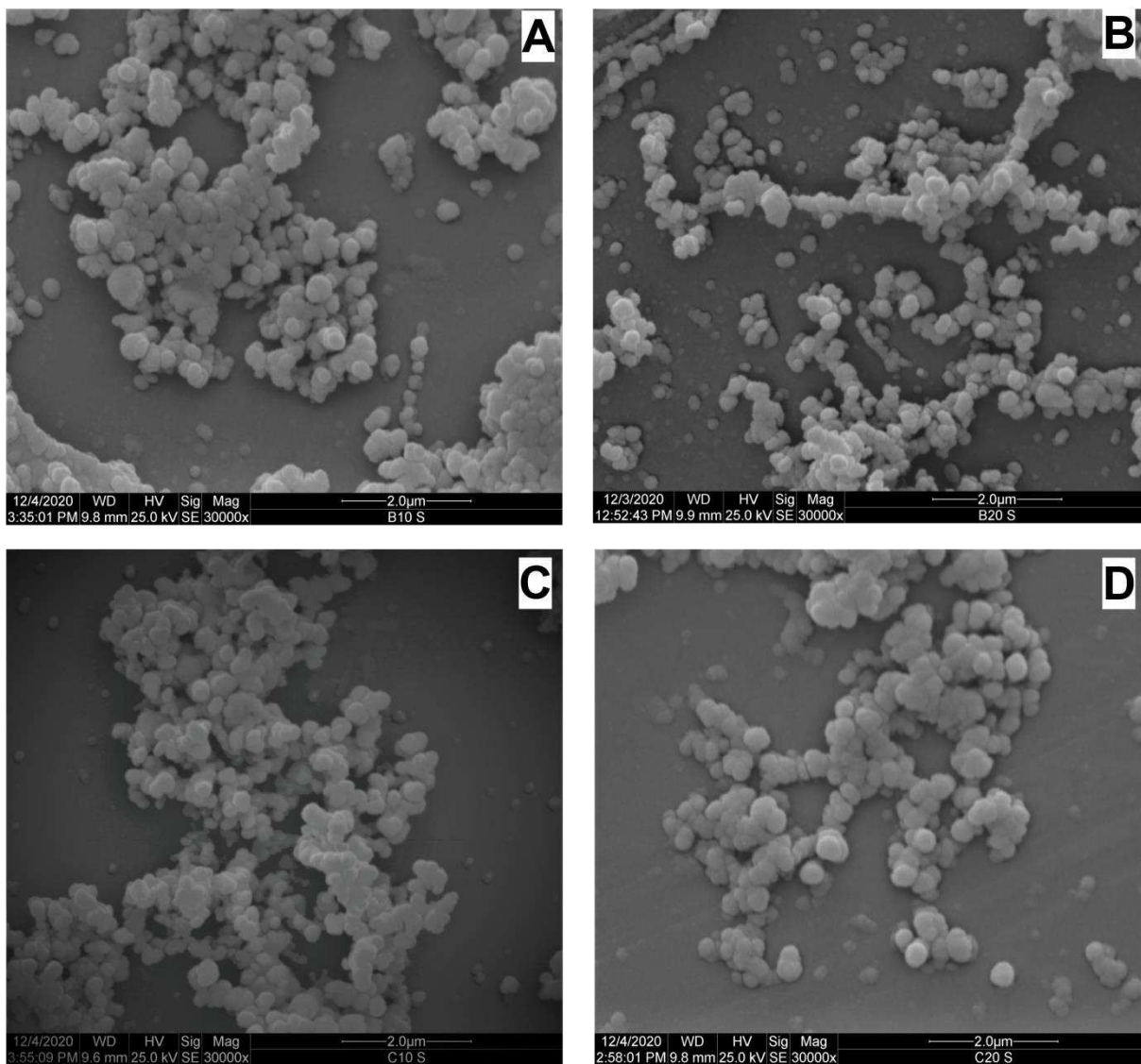
Fonte: Próprio autor

Figura 5 – Síntese de nanopartícula de selênio com extratos de cebola + acerola e boldo + acerola no dia 6. (A) Sal S com extrato de cebola + acerola a 10 mM e 20 mM. (B) Sal A com extrato de cebola + acerola a 10 mM e 20 mM. (C) Sal S com extrato de boldo + acerola a 10 mM e 20 mM. (D) Sal A com extrato de boldo + acerola a 10 mM e 20 mM.



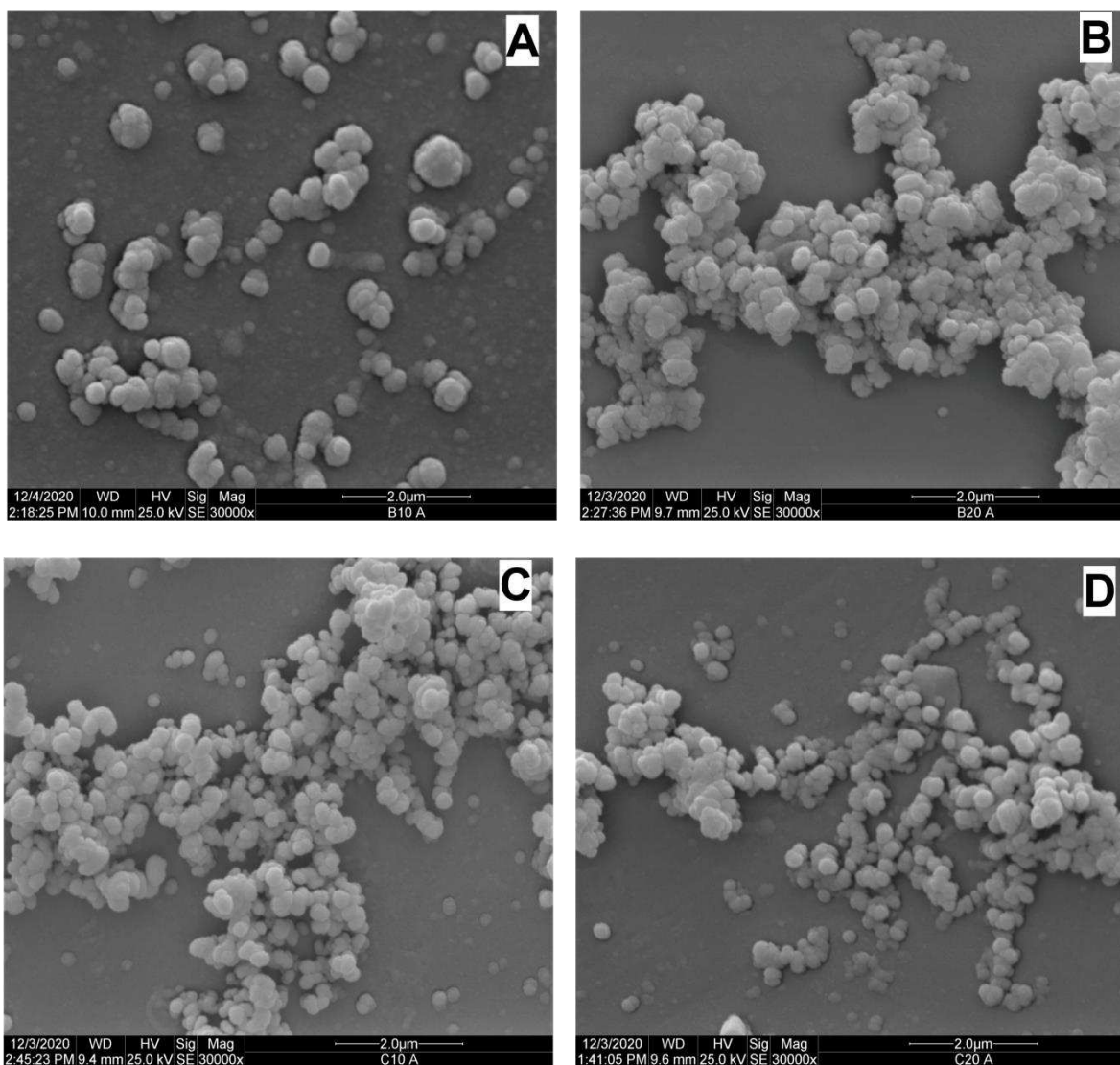
Fonte: Próprio autor

Figura 6 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura das SeNps produzidas com sal da marca S. (A) b10s (extrato de boldo + acerola com 10 mM de selenito de sódio). (B) b20s (extrato de boldo com 20 mM de sal). (C) c10s (extrato de cebola + acerola com 10 mM de selenito de sódio). (D) c20s (extrato de cebola + acerola com 20 mM de selenito de sódio)



Fonte: Próprio autor

Figura 7 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura das SeNps produzidas com sal da marca A. (A) b10a (extrato de boldo + acerola com 10 mM de selenito de sódio). (B) b20a (extrato de boldo com 20 mM de sal). (C) c10a (extrato de cebola + acerola com 10 mM de selenito de sódio). (D) c20a (extrato de cebola + acerola com 20 mM de selenito de sódio)



Fonte: Próprio autor

### 5.1.3 DLS

Com método de DLS foi possível obter o tamanho hidrodinâmico, Pdl, e potencial zeta das SeNps (Tabela 5). Os tamanhos variaram de 889,7 a 3559 nm, essa discrepância se deve ao método utilizado.

O DLS mensura o tamanho hidrodinâmico das partículas através da refração do raio laser emitido pelo equipamento nas partículas que estão em movimento na solução, de acordo com o tamanho, as partículas espalharão a luz em ângulos e intensidades diferentes (CHAN et al 2017). Normalmente, o DLS mostrará um valor maior em relação à MEV, o DLS trabalha com amostras em solução a MEV com amostras secas (BHATTACHARJEE, 2016). Possivelmente, os valores obtidos pelo DLS foram de aglomerados de nanopartículas na solução.

O valor do potencial zeta variou de -28 a -21 mV (Tabela 5), valores de  $\pm 0 - 10$  mV,  $\pm 10 - 20$  mV,  $\pm 20 - 30$  mV e  $> \pm 30$  mV são, respectivamente, muito instáveis, pouco estáveis, estáveis e muito estáveis (BHATTACHARJEE, 2016).

Todas as SeNps tiveram potencial zeta entre -20 a -30 mV indicando nanopartículas estáveis em solução. O composto b10s apresentou valor mais próximo de zero em relação às outras -21,03 mV, revelando possuir as SeNps com maior poder de agregação, isso pode ser visto em seu alto tamanho hidrodinâmico, enquanto que c10s apresentou valor mais distante de zero -28,03 mV sendo, em valores absolutos, a mais estável, o que reflete em seu tamanho reduzido em relação às outras nanopartículas.

O índice de polidispersividade (Pdl) demonstra o quanto a solução é homogênea, seu valor varia de 0, solução ideal, onde todas as partículas possuem o mesmo tamanho e 1 onde a solução é altamente polidispersa e as partículas possuem tamanhos diferentes. Valores abaixo de 0,5 são considerados monodispersos, valores acima de 0,7 são considerados altamente polidispersos (DANAIE et al.,2018).

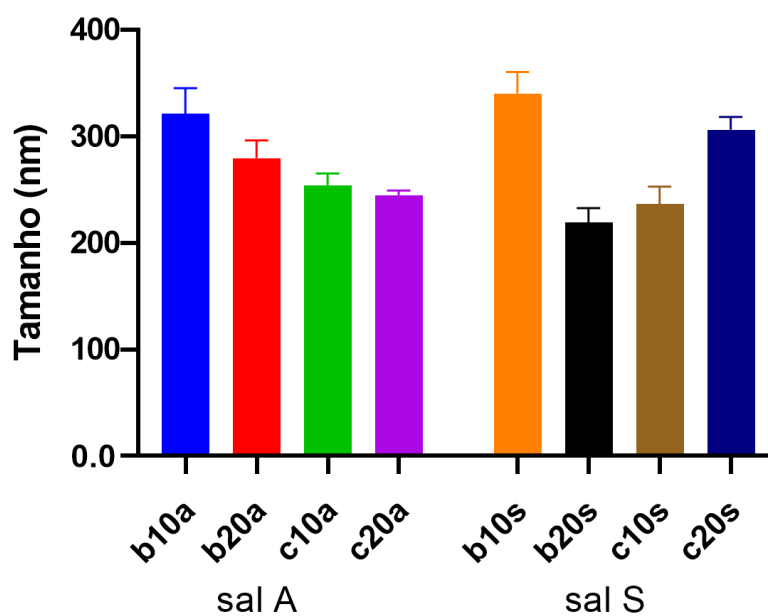
Todas as amostras analisadas tiveram Pdl abaixo de 0,5, variando de 0,15 a 0,43. Esses valores indicam uniformidade de tamanho em solução, sendo estáveis e monodispersas.

Tabela .4: Tamanho médio das SeNps medidas por software ImageJ das imagens de microscopia eletrônica de varredura. b10a e b20a (sal A de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). c10a e c20a (sal A de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10s e b20s (sal S de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). c10s e c20s ( sal S de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola) Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Composto	Tamanho (nm)	
b10a	321 ± 24	A B
b20a	279 ± 16	A B C D
c10a	254 ± 10	B C
c20a	245 ± 4	C E
b10s	340 ± 20	A
b20s	219 ± 19	C D
c10s	236 ± 16	C D E
c20s	306 ± 12	A B E

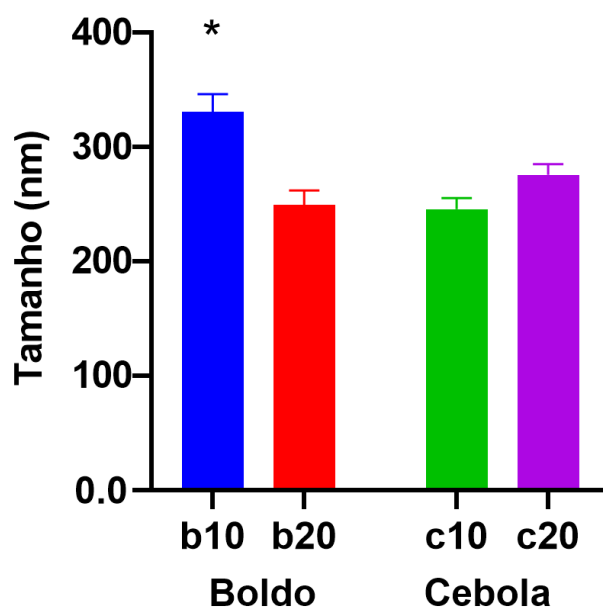
Fonte: próprio autor

Figura 8 - Tamanho médio das SeNps medidas por software ImageJ das imagens de microscopia eletrônica de varredura. b10a e b20a (sal A de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). c10a e c20a (sal A de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10s e b20s (sal S de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). c10s e c20s (sal S de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola)



Fonte: Próprio autor

Figura 9 - Tamanho médio das SeNps medidas por software ImageJ das imagens de microscopia eletrônica de varredura. b10a e b20a (sínteses feitas com boldo+acerola a 10 e 20 mM respectivamente). c10 e c20 (sínteses feitas com cebola + acerola a 10 e 20 mM respectivamente) Barra com (\*) possui diferença significativa com as outras barras pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )



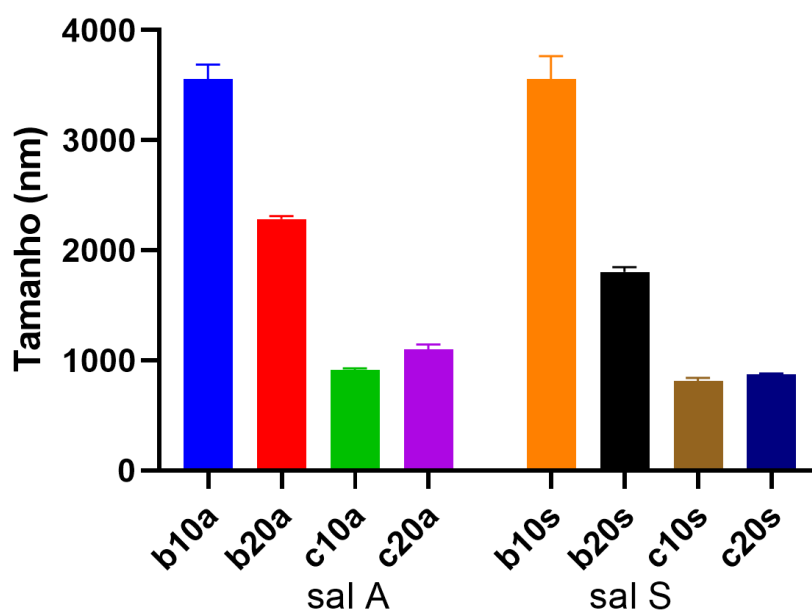
Fonte: Próprio autor

Tabela .5: Tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta das SeNps realizadas por DLS. b10a e b20a (sal A de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). c10a e c20a (sal A de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10s e b20s (sal S de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). c10s e c20s (sal S de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola) Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Composto	Tamanho (nm)		Pdl	Potencial zeta (mV)
B10A	3558 ± 128	A	0,27 ± 0,02	-23,46 ± 0,23
B20A	2285 ± 26	D	0,36 ± 0,08	-25,13 ± 0,31
C10A	916 ± 12	B	0,42 ± 0,02	-23,93 ± 0,12
C20A	1100 ± 45	B	0,39 ± 0,01	-26,93 ± 0,18
B10S	3559 ± 206	A	0,15 ± 0,05	-21,03 ± 0,91
B20S	1803 ± 44	E	0,32 ± 0,03	-25,13 ± 0,40
C10S	811 ± 31	BC	0,43 ± 0,04	-28,03 ± 0,29
C20S	871 ± 10	BC	0,28 ± 0,02	-26,56 ± 0,28

Fonte: próprio autor

Figura 10- Tamanho médio hidrodinâmico das SeNps realizadas por DLS .b10a e b20a (sal A de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). c10a e c20a (sal A de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10s e b20s (sal S de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). c10s e c20s ( sal S de 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola)



Fonte: Próprio autor

## 5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

### 5.2.1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

Todas as nanopartículas produzidas foram testadas nas concentrações de 1,5 a 196 µg/ml, os extratos de boldo + acerola e cebola + acerola sem nanopartículas também foram testados, além do selenito de sódio.

Os extratos vegetais sem nanopartículas e o selenito de sódio testados contra as cepas bacterianas não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações usadas. Indicando que toda e qualquer ação está relacionada com as SeNps produzidas.

Em relação às nanopartículas testadas, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as CIMs das SeNps sintetizadas com extratos de boldo + acerola e cebola + acerola para todas as bactérias testadas, além de não haver diferença significativa entre as CIMs das SeNps sintetizadas com 10 e 20 mM de selenito de sódio. Revelando que o tipo de extrato e a concentração de sal utilizado não influenciou na atividade antibacteriana das SeNps sintetizadas.

No entanto, as duas bactérias Gram negativas testadas, *E. coli* e *P. aeruginosa*, não foram sensíveis às nanopartículas nas concentrações avaliadas, esse resultado está de acordo com Nguyen et al. (2017) que testaram a ação antibacteriana de SeNp em *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* e apenas *S. aureus* foi sensível ao tratamento, eles produziram SeNps com carga de -32 mV o que foi um pouco maior do que a encontrada no presente trabalho.

Segundo ARAKHA et al. (2015), a carga superficial de *E. coli* é mais negativa em comparação com *S. aureus*. Bactérias Gram negativas possuem membrana externa formada de lipopolissacarídeo (LPS) que possibilitam essa diferença de cargas superficiais (HALDER et al., 2015). Possivelmente, há interações entre as cargas negativas encontradas na superfície bacteriana e as SeNps causando repulsão e dificultando as ações das nanopartículas nas bactérias Gram negativas.

Porém, alguns trabalhos demonstram atividade contra bactérias Gram negativas. Huang et al. (2020) realizaram a produção de SeNps com dois tipos de revestimentos, um deixou as nanopartículas com potencial zeta negativo e o outro positivo, ambas com tamanho médio de 46 nm. Elas foram testadas contra *E. coli* e

foi observado que as nanopartículas com cargas positivas tiveram melhor ação antibacteriana em comparação às com cargas negativas. O comportamento das nanopartículas em contato com *E. coli* pode ser visto em imagens de MEV feitas por eles, onde é possível observar a interação entre bactérias e nanopartículas que se afastavam quando tinham cargas iguais (nanopartículas negativas) e se aglomeravam com cargas opostas (nanopartículas positivas).

Khiralla e El-deeb (2015) também relataram ação de SeNps contra *E. coli* e *Salmonella*, sua síntese foi feita com sobrenadante de *Bacillus licheniformis*. Como não foram apresentados dados em relação ao potencial zeta e nem testes antibacterianos do sobrenadante utilizado para síntese dessas SeNps em seu trabalho, apenas do tamanho médio, que foi de 30 nm, não há como relacionar essa ação às cargas superficiais das SeNps produzidas nem necessariamente às próprias nanopartículas, pois podem haver bacteriocinas no sobrenadante que desempenham essa ação.

Já Zhang et al.(2020), produziram SeNps com *Providencia sp.*, e obtiveram nanopartículas com tamanho médio de 120 nm e -25 mV de potencial zeta. Essas SeNps foram mais eficazes em combater *E. coli* e *P. aeruginosa* do que *S. aureus*. É interessante observar que as nanopartículas por eles sintetizadas tiveram metade do tamanho mas cargas parecidas com a do atual trabalho. No entanto, os resultados, em relação à ação antibacteriana para Gram positivas e negativas, foram contrários.

Os trabalhos citados demonstraram ação em bactérias Gram negativas e apresentaram diâmetros de nanopartículas menores do que os obtidos no presente trabalho. Isso pode ser indício de que, além do potencial zeta, o tamanho e o tipo de molécula de revestimento das SeNps tenham um papel importante na ação antibacteriana em Gram negativas.

Em todo caso, as SeNps produzidas variam muito de acordo com os parâmetros da síntese e os nuances relacionados a sua ação antibacteriana tanto em Gram positivas quanto Gram negativas ainda são obscuras.

Tabela .6: Concentração inibitória mínima das nanopartículas de selênio produzidas com selenito de sódio da marca S. c10s e c20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10s e b20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola)

BACTÉRIAS TESTADAS	c10s (µg /ml)		c20s (µg /ml)		b10s (µg /ml)		b20s (µg /ml)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
E.coli	> 196	> 196	> 196	> 196	> 196	> 196	> 196	> 196
P. aeruginosa	> 196	> 196	> 196	> 196	> 196	> 196	> 196	> 196
S. agalactiae	6,125	12,25	6,125	12,25	6,125	12,25	6,125	12,25
S. aureus	24,5	98	24,5	196	24,5	196	49	>196
BEC 9393 (MRSA)	49	98	98	196	49	196	98	>196

Fonte: Próprio autor

Tabela .7: Concentração inibitória mínima das nanopartículas de selênio produzidas com selenito de sódio da marca A. c10a e c20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10a e b20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola)

BACTÉRIAS TESTADAS	c10a (µg /ml)		c20a (µg /ml)		b10a (µg /ml)		b20a (µg /ml)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
E.coli	> 196	> 196	> 196	> 196	> 0,196	> 196	> 196	> 196
P. aeruginosa	> 196	> 196	> 0,196	> 196	> 196	> 196	> 196	> 196
S. agalactiae	6,125	12,25	6,125	12,25	6,125	12,25	6,125	12,25
S. aureus	24,5	196	24,5	196	49	196	49	196
BEC 9393 (MRSA)	49	98	98	196	49	196	98	196

Fonte: Próprio autor

### 5.2.2 Curva de Sobrevivência

A curva de sobrevivência é importante para visualizar informações da cinética e dinâmica dos antimicrobianos analisados em contato com as cepas. É possível verificar se os compostos são bacteriostáticos ou bactericidas, compostos são considerados bactericidas quando a concentração bacteriana decresce  $\geq 3 \log_{10}$  da concentração do inóculo inicial (BOZKURT-GUZEL et al., 2020). Também é possível quantificar a morte bacteriana em relação ao tempo e dose do antimicrobiano.

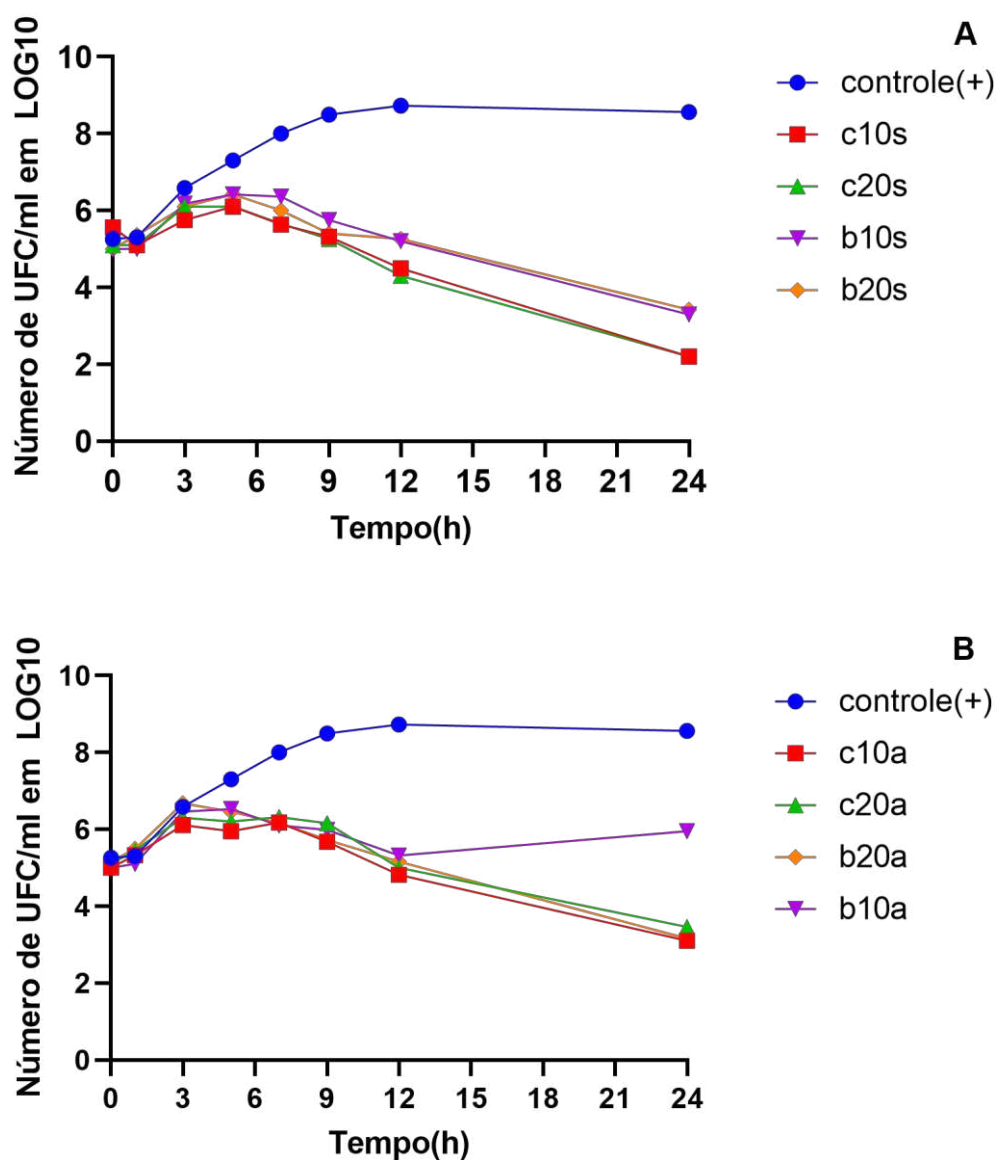
Para *S. agalactiae*, apenas c10s e c20s tiveram redução de  $3 \log_{10}$  na concentração bacteriana no tempo de 24 h (Figura 11), os outros compostos, exceto b10a apresentaram redução próxima, mas inferior, de  $3 \log$  e, portanto, são classificados com ação bacteriostática, b10a também possui ação bacteriostática, no entanto não houve diminuição da contagem bacteriana para esse composto. Vale ressaltar que, no período 0 a 3 h, houve aumento no número de log bacteriano para todas as SeNps, após esse período, os compostos começaram a ter ação antibacteriana, indicando que é necessário um tratamento de no mínimo 3 horas para que seja visualizado ação contra *S. agalactiae*.

Em relação à *S. aureus*, nenhum dos compostos apresentaram queda na concentração de UFC (Figura 12), sendo considerados bacteriostáticos, além disso sua ação cessou no período entre 7 a 24 h tendo menor atividade em 24 h. A ação dos compostos para *S. aureus* foi dependente do tempo de exposição à bactéria, tendo ação bacteriostática máxima até um período de 7 horas. É interessante observar que o composto b10s teve uma das menores ações bacteriostáticas e teve o maior aumento de tamanho hidrodinâmico e tamanho mensurado via software ImageJ, provavelmente a ação em *S. aureus* está ligada com o tamanho e o tipo de extrato utilizado.

Na curva de sobrevivência de *S. aureus* BEC9393 (Figura 13), b20a, b10a, c10a e c10s apresentaram queda de quase  $2 \log_{10}$  na concentração bacteriana inicial no tempo de 3 h, no mesmo tempo, c20a teve queda de um pouco mais de  $2 \log_{10}$  e c20s teve a maior queda com redução de  $4 \log_{10}$ , mostrando-se bactericida. No período de 7 horas, c20a conseguiu reduzir a concentração em relação ao inóculo inicial em  $3 \log_{10}$  e em 12 horas, c10s promoveu uma redução

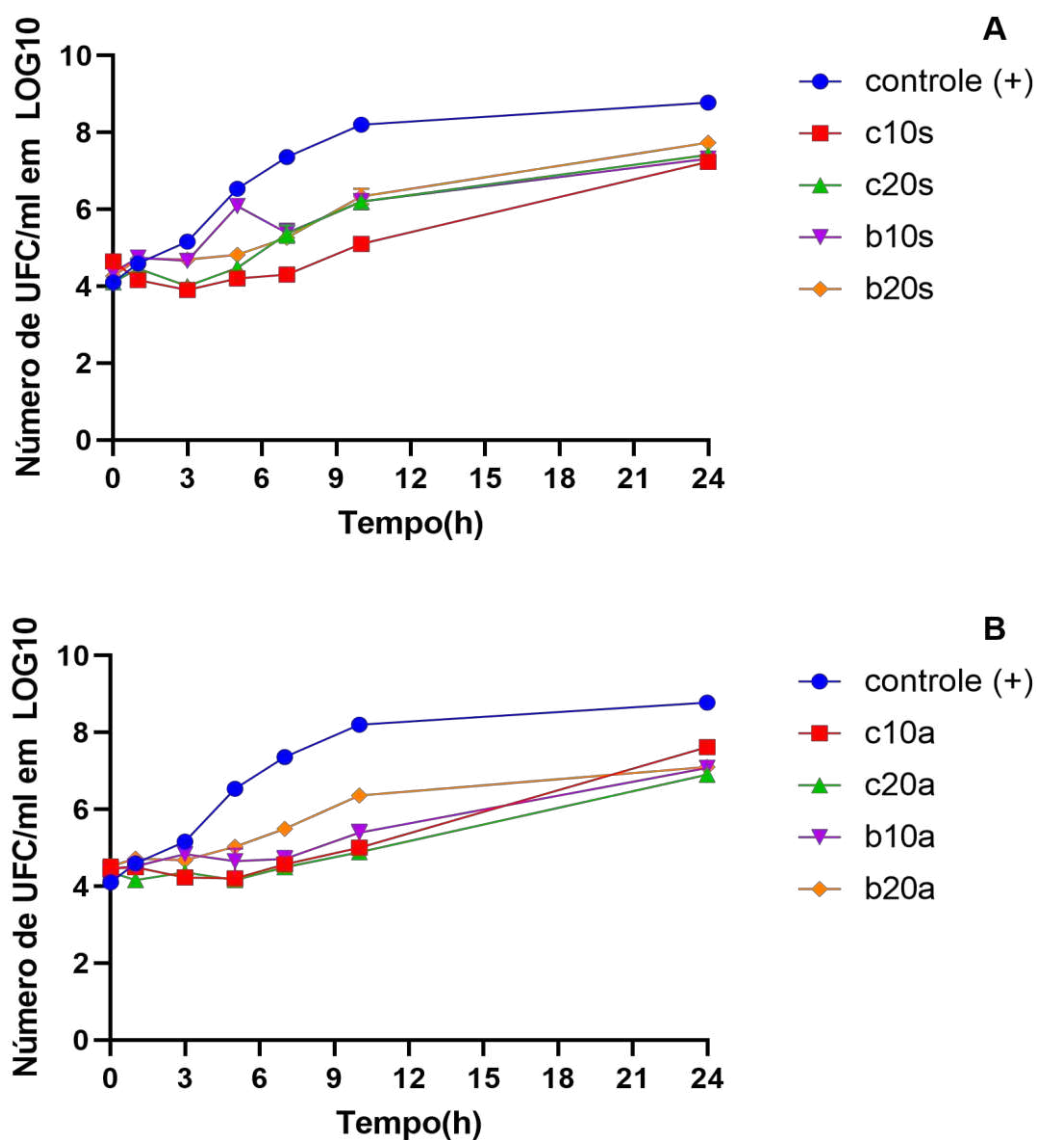
de de 3 log<sub>10</sub>, ambos demonstrando serem bactericidas. Entre 12 e 24, é possível observar a retomada de crescimento bacteriano em todas as SeNps testadas, revelando a diminuição da atividade antibacteriana dos compostos nesse período.

Figura11 – Gráficos curva de sobrevivência de *S. agalactiae* em contato com as SeNps. (A) SeNps produzidas com sal S, c10s e c20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10s e b20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). (B) SeNps produzidas com sal A, c10a e c20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10a e b20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola)



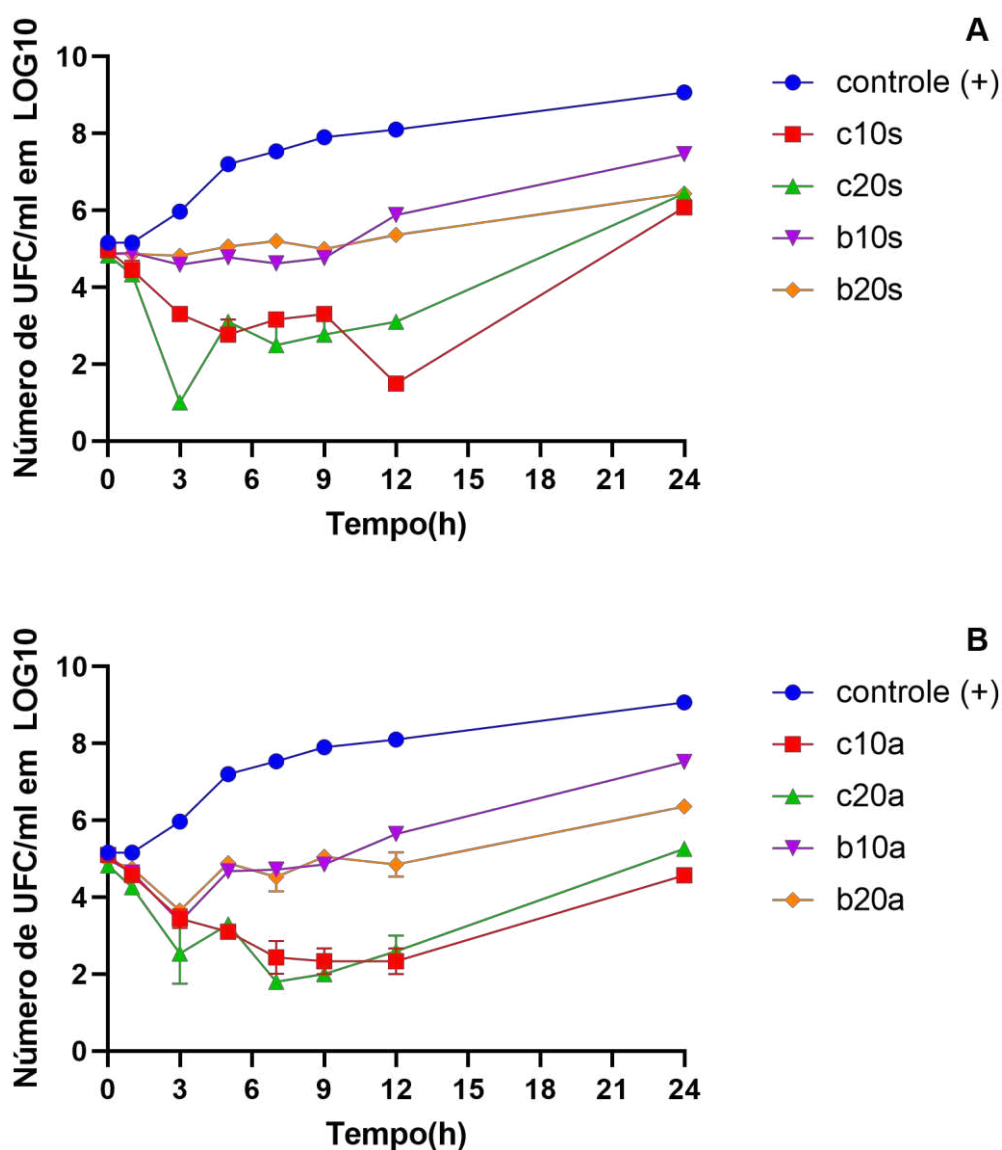
Fonte: Próprio autor

Figura12 – Gráficos curva de sobrevivência de *S. aureus* em contato com as SeNps. (A) SeNps produzidas com sal S, c10s e c20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10s e b20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). (B) SeNps produzidas com sal A, c10a e c20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10a e b20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola)



Fonte: Próprio autor

Figura13 – Gráficos curva de sobrevivência de *S. aureus* BEC9393 em contato com as SeNps. (A) SeNps produzidas com sal S, c10s e c20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10s e b20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). (B) SeNps produzidas com sal A, c10a e c20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10a e b20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola)



Fonte: Próprio autor

### 5.3 TESTE DE HEMÓLISE

Foram avaliadas 8 concentrações de cada SeNps produzidas, além dos extratos sem nanopartículas. Os extratos sem nanopartículas não foram hemolíticos, já a hemólise das SeNps pode ser vista na Figura 14. Foi realizado a plotagem em gráfico e através da regressão linear foi possível obter a CC50 (concentração mínima que diminui 50% da quantidade celular) das SeNps mostrada na Tabela 8. Como é possível observar, apenas a b10s teve a CC50 abaixo de 1 mg/ml, mostrando-se mais tóxica em relação às outras e promovendo maior hemólise em concentrações mais baixas. A b10s, como visto, foi uma das SeNps que tiveram maior tamanho em relação às outras SeNps, o que é oposto do que seria esperado da relação entre tamanho da nanopartícula e sua citotoxicidade.

O efeito citotóxico das nanopartículas em geral está relacionado a inúmeros fatores sendo os mais relevantes: tamanho, tipo de revestimento e estabilidade em solução. Luesakul et al. (2016) testaram dois tamanhos de SeNps (198 e 322 nm) e observaram que as nanopartículas menores tiveram maior efeito tóxico em células. Normalmente, quanto menor o tamanho das nanopartículas maior seu efeito citotóxico, devido à maior superfície de contato e a facilidade de interiorização (CHAUDHARY; UMAR; MEHTA, 2016).

O efeito citotóxico de SeNps em células tumorais já foi descrito. (MITTAL; KUMAR; BANERJEE, 2014). Nguyen et al. (2017), relataram o efeito tóxico, redução de até 30 % da viabilidade celular em alguns casos, em células Caco-2 testadas com SeNps. Luesakul et al. (2016) observaram o efeito citotóxico em células de câncer de mama (BT474) e baixa citotoxicidade contra células pulmonares normais (WI38). Foi descrito na literatura efeito não tóxico, segundo o autor, em células saudáveis humanas Hs68 (células fibroblásticas) apresentando CC50 de 68 µl/ml, (MAHMOUDVAND et al., 2014). Em termos gerais, muitos estudos indicam maior efeito citotóxico em células de origem tumorais em comparação às células normais (CHAUDHARY; UMAR; MEHTA, 2016; TAN et al., 2018).

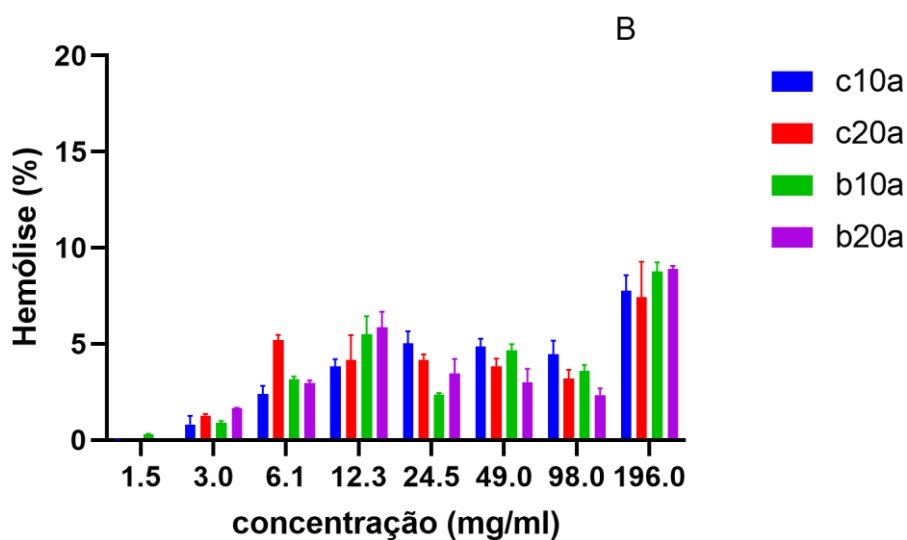
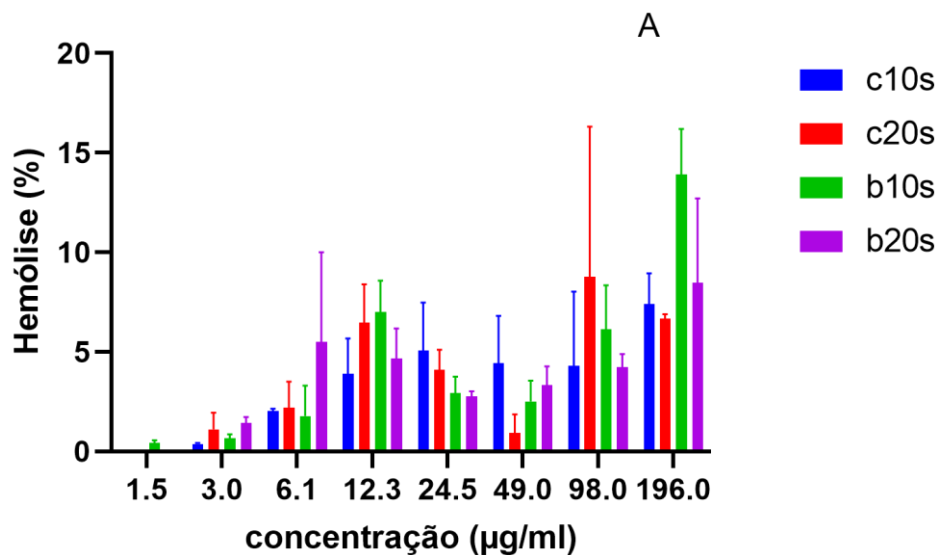
Yang et al. (2012) desenvolveram uma metodologia de síntese de SeNps revestidas com polissacarídeos, as nanopartículas produzidas tiveram um aumento na citotoxicidade contra linhagem de células tumorais que se deve, segundo o estudo, ao aumento de fragmentação do DNA e condensação de cromatina levando as células à apoptose. Outro estudo feito com SeNps envoltas em pectina

demonstrou baixa toxicidade em células normais (RWPE-1 ) e células tumorais (HeLa) que, segundo o autor, deve-se ao fato das SeNps estarem envoltas com pectina diminuindo sua toxicidade (QIU et al., 2018).

Um estudo avaliando o efeito citotóxico em células Vero foi realizado, no qual as SeNps avaliadas foram biossintetizadas com *Allium sativum* (alho) e possuíam tamanho médio de 70 nm, as nanopartículas demonstraram CC50 de 31 µg/ml (ANU et al., 2017).

Pelos estudos citados podemos deduzir que existem várias características que influenciam na atividade das nanopartículas em impedir o crescimento ou promover a morte celular. Os testes citotóxicos apresentados, foram feitos em células que possuem núcleo, diferente da hemácia que é uma célula anucleada e, portanto, alguns possíveis mecanismos do efeito citotóxico não se apliquem a ela, o que é percebido na baixa taxa de hemólise.

Figura14 – Gráfico do teste hemólise. (A) SeNps produzidas com sal S, c10s e c20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10s e b20s (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola). (B) SeNps produzidas com sal A, c10a e c20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de cebola + acerola). b10a e b20a (síntese com 10 e 20 mM de selenito de sódio, respectivamente, com extrato de boldo + acerola)



Fonte: Próprio autor

Tabela .8: CC50 das SeNps feito por regressão linear

CC50 (mg/ml)							
c10s	c20s	b10s	b20s	c10a	c20a	b10a	b20a
1,66	1,64	0,82	1,67	1,6	2,1	1,5	1,67

Fonte: Próprio autor

## 6 CONCLUSÃO

A biossíntese e caracterização das nanopartículas de selênio com extratos de *Allium cepa*, *Malpighia emarginata* e *Vernonia condensata* foi realizada como esperado.

As SeNps apresentaram tamanhos, via MEV e DLS, diferentes pelos testes medirem parâmetros distintos. Nanopartículas produzidas com 10 mM de selenito de sódio e com extrato de boldo + acerola teve maior tendência a se juntarem. Os potenciais zeta e Pdlis foram considerados estáveis em solução para todas as nanopartículas sintetizadas. A atividade antimicrobiana foi relevante em todas as bactérias Gram positivas e sem ação nas Gram negativas testadas, mostrando uma restrição no espectro de ação. Os compostos demonstraram tanto ação bacteriostática quanto bactericida de acordo com a bactéria, em relação à hemólise elas tiveram um bom CC50 tendo pouca toxicidade em hemácias. No entanto, os mecanismos presentes na ação bacteriano das SeNps produzidas ainda são desconhecidos.

Portanto, ainda são necessários maiores estudos para avaliar sua ação contra outras cepas bacterianas e obter os reais mecanismos dessa ação antibacteriana.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. The protective effect of acerola (*Malpighia emarginata*) against oxidative damage in human dermal fibroblasts through the improvement of antioxidant enzyme activity and mitochondrial functionality. **Food & Function**, v. 8, n. 9, p. 3250-3258, 2017.
- AMENDOLA, V.; MENEGHETTI, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 20, p. 3805-3821, 2009.
- ANU, K. et al. Green-synthesis of selenium nanoparticles using garlic cloves (*Allium sativum*): biophysical characterization and cytotoxicity on vero cells. **Journal of Cluster Science**, v. 28, n. 1, p. 551-563, 2017.
- ARAKHA, M. et al. The effects of interfacial potential on antimicrobial propensity of ZnO nanoparticle. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9578, 2015.
- BARBOSA, E. G. et al. Avaliação do processo de secagem da cebola (*allium cepa* L.) em corte transversal utilizando um secador solar de baixo custo. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 263-275, 2018.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.
- BOZKURT-GUZEL, C. et al. Synergistic Activity of Ceragenins Against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains in Both Checkerboard and Dynamic Time-Kill Assays. **Current Microbiology**, p. 1-10, 2020.
- BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 195-202, 2006.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Selenium compounds and selenoproteins in cancer. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 3, p. 389-395, 2008.
- CAO, X. B. et al. Ultra-Thin Trigonal Selenium Nanoribbons Developed from Series-Wound Beads. **Advanced Materials**, v. 16, n. 7, p. 649-653, 2004.
- CHAN, M. Y. et al. Particle sizing of nanoparticle adjuvant formulations by dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (NTA). In: **Vaccine Adjuvants**. Humana Press, New York, NY. p. 239-252, 2017.
- CHAUDHARY, S; UMAR, A; MEHTA, S. K. Selenium nanomaterials: an overview of recent developments in synthesis, properties and potential applications. **Progress in Materials Science**, v. 83, p. 270-329, 2016.
- CLSI (THE CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests of bacteria that grow aerobically, document M07-A10—tenth Edition. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.
- COSTA, N. D; DE RESENDE, G. M. Cultivo da cebola no Nordeste. **Embrapa Semiárido-Sistema de Produção (INFOTECA-E)**, 2007.
- DA SILVA, J. B. et al. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. **International Journal of Molecular sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.
- DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

- DHANJAL, S; CAMEOTRA, S. S. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 52, 2010.
- DONG, H. et al. Colloidally stable selenium@ copper selenide core@ shell nanoparticles as selenium source for manufacturing of copper–indium–selenide solar cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 415, p. 103-110, 2014.
- DOS REIS, A. R. et al. Overview of selenium deficiency and toxicity worldwide: affected areas, selenium-related health issues, and case studies. In: **Selenium in plants**. Springer, Cham, p. 209-230, 2017.
- EZHUTHUPURAKKAL, P. B. et al. Selenium nanoparticles synthesized in aqueous extract of *Allium sativum* perturbs the structural integrity of Calf thymus DNA through intercalation and groove binding. **Materials Science and Engineering**, v. 74, p. 597-608, 2017.
- FABRI, R. L. et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.
- FESHARAKI, P. J. et al. Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* and their recovery by a simple sterilization process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 461-466, 2010.
- FILIPPINI, T. et al. Dietary intake of cadmium, chromium, copper, manganese, selenium and zinc in a Northern Italy community. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 508-517, 2018.
- FREIRE, J. M. et al. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, p. 2291-2295, 2013.
- GALO, G. T. et al. Estudo da extração da quercetina a partir da cebola roxa (*Allium cepa* L.) e seu uso como conservante alimentar natural. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 1, p. 0153-0162, 2018.
- GIL-GIL, T. et al. Antimicrobial resistance: A multifaceted problem with multipronged solutions. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 11, p. 945, 2019.
- GOMAA, E. Z. Antimicrobial, antioxidant and antitumor activities of silver nanoparticles synthesized by *Allium cepa* extract: a green approach. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 49-57, 2017.
- HALDER, S. et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2015.
- HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J.; GLADYSHEV, V. N. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. **Springer Science & Business Media**, 2011.
- HO, C. T. et al. *Shewanella*-mediated synthesis of selenium nanowires and nanoribbons. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 28, p. 5899-5905, 2010.
- HOLUBOVÁ, J. et al. Crystallization of supercooled liquid of selenium: The comparison of kinetic analysis of both isothermal and non-isothermal DSC data. **Materials Letters**, v. 60, n. 20, p. 2429-2432, 2006.
- HOSNEDLOVA, B. et al. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 2107, 2018.
- HUANG, T. et al. Engineering highly effective antimicrobial selenium nanoparticles through control of particle size. **Nanoscale**, v. 11, n. 31, p. 14937-14951, 2019.
- HUANG, T. et al. Enhanced antibacterial activity of Se nanoparticles upon coating with recombinant spider silk protein eADF4 ( $\kappa$ 16). **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 4275, 2020.
- HUANG, X. et al. Investigation of functional selenium nanoparticles as potent antimicrobial agents against superbugs. **Acta Biomaterialia**, v. 30, p. 397-407, 2016.

IKRAM, M. et al. Biomedical potential of plant-based selenium nanoparticles: A Comprehensive Review on Therapeutic and Mechanistic Aspects. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 249, 2021.

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

IZUMI, E. et al. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1050-1074, 2018.

JINI, D.; SHARMILA, S. Green synthesis of silver nanoparticles from *Allium cepa* and its in vitro antidiabetic activity. **Materials Today: Proceedings**, v. 22, p. 432-438, 2020.

KHAN, I; SAEED, K; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019

KHIRALLA, G. M.; EL-DEEB, B. A. Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1001-1007, 2015.

KIELISZEK, M; BŁAŻEJAK, S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: a review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 609, 2016.

KIELISZEK, M. Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1298, 2019.

KIRUBA, V. S. A. et al. "Green synthesis of biocidal silver-activated charcoal nanocomposite for disinfecting water." **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 10, p. 532 – 544, 2015.

KUMAR, P. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of CuO nanoparticles. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 17-20, 15 Jan. 2020.

LEFFA, D. D. et al. Effects of Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake on brain energy metabolism of mice fed a cafeteria diet. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 2, p. 954-963, 2017.

LOPES, C. B.; DA CAMARA, C. A. G.; DE MORAES, M. M. Composition of Essential Oils from the Leaves, Stems, and Flowers of *Vernonia condensata* of Pernambuco, Brazil. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 55, n. 4, p. 756-758, 2019.

LUESAKUL, U. et al. Shape-controlled synthesis of cubic-like selenium nanoparticles via the self-assembly method. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 435-444, 2016.

MACK, I; BIELICKI, J. What Can We Do About Antimicrobial Resistance?. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 38, n. 6S, p. S33-S38, 2019.

MAHMOUDVAND, H. et al. Scolicidal effects of biogenic selenium nanoparticles against protoscolices of hydatid cysts. **International Journal of Surgery**, v. 12, n. 5, p. 399-403, 2014.

MALDONADE, I. R.; DE CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. **Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2013.

MARUNAKA, Y. et al. Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 209, 2017.

MASON, R. P. et al. The global marine selenium cycle: Insights from measurements and modeling. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 32, n. 12, p. 1720-1737, 2018.

MASTALERZ, M. et al. From in-situ coal to fly ash: a study of coal mines and power plants from Indiana. **International Journal of Coal Geology**, v. 59, n. 3-4, p. 171-192, 2004.

MENON, S. et al. Selenium nanoparticles: A potent chemotherapeutic agent and an elucidation of its mechanism. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, p. 280-292, 2018.

MINAEV, V. S.; TIMOSHENKOV, S. P.; KALUGIN, V. V. Structural and phase transformations in condensed selenium. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 7, n. 4, p. 1717, 2005.

MITTAL, A. K; KUMAR, S; BANERJEE, U. C. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 431, p. 194-199, 2014.

MOURA, C. FH et al. Acerola—Malpighia emarginata. **Exotic Fruits**. Academic Press, 2018. p. 7-14.

MURAYYAN, A. I. et al. Antiproliferative activity of Ontario grown onions against colorectal adenocarcinoma cells. **Food Research International**, v. 96, p. 12-18, 2017.

NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. 1999.

NGUYEN, T. H. D. et al. Antibacterial properties of selenium nanoparticles and their toxicity to Caco-2 cells. **Food Control**, v. 77, p. 17-24, 2017

OREMLAND, R. S. et al. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 52-60, 2004.

PRASAD, K. S. et al. Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 261-266, 2013.

PRASAD, K. S; SELVARAJ, K. Biogenic synthesis of selenium nanoparticles and their effect on As (III)-induced toxicity on human lymphocytes. **Biological Trace Element Research**, v. 157, n. 3, p. 275-283, 2014.

QIU, Wen-Yi et al. Construction, stability, and enhanced antioxidant activity of pectin-decorated selenium nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, p. 692-700, 2018.

QUINTANA, M. et al. Synthesis of selenium nanoparticles by pulsed laser ablation. **Applied surface science**, v. 195, n. 1-4, p. 175-186, 2002.

RABINOWITCH, H. D.; CURRAH, L. (Ed.). **Allium crop Science: Recent Advances**. CABI, 2002.

RAMAMURTHY, C. H. et al. Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 8, p. 1131-1139, 2013.

REIS FILGUEIRA, F. A. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Universidade Federal de Viçosa, 2000.

RITZINGER, R.; RITZINGER, C.H.S.P. Acerola. **Informe Agropecuário - Belo Horizonte**, v. 32, p. 264, p. 17-25, 2011.

SANTOS, A. A. dos et al. Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 760, 2016.

SCHWARZ, K; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 12, p. 3292-3293, 1957.

SHAMAILA, S. et al. Gold nanoparticles: an efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. **Nanomaterials**, v. 6, n. 4, p. 71, 2016.

SHOEIBI, S; MOZDZIAK, P; GOLKAR-NARENJI, A. Biogenesis of selenium nanoparticles using green chemistry. **Topics in Current Chemistry**, v. 375, n. 6, p. 88, 2017.

SUN, D. et al. Inhibition of tumor growth and vasculature and fluorescence imaging using functionalized ruthenium-thiol protected selenium nanoparticles. **Biomaterials**, v. 35, n. 5, p. 1572-1583, 2014.

TAN, V. le C. et al. Nanostructured biomedical selenium at the biological interface. **Biointerphases**, v. 13, n. 6, p. 301, 2018.

TRANI, P. E; BREDA JR, J. M.; FACTOR, T. L. Calagem e adubação da cebola (*Allium cepa* L.). **Instruções Agrícolas para as Principais Culturas Econômicas**, Boletim, v. 200, n. 7, 2014.

TRIANI, T. et al. Photocatalytic synthesis of Se nanoparticles using polyoxometalates. **Catalysis Today**, v. 144, n. 1-2, p. 2-6, 2009.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação in vitro e aclimatização de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 173-183, 2009.

WANG, T. et al. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, n. 1, p. 94-102, 2010.

WU, F. et al. Zinc oxide nanoparticles synthesized from *Allium cepa* prevents UVB radiation mediated inflammation in human epidermal keratinocytes (HaCaT cells). **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 3548-3558, 2019.

YANG, F. et al. Surface decoration by *Spirulina* polysaccharide enhances the cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 835, 2012.

YANG, G. et al. Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. **Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease**, v. 3, n. 3, p. 123-130, 1989.

ZARE, B. et al. Isolation and characterization of a fungus for extracellular synthesis of small selenium nanoparticles. **Nanomedicine Journal**, v. 1, n. 1, p. 13-19, 2013

ZHANG, H. et al. Antibacterial properties and mechanism of selenium nanoparticles synthesized by *Providencia* sp. DCX. **Environmental Research**, p. 110630, 2020.

ZHANG, J. et al. A new method for the synthesis of selenium nanoparticles and the application to construction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor. **Chinese Chemical Letters**, v. 15, n. 11, p. 1345-1348, 2004.

ZHANG, Xi. In My Element: Selenium. **Chemistry—A European Journal**, v. 25, n. 11, p. 2649-2650, 2019.

ZHOU, H. et al. Prevention of Keshan disease by selenium supplementation: a systematic review and meta-analysis. **Biological Trace Element Research**, v. 186, n. 1, p. 98-105, 2018.

ZHUO, H.; SMITH, A. H.; STEINMAUS, C. Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 13, n. 5, p. 771-778, 2004.

## **ANEXOS**

## **ANEXO A**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



Comitê de Ética em  
Pesquisa envolvendo  
SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE COMPOSTOS ALTERNATIVOS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA

**Pesquisador:** Renata Katsuko Takayama Kobayashi

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 47661115.0.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCB - Departamento de Microbiologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.268.019

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto para avaliar a toxicidade de compostos alternativos com ação antimicrobiana, pois é sabido que a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais é um problema que está afetando o recinto hospitalar, o ambiente e a comunidade de forma geral.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Avaliar ação citotóxica de compostos antimicrobianos.

**Objetivo Secundário:** Determinar a concentração tóxica em hemácias (CC50; ou seja, concentração que danifica 50% das células) de compostos antimicrobianos alternativos. Comparar os resultados encontrados nessa linhagem celular

com os resultados encontrados em células tumorais (HEp-2, HeLa, LLCMK2).

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** O risco será mínimo. O risco é próprio de uma coleta de sangue, como dor, hematoma ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Por isso, o procedimento será realizado por profissionais qualificados e normas de biossegurança serão utilizadas, como uso de luvas, jaleco e técnicas assépticas. Além disso, todos

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

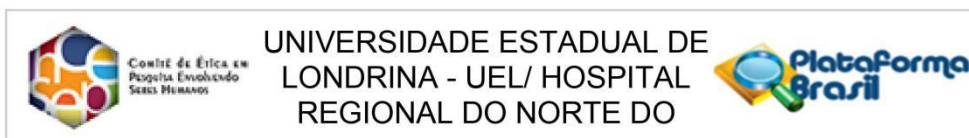
**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.268.019

os materiais que entrarem em contato com o sangue, seja por meio da coleta ou do experimento, serão descartados adequadamente.

Em caso de desconforto ou outros danos devido ao procedimento de coleta de sangue, o voluntário será encaminhado para a Divisão de Assistência à Saúde da Comunidade (DASC – UEL).

**Benefícios:**

Esse estudo irá auxiliar no processo de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Após testes de toxicidade, tais agentes podem ganhar potencial para serem utilizados em indústrias farmacêuticas, alimentícias, hospitais, clínicas, entre outros.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo importante para área pois, a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais é um problema que está afetando o recinto hospitalar, o ambiente e a comunidade de forma geral. A pesquisadora pertence a um grupo de pesquisa que vem avaliando a resistência de microrganismos isolados de humanos e alimentos a antibióticos comerciais, principalmente no aspecto epidemiológico. O conhecimento resultante desse estudo poderá reverter em benefícios no desenvolvimento de novos agentes para controle de infecções bacterianas, visando métodos alternativos para o combate às bactérias, principalmente às multirresistentes aos antimicrobianos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória estão corretos.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O pesquisador atendeu satisfatoriamente as pendências levantadas pelo CEP, apresentando o documento da DASC, com ciência da pesquisa e se comprometendo em atender os participante do estudo caso, for necessário. E adequou o cronograma. Projeto está aprovado

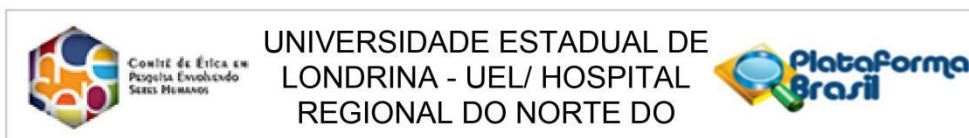
**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezado (a) Pesquisador (a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

**Endereço:** LABESC - Sala 14  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 86.057-970  
**UF:** PR **Município:** LONDRINA  
**Telefone:** (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.268.019

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_549298.pdf	18/09/2015 21:42:46		Aceito
Outros	dasc.pdf	18/09/2015 21:42:13	Renata Katsuko Takayama Kobayashi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto3.pdf	18/09/2015 21:40:00	Renata Katsuko Takayama Kobayashi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 08:37:39	Renata Katsuko Takayama Kobayashi	Aceito
Folha de Rosto	Doc1.pdf	09/09/2015 08:28:09	Renata Katsuko Takayama Kobayashi	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LONDRINA, 08 de Outubro de 2015

Assinado por:

**Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli  
(Coordenador)**

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br