



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALANA ELKE DO NASCIMENTO CORRÊA

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA DE  
DIFERENTES FONTES E A INFLUÊNCIA DO pH SOBRE SUA  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

ALANA ELKE DO NASCIMENTO CORRÊA

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA DE  
DIFERENTES FONTES E A INFLUÊNCIA DO pH SOBRE SUA  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Dissertação de mestrado apresentada à  
Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de  
Almeida

Londrina  
2021

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

C824 Corrêa, Alana Elke do Nascimento .  
Biossíntese de nanopartículas de prata de diferentes fontes e a influência do pH sobre sua atividade antibacteriana / Alana Elke do Nascimento Corrêa. - Londrina, 2021.  
87 f. : il.

Orientador: Ricardo Sérgio Couto de Almeida.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. antimicrobianos - Tese. 2. nanotecnologia - Tese. 3. potencial hidrogeniônico - Tese. 4. síntese biogênica - Tese. I. Almeida, Ricardo Sérgio Couto de . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

ALANA ELKE DO NASCIMENTO CORRÊA

**BIOSSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA DE  
DIFERENTES FONTES E A INFLUÊNCIA DO pH SOBRE SUA  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Dissertação de mestrado apresentada à  
Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de  
Almeida Universidade Estadual de Londrina –  
UEL

---

Profa. Dra. Audrey Alesandra Stingen Garcia  
Lonni  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Ligia Carla Faccin Galhardi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de junho de 2021.

*Dedico este trabalho a minha mãe,  
Noêmea Paixão do Nascimento.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha mãe, Noêmea Paixão do Nascimento, por todo amor, carinho, apoio e incentivo.

À minha irmã, Átila Maria do Nascimento Corrêa, minhas tias, Ana Elisabete Corrêa e Eliane Cristina Corrêa, e minha avó Antônia Domingues Corrêa, por todo amor e carinho, e por sempre torcerem por mim mesmo estando longe.

Ao meu namorado Érick Lima Alencar, pelo apoio, paciência infinita, e pela ajuda na lavagem de vidrarias durante as visitas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida, por ter me aceitado como aluna mesmo sem me conhecer, pela orientação, e por todos os ensinamentos. E ao Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio por sempre compartilhar seus conhecimentos e sabedoria conosco durante os anos de convivência em laboratório.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato, e aos doutorandos Guilherme Fonseca Reis e Marcelly Chue Gonçalves, por toda a ajuda e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório, Aline Ratuchne, Ana Maria Heinzen, César Guilherme Matias, Guilherme Fonseca Reis, Patrícia Canteri Souza e Tatiany Moniqui Nunes, pela convivência, companheirismo, troca de experiências, e pelos intervalos com muitas risadas na cafeteria original.

À graduanda Gabriela Canteiro Figliano, pela amizade e por toda a ajuda oferecida sempre que precisei, e aos alunos de outros departamentos que passaram pelo laboratório, Juliana Gutschow Gameiro e Natalia Rodrigues de Oliveira, por todas as conversas, risadas, e por compartilharem conhecimentos enriquecedores de outras áreas.

Aos amigos de turma, Elisa Vicente Ribelato, Leandro Afonso da Silva, Maria Luiza Abreu e Isabella Thihara, por compartilhar os momentos de sofrimento e de alegria, pela amizade e pela companhia.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia e aos profissionais que o compõe, por todas as contribuições para a minha formação profissional e pessoal.

À Universidade Estadual de Londrina, pela estrutura fornecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

CORRÊA, Alana Elke do Nascimento. **Biossíntese de nanopartículas de prata de diferentes fontes e a influência do pH sobre sua atividade antibacteriana.** 2021.87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) — Universidade Estadual de Londrina, 2021.

## RESUMO

As nanopartículas representam um grande mercado em expansão, suas propriedades físico químicas, ópticas, eletrônicas, térmicas e catalíticas permitem sua aplicação em diversas áreas. Sua atividade antimicrobiana conhecida e amplo espectro de ação tornaram seu uso frequente na Microbiologia. Por apresentarem uma alternativa promissora ao combate a bactérias multirresistentes seu uso é realizado em diversos estudos a fim de compreender melhor seu funcionamento. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata (AgNPs) de origem biogênica (fúngica e vegetal), e testar a atividade antibacteriana das mesmas em condições de pH ácido (6,0), neutro (7,0) e básico (9,0). As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas por métodos de espalhamento dinâmico de luz (DLS), fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDXRF) e potencial zeta. A atividade antimicrobiana foi determinada pelos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Também foram realizados ensaios de curva de crescimento e morte, atividade antibiofilme e observação de alterações ultraestruturais superficiais por microscopia eletrônica de varredura (MEV). De acordo com os resultados de CIM, a AgNP fúngica foi a NP que mais apresentou influência do pH em sua atividade antibacteriana, especialmente em pH básico. Nos ensaios de curva de crescimento e morte, amostras de *S. aureus* e *E. coli* obtiveram comportamentos semelhantes em todas as condições de pH com AgNP fúngica, e comportamentos distintos em todas as condições com a AgNP vegetal. Uma cepa de *E. coli* rugosa demonstrou comportamento semelhante em todas as condições testadas com ambas AgNPs. Supostamente, o comportamento cinético pode ser influenciado predominantemente por fatores além do pH, como características do antimicrobiano e do microrganismo em questão. Nos ensaios de atividade antibiofilme a condição de pH básico se destacou de forma negativa com a AgNP fúngica, principalmente em amostras de *K. pneumoniae*. Já para a AgNP vegetal, a condição de pH básico se destacou de forma positiva, apresentando maior atividade antibiofilme em relação as condições de pH ácido e neutro. Em imagens de MEV, foram observadas alterações em forma de vesículas e protuberâncias, e também fragmentação e alongamento de células. De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que o pH do meio pode influenciar na atividade antibacteriana da nanopartícula, e que possivelmente esse acontecimento é definido por características oriundas da síntese da mesma. No presente trabalho o pH exerceu maior influência sobre a atividade antibacteriana da AgNP de origem fúngica.

**Palavras-chave:** nanotecnologia; síntese biogênica; antimicrobianos; potencial hidrogeniônico.

CORRÊA, Alana Elke do Nascimento. **Biosynthesis of silver nanoparticles from different sources and the influence of pH on their antibacterial activity.** 2021.87 p. Dissertation (Masters in Microbiology) — State University of Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Nanoparticles represent a large expanding market, their physical chemical, optical, electronic, thermal and catalytic properties allow their application in several areas. Its known antimicrobial activity and broad spectrum of action have made its use frequent in microbiology. As they present a promising alternative for combating multidrug-resistant bacteria, their use is carried out in several studies in order to better understand their functioning. In this context, the aim of this study was to synthesize and characterize biogenic silver nanoparticles (AgNPs) of distinct origins (fungal and plant), and to test their antibacterial activity under conditions of acidic (6,0), neutral (7,0) and basic (9,0) pH. The synthesized nanoparticles were characterized by methods of dynamic light scattering (DLS), energy dispersive X ray fluorescence (EDXRF) and zeta potential, and the antimicrobial activity was evaluated by the tests of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Time-kill curve, antibiofilm activity and observation of superficial ultrastructural changes by scanning electron microscopy (SEM) were also performed. According to the MIC results, the fungal AgNP was the NP that most presented influence of the pH on its antibacterial activity, especially at basic pH. In time-kill curve assays, samples of *S. aureus* and *E. coli* showed similar behavior in all pH conditions with fungal AgNP, and different behavior in all conditions with plant AgNP. A strain of rough *E. coli* showed similar behavior in all conditions tested with both AgNPs. Supposedly, the kinetic behavior can be influenced predominantly by factors other than pH, such as characteristics of the antimicrobial and the microorganism in question. In the antibiofilm activity assays, the basic pH condition stood out in a negative way with fungal AgNP, mainly in samples of *K. pneumoniae*. As for plant AgNP, the basic pH condition stood out positively, with greater antibiofilm activity compared to acidic and neutral pH conditions. In the SEM images, changes in the form of vesicles and protuberances were observed, as well as cell fragmentation and elongation. According to the results obtained, it was possible to conclude that the pH of the medium can influence the antibacterial activity of the nanoparticle, and that possibly this event is defined by characteristics arising from its synthesis. In the present work, pH had a greater influence on the antibacterial activity of fungal AgNP.

**Key- words:** nanotechnology; biogenic synthesis; antimicrobials; hydrogen potential.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> — Comparação de tamanho entre itens de escala nanométrica, micrométrica e milimétrica.....	15
<b>Figura 2</b> — Cálice de <i>Lycurgus</i> na cor verde quando visto reflexão, e vermelho quando visto por transmissão.....	17
<b>Figura 3</b> — Vitral medieval “Adoração dos magos”, 1390 d.C., colorido com nanopartículas.....	18
<b>Figura 4</b> — Efeito das nanopartículas em cores de um vitral.....	19
<b>Figura 5</b> — Representação das vias top down e bottom up na síntese de nanopartículas.....	20
<b>Figura 6</b> — Representação da técnica de ablação a laser, utilizada na síntese física de NPs.....	21
<b>Figura 7</b> — Representação dos métodos de síntese biológica de nanopartículas metálicas.....	23
<b>Figura 8</b> — Propriedades físico-químicas das NPs envolvidos na atividade biológica.....	28
<b>Figura 9</b> — Mecanismos de toxicidade de AgNPs em células procarióticas.....	30
<b>Figura 10</b> — Representação do conjunto de microtubos do ponto inicial da curva de crescimento.....	41
<b>Figura 11</b> — Resultados curva de crescimento e morte em condições de pH ácido, neutro e básico tratadas com AgNP fúngica.....	52
<b>Figura 12</b> — Resultados curva de crescimento e morte em condições de pH ácido, neutro e básico tratadas com AgNP vegetal.....	54
<b>Figura 13</b> — Microscopia eletrônica de varredura da amostra <i>E. coli</i> 012 sem tratamento.....	64
<b>Figura 14</b> — Microscopia eletrônica de varredura da amostra <i>E. coli</i> 012 tratada com AgNP fúngica.....	64
<b>Figura 15</b> — Microscopia eletrônica da varredura da amostra <i>E. coli</i> 012 tratada com AgNP vegetal.....	65
<b>Figura 16</b> — Microscopia eletrônica de varredura da amostra <i>S. aureus</i> MTS 26 sem tratamento.....	66
<b>Figura 17</b> — Microscopia eletrônica de varredura da amostra <i>S. aureus</i> MTS 26 tratada com AgNP fúngica.....	66

**Figura 18** – Microscopia eletrônica de varredura da amostra *S. aureus* MTS  
26 tratada com AgNP vegetal .....67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Potencial zeta ( $\zeta$ ), espalhamento dinâmico de luz (DLS), concentração e formato das nanopartículas sintetizadas .....	45
<b>Tabela 2</b> – Valores de concentração inibitória mínima da AgNP fúngica .....	46
<b>Tabela 3</b> – Valores da concentração inibitória mínima da AgNP vegetal .....	46
<b>Tabela 4</b> – Valores da concentração bactericida mínima da AgNP fúngica .....	47
<b>Tabela 5</b> – Valores da concentração bactericida mínima da AgNP vegetal .....	47
<b>Tabela 6</b> – Resultados testes de inibição da formação de biofilme AgNP fúngica.....	61
<b>Tabela 7</b> – Resultados testes de inibição da formação de biofilme AgNP vegetal.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° C	graus Celsius
Ag	Prata
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
AgNP	Nanopartícula de prata
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DO	Densidade óptica
EDXRF	Fluorescência de raios X por dispersão em energia
HCl	Ácido clorídrico
h	Hora
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Mueller Hinton
mM	Milimolar
M	Molar
mL	Mililitro
mV	Milivolt
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
NPs	Nanopartículas
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
μA	Microampère
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	NANOTECNOLOGIA. ....	15
2.2	HISTÓRICO DA NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA.....	17
2.3	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS. ....	20
2.3.1	Síntese De Nanopartículas Metálicas Por Métodos Químicos. ....	21
2.3.2	Síntese De Nanopartículas Metálicas Por Métodos Físicos.....	22
2.3.3	Síntese De Nanopartículas Metálicas Por Sistemas Biológicos .....	23
2.4	TIPOS DE NANOPARTÍCULAS .....	24
2.4.1	Nanopartículas Proteicas.....	24
2.4.2	Nanopartículas Lipídicas. ....	25
2.4.3	Nanopartículas De Polissacarídeos.....	26
2.4.4	Nanopartículas Metálicas. ....	26
2.4.5	Nanopartículas De Prata .....	27
2.5	MECANISMOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	28
2.6	ANTIMICROBIANOS. ....	31
2.7	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	32
2.8	MICROORGANISMOS .....	33
2.8.1	<i>Escherichia coli</i> .....	33
2.8.2	<i>Enterococcus faecium</i> .....	34
2.8.3	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
2.8.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	35
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	SÍNTESE DE AgNP FÚNGICA.....	36
4.2	SÍNTESE DE AgNP VEGETAL .....	37

4.3.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS .....	37
4.3.1	Potencial Zeta .....	37
4.3.2	Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	37
4.3.3	Fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDXRF).....	38
4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM pH NEUTRO, ÁCIDO E BÁSICO.....	38
4.4.1	Microrganismos Utilizados.....	38
4.4.2	Tamponamento E Ajuste De pH Dos Meios De Cultura .....	38
4.4.3	Determinação Da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	39
4.4.4	Preparo Do Inóculo.....	39
4.4.5	Diluições Seriadas.....	40
4.4.6	Determinação Da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	40
4.5	CURVA DE CRESCIMENTO E MORTE (TIME-KILL CURVE).....	40
4.5.1	Preparo Do Teste .....	41
4.5.2	Diluições E Plaqueamento.....	41
4.5.3	Contagem De Colônias .....	41
4.6	FORMAÇÃO E INIBIÇÃO DE BIOFILME.....	42
4.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	43
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs.....	44
5.2	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA.....	46
5.3	CURVA DE CRESCIMENTO DE MORTE .....	51
5.4	FORMAÇÃO E INIBIÇÃO DE BIOFILME.....	61
5.5	ANÁLISE ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	63
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas (NPs) e materiais nanoestruturados (NSMs) representam uma área ativa de pesquisa e um setor técnico-econômico em plena expansão e com muitos domínios de aplicação. NPs e NSMs ganharam destaque nos avanços tecnológicos devido às suas características físico-químicas ajustáveis. (JEEVANANDAM et al., 2018). As NPs de prata, em particular, exibem várias propriedades atrativas, incluindo boa condutividade elétrica, estabilidade química, e propriedades antimicrobianas (LIAO; LI; TJONG, 2019).

A descoberta dos antimicrobianos é uma das grandes conquistas da área médica. Estes se tornaram indispensáveis em procedimentos médicos como cirurgias, transplante de órgãos e tratamento de várias infecções. O uso desenfreado, particularmente o uso intensivo de antimicrobianos, ocasionou o desenvolvimento de resistência em várias espécies bacterianas (SINGH et al., 2020). Além disso, o excesso do uso indevido em animais e agricultura favorece esse processo, levando a um aumento gradual do número de microrganismos resistentes aos antibióticos. Conseqüentemente, bactérias que antes eram facilmente tratáveis, tornam-se difíceis de tratar ou requerem a última linha de antibióticos (PAITAN, 2018; VENTOLA, 2015). De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde, a resistência aos antibióticos se tornou uma das principais ameaças à saúde pública do século XXI (SINGH et al., 2020; WHO, 2014).

Para contornar essa situação, diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de desenvolver medicamentos para o tratamento de tais infecções microbianas. Muitos sais de metal e NPs de metal têm se mostrado eficaz na inibição do crescimento de diversas bactérias infecciosas. Prata e NPs de prata (AgNPs) ocupam um lugar de destaque na classe de metais que são usados como agentes antimicrobianos desde tempos passados (JONES et al., 2004; SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018).

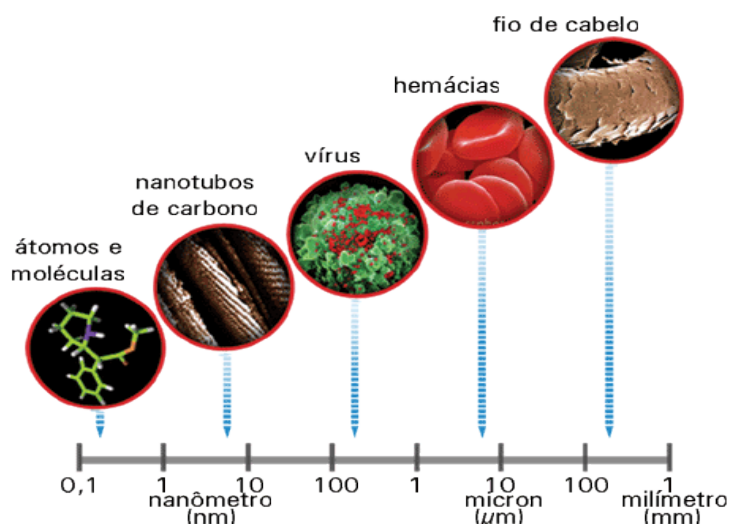
O uso de NPs como agentes antimicrobianos tem as vantagens de baixo custo, simples preparação, alta eficiência e maior velocidade de ação, dessa forma apresentando um alternativa promissora de superar a resistência microbiana em comparação com agentes antimicrobianos convencionais (HOSEINZADEH et al., 2017; HOSEINZADEH et al., 2014).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi sintetizar nanopartículas de prata biogênicas de origem fúngica e vegetal, e avaliar a influência de diferentes condições de pH sobre sua atividade antibacteriana.

## 2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Nanotecnologia

A nanotecnologia compreende principalmente o uso de nanopartículas variando de 1 nm a 100 nm de tamanho (BERA; BELHAJ, 2016). Um nanômetro (nm) é um bilionésimo de um metro ( $10^{-9}$  m), cerca de cem mil vezes menor que o diâmetro de um fio de cabelo humano, mil vezes menor que um glóbulo vermelho ou cerca de metade do diâmetro de uma cadeia de DNA (MORRIS; WILLIS, 2007).



**Figura 1.** Comparação de tamanho entre itens de escala nanométrica, micrométrica e milimétrica.

**Fonte:** [www.betaeq.com.br](http://www.betaeq.com.br)

A nanotecnologia abrange a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologia na área atômica a níveis moleculares ou macromoleculares, a criação e uso de estruturas, dispositivos e sistemas que possuem novas propriedades e funções devido ao seu tamanho pequeno e a capacidade de controlar ou manipular a matéria em escala atômica (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).

Hoje em dia, existem várias legislações na União Europeia (UE) e Estados Unidos da América (EUA) com referências específicas aos nanomateriais (NMs). No entanto, uma única definição internacionalmente aceita para NMs não existe.

Diferentes organizações possuem opiniões divergentes ao definir NMs (BOVERHOF et al., 2015; JEEVANANDAM et al., 2018).

Recentemente, a instituição British Standards propôs as seguintes definições para os termos científicos usados:

- Nanoescala: faixa de tamanho de aproximadamente 1 a 1000 nm.
- Nanociência: a ciência e o estudo da matéria em nanoescala, que trata da compreensão de seu tamanho e propriedades dependentes de sua estrutura e compara o surgimento de átomos ou moléculas individuais, ou diferenças relacionadas ao "bulk".
- Nanotecnologia: manipulação e controle da matéria na dimensão de nanoescala usando o conhecimento científico de várias aplicações industriais e biomédicas.
- Nanomaterial: material com qualquer estrutura interna ou externa na dimensão nanoescala.
- Nano-objeto: material que possui uma ou mais dimensões periféricas em nanoescala.
- Nanopartícula: nano-objeto com três dimensões externas em nanoescala. Os termos nanobastão ou nanoplaca são empregados, em vez de nanopartícula (NP), quando o comprimento do eixo mais longo e o mais curto de um nano-objeto são diferentes.
- Nanofibra: quando duas dimensões externas semelhantes em nanoescala e uma terceira dimensão maior estão presentes em um nanomaterial, ele é referido como nanofibra.
- Nanocomposto: estrutura multifásica com pelo menos uma fase na dimensão de nanoescala.
- Materiais nanoestruturados: materiais que contem nanoestrutura interna ou de superfície (BSI, 2011; JEEVANANDAM et al., 2018).

Um termo que também pode se referir a partículas de prata maiores é prata coloidal. Partículas coloidais podem ser definidas como partículas microscopicamente dispersas em outra substância, onde o tamanho da partícula na fase dispersa é normalmente de 2 a 500 nm (HADRUP; LAM, 2014; LI et al., 2010a).

## 2.2. Histórico da nanociência e nanotecnologia

O desenvolvimento da nanociência pode ser rastreado até a época dos gregos e de Demócrito no século V a.C., quando os cientistas consideraram a questão de a matéria ser contínua e, portanto, infinitamente divisível em pedaços menores, ou composta de partículas pequenas, indivisíveis e indestrutíveis, que passaram a ser chamadas de átomos (BAYDA et al., 2019).

Algumas das evidências do uso de NMs na história humana pode ser encontrada no "Cálice de Lycurgus" (Figura 2), que tem propriedades ópticas incomuns decorrentes de nanopartículas metálicas que o fazem parecer vermelho ou verde em luz transmitida ou refletida, respectivamente (FREESTONE et al., 2007; LEON; CHUNG; RINALDI, 2020).



**Figura 2.** Cálice de Lycurgus na cor verde quando visto por reflexão, e vermelho quando visto por transmissão.

**Fonte:** British museum (2021).

A análise de fragmentos do cálice, realizada nos laboratórios da General Electric em 1959, mostrou que este é constituído por vidro soda-cal-quartzo e tem cerca de 1% de ouro e prata, e também 0,5% de manganês como componentes. Os pesquisadores então presumiram que a cor incomum e o efeito disseminador do vidro são fornecidos pelo ouro coloidal. Posteriormente, quando as técnicas de pesquisa se tornaram mais avançadas, com o auxílio de um microscópio eletrônico e radiografias

foi descoberto que a causa da coloração incomum do cálice é advinda de partículas de ouro e prata de 50 a 100 nm de tamanho (TOLOCHKO, 2009).

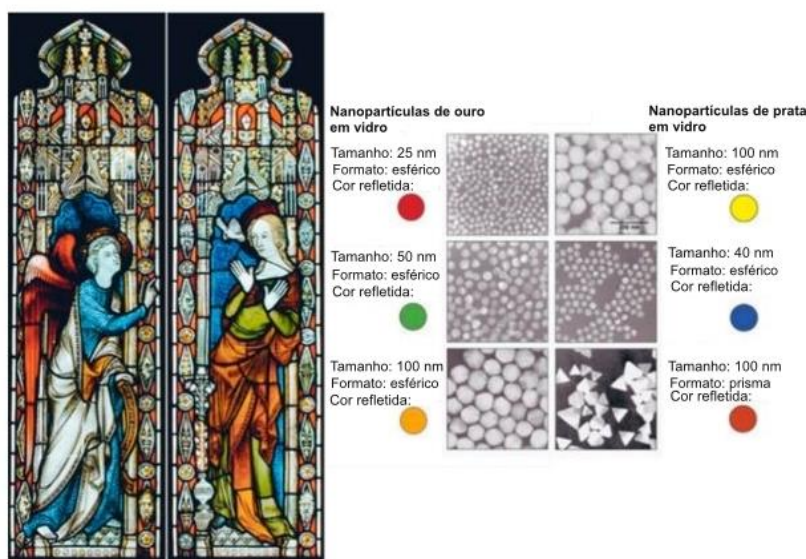
Na Idade Média, a engenharia de fabricação de vitrais multicoloridos na Europa alcançou grande perfeição. Como mostrado em pesquisas, as janelas continham aditivos de ouro e nanopartículas de outros metais (Figura 3) (TOLOCHKO, 2009).



**Figura 3.** Vitral medieval “Adoração dos magos”, 1390 d.C., colorido com nanopartículas.

**Fonte:** Metropolitan Museum of Art (2021).

NPs podem absorver e espalhar luz, bem como exibir diferentes cores dependendo de seu tamanho e forma (KHAN et al., 2018; MA et al., 2004). A absorção dependente do tamanho e espalhamento de nanopartículas metálicas foram resolvidos analiticamente pelo físico Gustav Mie em 1908. Sua teoria prevê que a absorção e o espalhamento, bem como a taxa de espalhamento para absorção aumentam de acordo com o aumento de tamanho da NP, possibilitando um melhor entendimento desses materiais, além de permitir uma forma para calcular o tamanho das NPs por espalhamento de luz fosse determinada (TCHERNIAK et al., 2010).



**Figura 4.** Efeito das nanopartículas em cores de um vitral.

**Fonte:** Adaptado de The New York Times (2021).

A nanotecnologia moderna foi fruto do cérebro de Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel de física em 1965. Em 1959, durante a reunião da American Physical Society, na Universidade Caltech (California Institute of Technology), ele apresentou uma palestra intitulada, “ There's Plenty of Room at the Bottom”, em que introduziu o conceito de manipulação da matéria a níveis atômicos. Esta ideia demonstrou novas maneiras de pensar, desde então as hipóteses de Feynman têm se provado corretas, e por essas razões ele é considerado o pai da nanotecnologia moderna (HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

A história exata da nanotecnologia ainda é desconhecida, e embora Richard Feynman seja considerado o cientista pioneiro na área, isso não é necessariamente verdade. Antes de Feynman, os nanomateriais já eram usados para diversas aplicações. John Uytynam patenteou o vidro à base de nanopartículas de ouro em 1449. No século XVI, Theophrastus von Hohenheim, um médico suíço mais conhecido como Paracelsus, usou nanopartículas de ouro para tratar pacientes que sofriam de várias doenças. Portanto, o campo da nanotecnologia não é necessariamente novo, mas seus métodos têm avançado ao longo do tempo (RAFIQUE et al., 2020).

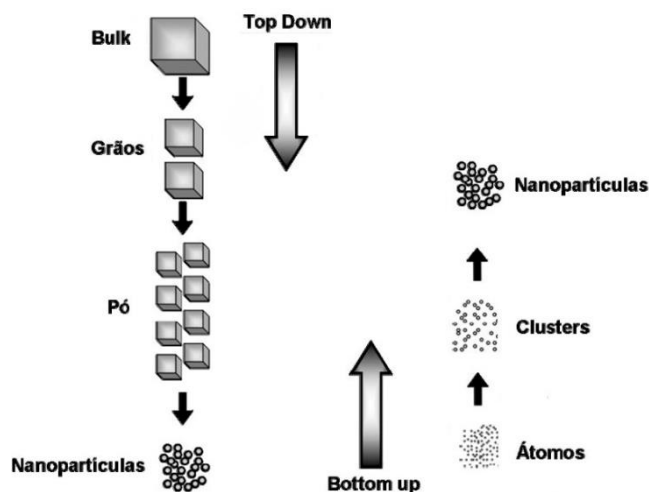
Como mencionado, Feynman não introduziu o conceito de nanotecnologia, embora o tenha elaborado por meio de sua palestra. Tal termo, foi introduzido por Norio Taniguchi, em 1974, para descrever os diferentes mecanismos de

processamento de materiais nanométricos e para a descrição de precisão de materiais superfinos até nanoescala. O surgimento de clusters na ciência coloidal e a invenção do microscópio de tunelamento com varredura (STM) encorajaram mais trabalhos em nanotecnologia. Essas conquistas abriram novos caminhos de pesquisa, levando pesquisadores e cientistas a novas áreas cheias de potencial para uso de nanotecnologia (RAFIQUE et al., 2020).

### 2.3. Síntese de nanopartículas metálicas

Há uma variedade de métodos para obtenção de NPs metálicas, e o tamanho, estabilidade e propriedades são intimamente dependentes da metodologia escolhida. De todos os métodos, aqueles que envolvem sistemas coloidais são os mais usados, visto que permitem uma faixa maior de aplicação (RYCENGA et al., 2011).

Os métodos de síntese de NPs de metal são divididos principalmente em abordagens "top down" (de cima para baixo) e "bottom up" (de baixo para cima) (Figura 5). A abordagem de cima para baixo desincorpora materiais a granel para gerar as nanoestruturas necessárias, enquanto o método de baixo para cima reúne átomos e moléculas individuais em nanoestruturas maiores para gerar materiais nanométricos (CHUGH et al., 2018; LEE; JUN, 2019).



**Figura 5.** Representação das vias top down e bottom up na síntese de nanopartículas.

**Fonte:** adaptado de Gorup (2010).

Vários métodos físicos e químicos são utilizados para sintetizar as AgNPs, geralmente estes necessitam de estabilizantes, porém métodos de síntese biológicos apresentam alto rendimento e elevada estabilidade natural (GURUNATHAN et al., 2009).

### **2.3.1. Síntese de nanopartículas metálicas por métodos químicos**

Quando um precursor de prata (Ag) é misturado com um agente redutor e um estabilizador em condições adequadas, ocorre a formação de nanoestruturas de Ag com diferentes tamanhos e formas (RYCENGA et al., 2011; ZHANG et al., 2010). Agentes redutores químicos, como borohidreto de sódio, álcoois e citrato de sódio, são normalmente usados para reduzir os cátions Ag dissolvidos em átomos de Ag que crescem em pequenos aglomerados e, eventualmente, nanoestruturas (RYCENGA et al., 2011; WU et al., 2008; YEE et al., 1999). Polímeros e surfactantes são usados para estabilizar as nanoestruturas durante e após a formação, e em alguns casos, também podem desempenhar o papel de direcionar o crescimento das partículas para as formas desejadas (RYCENGA et al., 2011).

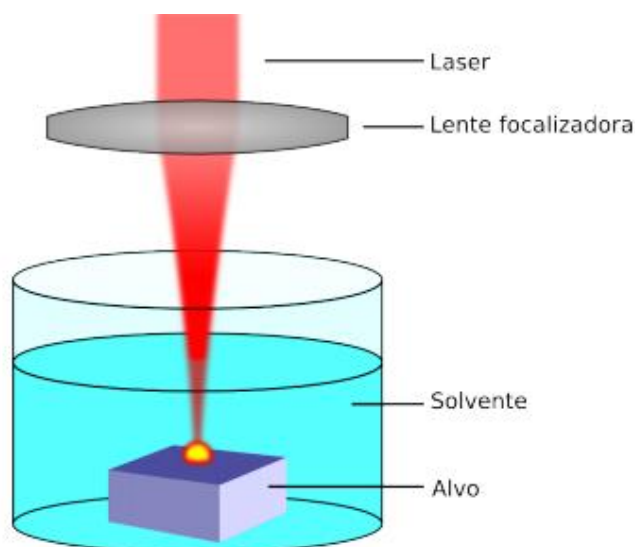
A formação de soluções coloidais por meio da redução do sal de prata geralmente ocorre em dois estágios: nucleação e subsequente crescimento (Figura 6). O estágio de nucleação envolve a redução de  $Ag^+$  a átomos de  $Ag^0$ , e subsequente agregação de átomos de  $Ag^0$  para formação de clusters (KYTSYA et al., 2015; LIAO; LI; TJONG, 2019). Esses estágios podem ser manipulados monitorando as condições de reação, como pH, temperatura, precursores, redutores e estabilizadores. Assim, a forma, o tamanho e a distribuição de tamanhos dos AgNPs podem ser controlados variando os parâmetros da reação (LIAO; LI; TJONG, 2019).

### **2.3.2. Síntese de nanopartículas metálicas por métodos físicos**

A síntese física de NPs inclui a abordagem de evaporação-condensação e a técnica de ablação a laser (AMENDOLA; MENEGHETTI, 2009; IRAVANI et al., 2014; LEE; JUN, 2019). Ambas abordagens são capazes de sintetizar grandes quantidades de NPs com alta pureza e sem o uso de produtos químicos, que liberam substâncias tóxicas e prejudicam a saúde humana e do meio ambiente. No entanto, a formação de aglomeração é muitas vezes um grande desafio, pois nesse caso, os agentes de cobertura não são usados. Além disso, também consomem mais energia e requerem uma duração relativamente maior de síntese, além de equipamentos complexos, os quais aumentam seu custo operacional. A técnica de evaporação-condensação normalmente usa uma rota de fase gasosa que utiliza um forno tubular para sintetizar nanoesferas à pressão atmosférica (KRUIS; FISSAN; RELLINGHAUS, 2000; LEE;

JUN, 2019). O centro do forno tubular contém um recipiente que transporta uma fonte de metal de base que é evaporada no gás de transporte, permitindo a síntese final de NPs. No entanto, a síntese por evaporação-condensação através desse método tem inúmeras desvantagens. O forno tubular ocupa grande espaço, consome alta energia e requer uma duração maior para manter sua estabilidade térmica (JUNG et al., 2006; LEE; JUN, 2019).

Outra abordagem de síntese física é por meio da ablação a laser. As NPs podem ser sintetizadas por ablação a laser de uma fonte de metal a granel, colocada em um ambiente líquido (Figura 7). Após ser irradiado com um laser pulsado, o ambiente líquido passa a conter apenas as NPs do metal base utilizado, livre de outros íons, compostos ou agentes redutores (CHEN; YEH, 2002; LEE; JUN, 2019). Vários parâmetros, como potência do laser, duração da irradiação, tipo de fonte do metal base e propriedade do meio líquido, influenciam as características das NPs metálicas formadas. Ao contrário da síntese química, a síntese de NPs por ablação a laser é pura e não contaminada, pois este método utiliza surfactantes suaves no solvente sem envolver nenhum outro reagente químico (CHUGH et al., 2018; LEE; JUN, 2019).

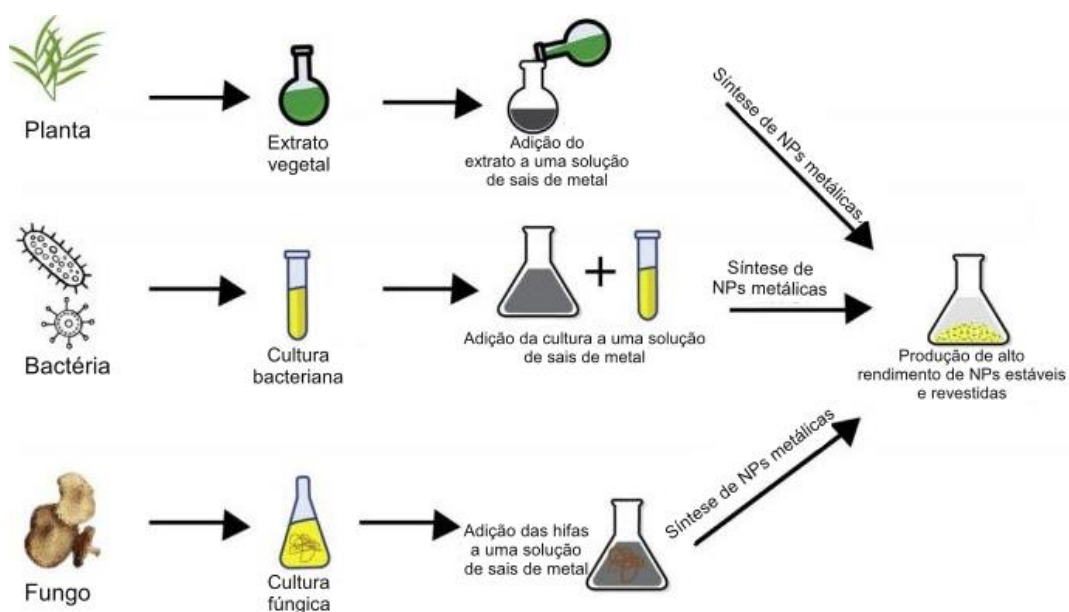


**Figura 6.** Representação da técnica de ablação a laser, utilizada nos métodos físicos de síntese.

**Fonte:** Rosa (2014).

### 2.3.3. Síntese de nanopartículas metálicas por sistemas biológicos

Dentre os diferentes métodos para a síntese de NPs, os métodos de biorredução são ambientalmente benéficos, econômicos e diretos. Muitos organismos vivos diferentes podem ser usados para a síntese de NPs, tais como, plantas, bactérias e fungos. Devido à presença natural de metabólitos secundários, aminoácidos, proteínas e vitaminas nas fontes biológicas, a aglomeração de partículas é evitada durante o processo de biorredução (SABLE et al., 2020; ZHANG et al., 2016).



**Figura 7.** Representação dos métodos de síntese biológica de nanopartículas metálicas através do uso de plantas, bactérias e fungos.

**Fonte:** Adaptado de Singh et al. (2020).

A síntese de NPs mediada por plantas e microrganismos é uma abordagem “bottom up” em que a oxidação e redução são as duas principais reações envolvidas na formação de nanopartículas. Biomoléculas como proteínas, compostos fenólicos, açúcares, polissacarídeos e outros são considerados responsáveis pela conversão de íons metálicos carregados em suas nanoformas (AHMAD et al., 2019; OVAIS et al., 2018). A síntese mediada por plantas pode ser classificada em extracelular e intracelular. O método extracelular é empregado quando o extrato vegetal é usado como matéria-prima para a síntese. A síntese intracelular ocorre nas células do tecido vegetal, através do uso de enzimas. Pós-síntese, as NPs são recuperadas através da ruptura da parede celular das células vegetais. A síntese a partir do extrato vegetal é comparativamente um método mais barato e resulta em maior rendimento devido à

presença de maior quantidade de fitoquímicos presentes, que podem estabilizar ou reduzir os íons metálicos em NPs metálicas (MOHAMMADINEJAD et al., 2019; SINGH et al., 2020).

A síntese por bactérias ocorre através da enzima redutase, presente na célula, que catalisa a redução de íons metálicos em nanopartículas metálicas (LI et al., 2016; SINGH et al., 2020).

Os fungos podem ser usados para a síntese de nanopartículas tanto de forma intracelular quanto extracelular. O mecanismo proposto durante a síntese intracelular envolve a ligação de metais pesados à parede celular fúngica através de proteínas ou enzimas, o que produz interações eletrostáticas. Isto leva à transferência de elétrons e à redução dos íons de metal. Na síntese extracelular, a interação de íons metálicos e enzimas, principalmente redutase, causa a subsequente formação de nanopartículas na solução (KASHYAP et al., 2013; KHAN et al., 2018). No método intracelular, as nanopartículas são produzidas dentro do citoplasma, seguido de agregação em vesículas e secreção através da membrana celular por exocitose (ZHAO et al., 2018).

## **2.4. Tipos de nanopartículas**

### **2.4.1. Nanopartículas proteicas**

As NPs à base de proteínas tem interesse especial por serem biodegradáveis, metabolizáveis, facilmente manipuladas e possuem diversas possibilidades de alteração de superfície e/ou modificação (TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017; WEBER; KREUTER; LANGER, 2000). Os avanços na tecnologia médica também trouxeram técnicas para sintetizar materiais à base de proteínas que oferecem maior eficácia e custos reduzidos em comparação com materiais sintéticos (DEFRATES et al., 2018; JAO et al., 2017).

Polímeros de proteína são macromoléculas naturais derivadas de plantas e animais, o que as torna um recurso renovável de fácil obtenção. Além de sua biodegradabilidade e propriedades ajustáveis, nanopartículas fabricadas a partir de materiais à base de proteínas são frequentemente biocompatíveis e podem ser facilmente processadas (MAHMOUDI et al., 2011; TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017; WEBER; KREUTER; LANGER, 2000). Há uma variedade de

polímeros de proteínas diferentes adequados para a entrega de drogas à base de nanopartículas, cada um com suas próprias relações estruturais-funcionais exclusivas. O uso dessas NPs na medicina é focado principalmente em sua aplicação para a entrega de medicamentos (TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017).

Devido à ampla gama de aplicações para NPs de proteínas, existem muitos tipos diferentes de biomateriais usados para criá-las. O tipo de polímero de proteína necessário pode variar dependendo da aplicação. Alguns dos materiais mais comuns são: fibroína de seda, queratina, colágeno, gelatina, elastina, zeína de milho e proteína de soja (DEFRATES et al., 2018).

#### **2.4.2. Nanopartículas lipídicas**

NPs de lipídios sólidos e carreadores de lipídios nanoestruturados são partículas coloidais com tamanhos variando de 10 a 1000 nm (DUONG; NGUYEN; MAENG, 2020; MEHNERT; MÄDER, 2001). Eles oferecem alternativas para outros sistemas coloidais de entrega de drogas, tais como lipossomas, emulsões e nanopartículas poliméricas. Podem ser preparados de forma reproduzível na ausência de solventes orgânicos tóxicos, usando técnicas como homogeneização em alta pressão ou agitação em alta velocidade (DE SOUSA MARCIAL; CARNEIRO; LEITE, 2017; DUONG; NGUYEN; MAENG, 2020; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

Os lipídios usados são fisiológicos, estáveis em temperatura ambiente e corporal, e as NPs são estabilizadas por um ou dois surfactantes (MEHNERT; MÄDER, 2001). As vantagens das NPs de lipídios sólidos sobre outros sistemas coloidais incluem: liberação controlada e direcionada do medicamento; maior estabilidade dos medicamentos incorporados; maior capacidade de carga de drogas; facilidade de produção em grande escala; e toxicidade diminuída ou inexistente, pois os lipídios e emulsificantes são geralmente reconhecidos como seguros, e solventes orgânicos não são usados na produção desses materiais (CUNHA et al., 2017; WISSING; KAYSER; MÜLLER, 2004; MEHNERT; MÄDER, 2001).

NPs lipídicas foram investigadas pela primeira vez em 1990 para obter novos sistemas de entrega coloidal com maior eficiência e segurança do que os existentes na época. Desde então, vários grupos de pesquisa têm estudado esses sistemas, disponibilizando muitas informações sobre a preparação, caracterização, segurança e potenciais benefícios terapêuticos dos mesmos. Até o presente momento, apenas

produtos cosméticos são comercializados, embora algumas formulações de medicamentos estejam em ensaios clínicos (CUNHA et al., 2017; MÜLLER; SHEGOKAR; KECK, 2011; WICKI et al., 2015;).

#### **2.4.3. Nanopartículas de polissacarídeos**

A quitosana é um polissacarídeo alcalino de natureza única, derivado a partir da quitina por um processo de desacetilação, esse processo foi realizado pela primeira vez por Charles Rouget em 1859, ao ferver a quitina na presença de hidróxido de potássio concentrado para obtenção de quitosana. (ROUGET, 1859; ZHANG et al., 2019). Este polímero natural tem atraído grande atenção de pesquisadores para uso como agente em compostos farmacêuticos por suas especificações particulares, como baixo custo, baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e compatibilidade com tecidos (MEHRABI et al., 2018; MOHAMMADPOURDOUNIGHI et al., 2010).

As NPs com estrutura de quitosana tem sido amplamente estudadas, elas podem aumentar a entrega paracelular de agentes por meio de interações entre as cargas positivas do polímero e a cargas negativas da membrana celular, ou por meio da complexação de íons de cálcio (MEHRABI et al., 2018; SANDRI et al., 2015).

Até agora, diversas técnicas foram introduzidas para a síntese de nanopartículas de quitosana, como complexação de polieletrólitos, gelificação ionotrópica, evaporação ou co-precipitação de solvente, microemulsificação, coacervação complexa e emulsificação-difusão do solvente (MEHRABI et al., 2018; SONAJE et al., 2010).

#### **2.4.4. Nanopartículas metálicas**

De todas as NPs, as metálicas (NPMs) geram considerável interesse comercial devido suas propriedades únicas, como tamanho reduzido e a maior área de superfície em relação ao volume, bem como diferentes propriedades eletrônicas, magnéticas, ópticas e mecânicas. As NPMs têm sido amplamente incluídas em uma grande diversidade de produtos e em vários campos, como dispositivos eletrônicos, cosméticos, tintas, aditivos em alimentos, e sistemas biológicos e médicos (ANDRA et al., 2019; PARADA et al., 2019; YAO et al., 2019).

Uma das serventias mais atrativas desses materiais para aplicação médica são as NPs magnéticas. Essas não apenas podem ser direcionadas para o local específico sob a orientação do campo magnético, como também podem ser aquecidas sob a força magnética (AMINI, 2019; DOBSON, 2006).

Devido às diversas propriedades ópticas, as NPMs foram atraindo a atenção da comunidade científica há séculos. Alguns dos recursos ópticos vinculados a NPMs são: índices de refração baixo e alto, propriedades de fotoluminescência, ressonância plasmônica de superfície e cristais fotônicos. Além disso, possuem diversas aplicações no campo biomédico com um vasto potencial para o crescimento contínuo nesta área. Várias NPMs foram amplamente implementadas por suas propriedades antibacterianas, ópticas, e anticancerígenas, aplicadas principalmente para fins diagnósticos e terapêuticos (AHMAD et al., 2019).

#### **2.4.5. Nanopartículas de prata**

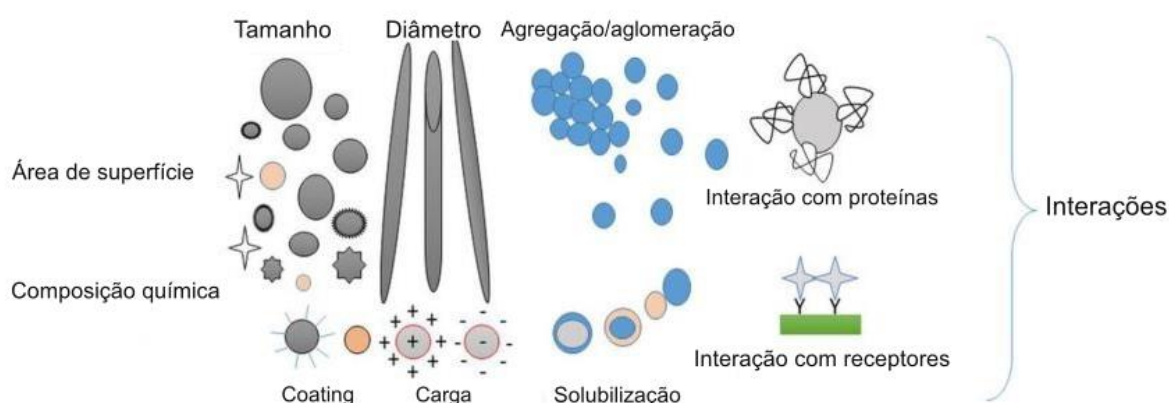
O tipo de material usado para preparar as NPs é um dos parâmetros importantes que afetam a eficácia antimicrobiana resultante (HOSEINZADEH et al., 2017). Recentemente, AgNPs foram investigadas extensivamente devido às suas características físicas, químicas e biológicas superiores, essa superioridade decorre principalmente do tamanho, forma, composição, cristalinidade e estrutura das mesmas em comparação com suas formas em massa (LEE; JUN, 2019; SUN; XIA, 2002; SYAFIUDDIN et al., 2017).

De acordo com evidências, AgNPs são consideradas NPs inorgânicos mais comuns usados como agentes antimicrobianos (KHEZERLOU et al., 2018; ZINJARDE, 2012). São potenciais agentes frente a uma ampla gama de microrganismos (ALLAHVERDIYEV et al., 2011; KHEZERLOU et al., 2018), e tem sido revelado que AgNPs mostram altas atividades antimicrobianas em comparação com sua forma iônica (JO; KIM; JUNG, 2009; KHEZERLOU et al., 2018). A aplicação de aditivos Ag como antimicrobianos é amplamente usada em diversos plásticos, produtos de biopolímeros e têxteis, fora as diversas aplicações biomédicas (KHEZERLOU et al., 2018; MALARKODI et al., 2014). Também são utilizados em ferramentas cirúrgicas, roupas, cosméticos, desinfetantes, curativos (FILON et al., 2015), desinfecção de água, terapia anticâncer, optoeletrônicos e diagnósticos (LEE; JUN, 2019). Recentemente, tem ocorrido o amplo uso de AgNPs em vários

subcampos da nanomedicina, incluindo nanoeletrônica, diagnóstico e imagem molecular. AgNPs podem ser utilizadas como sondas altamente sensíveis para direcionamento e imagem de pequenas moléculas, DNA, proteínas, tecido de células e até mesmo tumores, NPs com ressonância de plasmon mais forte e mais nítida têm sido amplamente utilizados em sistemas de imagem, particularmente para imagem celular com agentes de contraste (LEE; JUN, 2019).

## 2.5. Mecanismos de atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata

Os mecanismos de toxicidade das NPs dependem da composição, modificação de superfície e propriedades intrínsecas das mesmas, além da espécie bacteriana (HAJIPOUR et al., 2012).



**Figura 8.** Propriedades físico-químicas dos NPs envolvidos na atividade biológica: tamanho, forma, área de superfície, composição química, revestimento, carga e interações entre NPs e proteínas ou receptores que levam à aglomeração e agregação na membrana celular.

**Fonte:** Adaptado de Khezerlou et al. (2018).

A atividade antibacteriana da prata é atribuída principalmente aos íons  $Ag^+$ , que são liberados de uma substância que contém prata (MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010; NAKAMURA et al., 2019). Geralmente, AgNPs bem dispersos em soluções fisiológicas exibem maior eficácia bactericida. Além disso, o efeito de eliminação de AgNPs contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas aumenta com a diminuição do tamanho das partículas (LIAO; LI; TJONG, 2019).

AgNPs podem servir como um veículo para entrega de  $Ag^+$  de forma mais eficaz (sendo menos suscetível à ligação e biodisponibilidade reduzida por ligantes naturais comuns) para o citoplasma e membrana da bactéria, cuja força motriz de

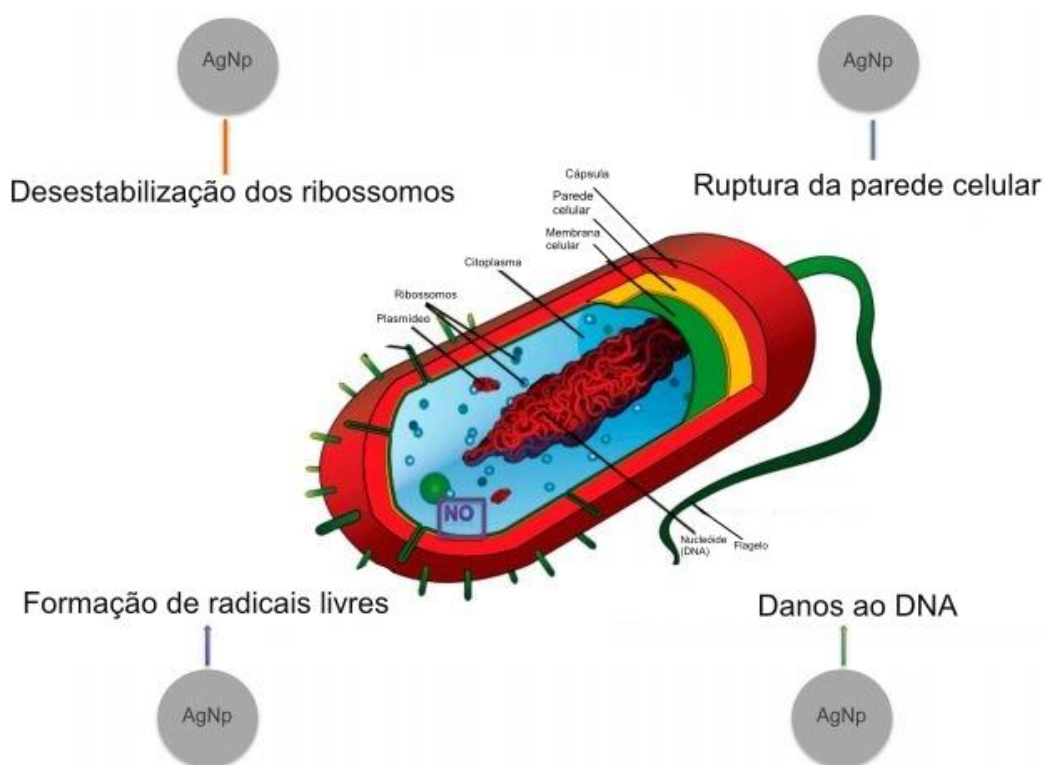
prótons diminuiria o pH local, aumentando a liberação de Ag<sup>+</sup> (DURÁN et al., 2016; XIU et al., 2012).

Um parâmetro importante da toxicidade antimicrobiana das nanopartículas de prata é a área de superfície do nanomaterial. Já foi constatado que a maior concentração de íons de prata liberados foi observada no caso da maior área de superfície de AgNPs, enquanto a menor concentração liberada foi observada em AgNPs com a área de superfície mais baixa, resultando em propriedades antimicrobianas fracas (DURÁN et al., 2016; ZAWADZKA et al., 2014).

Muitos estudos têm buscado estabelecer um mecanismo de ação da atividade antibacteriana exibida pela prata em sua forma coloidal e iônica. Duas teorias importantes sobre o mecanismo proposto sugerem; I): uma interrupção da funcionalidade da membrana a partir de uma interação entre os íons Ag<sup>+</sup> liberados e a membrana celular, e II): danos extensivos na membrana celular causados pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos à célula devido ao estresse oxidativo (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2013; IVASK et al., 2014; VIMBELA et al., 2017). Em suma, o primeiro mecanismo sugere que os íons Ag<sup>+</sup> liberados de AgNPs podem se ligar a grupos tiol (-SH) de proteínas e enzimas encontradas na superfície celular, causando desestabilização da membrana celular. AgNPs podem então aderir à parede da membrana, causando orifícios através dos quais eles podem mais tarde penetrar na bactéria e interagir com componentes intracelulares ou proteínas contendo enxofre. O segundo mecanismo sugere que ROS, como o oxigênio reativo, podem ser produzidos na membrana celular e levar a danos irreversíveis à replicação do DNA, afetando os processos metabólicos e a divisão celular (VIMBELA et al., 2017; ZHANG et al., 2013). Algumas espécies de ROS, são peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radicais hidroxila (OH<sup>-</sup>) e superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (GURUNATHAN; CHOI; KIM, 2018; LIAO; LI; TJONG, 2019).

A prata pode interagir com a porção proteica para formar complexos com doadores de elétrons que contêm átomos de oxigênio, fósforo, nitrogênio ou enxofre (AHEARN; MAY; GABRIEL, 1995; DURÁN et al., 2016; HOLT; BARD, 2005). A interação com grupos tiol é a mais descrita e estudada para íons de prata e nanopartículas de prata. Várias proteínas de membrana bacteriana são conhecidas por conter enxofre, e a interação química entre a prata e essas proteínas pode levar

à inativação de enzimas e proteínas ligadas à membrana (DURÁN et al., 2016; HOLT; BARD, 2005).



**Figura 9.** Mecanismos de ação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata.

**Fonte:** Adaptado de Franci et al. (2015).

Outro possível mecanismo proposto, envolve o gradiente eletroquímico de prótons por processos respiratórios em bactérias, que é a força motriz da síntese de ATP. AgNPs podem interromper a fonte de energia para todas as reações que dependem de energia, o que leva à morte celular, pois a síntese de ATP permite a adesão e proliferação celular (CAO et al., 2011; DURÁN et al., 2016; REIDY et al., 2013).

A atividade das nanopartículas de prata abaixo de 10 nm ocorre principalmente pela própria nanopartícula, enquanto em tamanhos maiores, o mecanismo predominante ocorre através dos íons de prata. Os alvos deste material nanoestruturado foram claramente comprovados: ruptura da membrana celular e transformação do DNA via ROS como agente principal (DURÁN et al., 2016).

A última década foi favorável para o desenvolvimento dos mecanismos antimicrobianos das nanopartículas de prata. Particularmente para bactérias, elementos-chave neste processo foram elucidados; por exemplo, o oxigênio é necessário para a toxicidade das nanopartículas de prata e para a correlação entre as concentrações intracelulares de prata e seus efeitos tóxicos (BONDARENKO et al., 2013; DURÁN et al., 2016; XIU et al., 2012). As nanopartículas de prata devem estar em contato com a bactéria, na superfície ou mesmo no citoplasma. Para atender a essa necessidade, as nanopartículas de prata ou os íons de prata liberados devem cruzar a parede da célula bacteriana (DURÁN et al., 2016; LI et al., 2010b).

## 2.6. Antimicrobianos

Em 1947, S. A. Waksman definiu o termo "antibiótico" da seguinte forma: "Um antibiótico é uma substância química, produzida por microrganismos, que tem a capacidade de inibir o crescimento e até causar a destruição de bactérias e outros microrganismos" (MOHR, 2016; WAKSMAN, 1947). Hoje, "antibiótico" tem vários significados: (I) um produto químico orgânico de origem natural ou sintética que inibe ou mata bactérias patogênicas; (II) qualquer substância com potencial antimicrobiano, ou, (III) na tradição de Waksman, limitado a substâncias antimicrobianas de origem microbiana. De qualquer forma, todas essas definições coexistem na literatura (BENTLEY; BENNETT, 2003; MOHR, 2016).

Os antibióticos tiveram efeito não apenas no tratamento de doenças infecciosas, mas também na sociedade, alterando a morbidade e a mortalidade. Desde a introdução dos primeiros antimicrobianos, em 1911, vários novos medicamentos foram descobertos, fornecendo aos médicos mais opções terapêuticas para doenças que antes ameaçavam a vida (ZAFFIRI; GARDNER; TOLEDO-PEREYRA, 2012).

Com a descoberta da penicilina em 1928, os antibióticos entraram sua era de ouro, e muitos foram isolados de produtos naturais ou sintetizados quimicamente (AMINOV, 2010; BEUTLER, 2009; TANG; ZHENG, 2018). A descoberta e subsequente produção em grande escala de antibióticos no início século XX foi uma das conquistas mais importantes na história da medicina. Esta nova droga, além de possibilitar um amplo conhecimento sobre patógenos e causar melhora nas medidas de higiene,

tiraram o medo de muitas doenças infecciosas e aumentaram consideravelmente qualidade e expectativa de vida da população (MOHR, 2016).

No entanto, o uso excessivo e indiscriminado de antibióticos, em conjunto com o declínio das pesquisas e o desenvolvimento de novos antibióticos, resultaram no rápido aumento de microrganismos resistentes à essas drogas, como resultado, infecções bacterianas continuam a ser a principal causa de morbidade e mortalidade hoje em dia (ABRAHAM; CHAIN, 1940; AMINOV; MACKIE, 2007; TANG; ZHENG, 2018).

## **2.7. Resistência bacteriana: um problema para antimicrobianos**

A resistência antimicrobiana é um problema global de saúde pública que ameaça nossa capacidade de tratar infecções bacterianas com sucesso (MCEWEN; COLLIGNON, 2018; WHO, 2014). Desde a descoberta dos antibióticos em 1920, o uso de novos agentes antimicrobianos tem sido acompanhado pelo aparecimento de resistência bacteriana a eles. A grande flexibilidade genética de bactérias e a pressão seletiva exercida pelo uso desses agentes são responsáveis para o aparecimento e perpetuação da resistência (KLEMM; WONG; DOUGAN, 2018; NIÑO-MARTÍNEZ et al., 2019).

Através do processo de seleção natural, os microrganismos confrontados com a pressão da seleção antimicrobiana aumentam sua aptidão adquirindo e expressando genes de resistência, e então, passam esses genes para outras bactérias. Dessa forma, o uso excessivo de antimicrobianos é um fator importante do fenômeno de resistência, assim como outros fatores que promovem a disseminação de bactérias resistentes de forma local e global (AMINOV; MACKIE, 2007; TANG; ZENG, 2018). Existem vários fatores que podem contribuir para a propagação de resistência a antibióticos, incluindo uso inadequado de antibióticos na saúde e na agricultura, e a falta de novos agentes antimicrobianos (MARTIN; BACHMAN, 2018).

O desenvolvimento de resistência se tornou um fator importante na luta contra doenças infecciosas. Os mecanismos de resistência a antibióticos são extensivamente estudados, desde a desintoxicação da molécula do antibiótico a mutações no alvo designado. As moléculas de antibióticos podem ser: (I) removidas

por bombas de efluxo, (II) modificadas para serem menos eficientes, ou (III) destruídas. Os alvos antibióticos podem ser: (I) modificados enzimaticamente, (II) tornados insensíveis por mutações, (III) protegidos por uma barreira, e (IV) substituídos (PAITAN, 2018).

Existem três tipos principais de resistência aos antibióticos: intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca compreende todas as propriedades inerentes fornecidas pelas características de um microrganismo específico que limitam a ação dos antimicrobianos. O segundo tipo é a resistência adquirida, em que um microrganismo originalmente suscetível pode se tornar resistente, seja pela incorporação de novo material genético (plasmídeos, transposons, integrons ou DNA nu, etc.) ou como resultado de mutações. Finalmente, existe a resistência adaptativa, uma área relativamente inexplorada que envolve um aumento temporário na capacidade da bactéria de sobreviver a um contato com o antibiótico devido a alterações na expressão de genes e/ou proteínas como resultado da exposição a um gatilho ambiental, por exemplo, estresse, condições nutricionais, estado de crescimento, e níveis subinibitórios de antibióticos (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

## **2.8. Microrganismos**

### **2.8.1. *Escherichia coli***

Entre as bactérias resistentes, *Escherichia coli* é o patógeno bacteriano Gram-negativo mais conhecido e estudado, e ocasiona uma ampla gama de doenças clínicas que afetam todas as faixas etárias. Esse microrganismo habita principalmente o trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente e pode ser encontrado no meio ambiente por meio de fezes e estações de tratamento de águas residuais (BERTHE et al., 2013; PAITAN, 2018). Representa uma coleção diversa de bactérias que geralmente são comensais, mas também incluem patógenos que causam uma variedade de doenças humanas, resultando em mais de 2 milhões de mortes a cada ano (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PAITAN, 2018).

A resistência de *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas a vários antimicrobianos é devido ao desenvolvimento de muitos mecanismos diferentes. Estes incluem a inativação de antibióticos e enzimas modificadoras,  $\beta$ -lactamases,

alteração da permeabilidade, bombas de efluxo, e mutações de alvo e desvio da via metabólica (PAITAN, 2018).

### **2.8.2. *Enterococcus faecium***

*Enterococcus faecium*, é uma espécie de cocos Gram-positivos, reconhecido como um patógeno oportunista globalmente importante, capaz de causar uma variedade de infecções humanas associadas a altas taxas de mortalidade, particularmente em indivíduos hospitalizados ( DE FÁTIMA SILVA LOPES et al., 2005; GORRIE et al., 2019; VAN TYNE; GILMORE, 2014;). São uma das principais causas de endocardite, infecções do trato urinário e bacteremia (RAZA et al., 2018; ZHANG et al., 2017).

Os enterococos tornaram-se reconhecidos como importantes patógenos nosocomiais devido à sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos (por exemplo, penicilina, ampicilina e a maioria das cefalosporinas) e sua capacidade de rapidamente adquirir virulência e determinantes de resistência a múltiplas drogas (AHMED; BAPTISTE, 2018; KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014; TENOVER; MCDONALD, 2005). Nas últimas décadas, houve um aumento significativo nas taxas de resistência antimicrobiana adquirida em *E. faecium*, incluindo *E. faecium* resistente à vancomicina (DESHPANDE et al., 2007; GORRIE et al., 2019; WERNER et al., 2008).

### **2.8.3. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria em formato de cocos, Gram-positiva, imóvel e coagulase-positiva. Embora o gênero *Staphylococcus* inclua 52 espécies e 28 subespécies, *S. aureus* é de longe o mais relevante clinicamente. Pode ser encontrado na microbiota comensal humana da mucosa nasal em 20-40% da população em geral (BECKER et al., 2017; LEE et al., 2018; WERTHEIM et al., 2005). *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno humano e foi reconhecido pela primeira vez como o agente etiológico de abscessos supurativos há mais de 130 anos (MACDONALD; SMITH, 1984; MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017). As infecções por *S. aureus* variam de infecções leves de pele e tecidos moles a endocardite, osteomielite crônica, pneumonia ou bacteremia, que estão associadas a taxas significativas de morbidade e mortalidade (LOWY, 1998; MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017; ROBERTS; CHAMBERS, 2005). As infecções

causadas por esse patógeno ameaçam seriamente a saúde humana, além de causar enormes perdas econômicas em fazendas (POSADOWSKA; BRZYCHCZY-WŁOCH; PAMUŁA, 2015; VON EIFF et al., 2001; ZHOU et al., 2018).

Existem vários mecanismos de resistência em *S. aureus*, o desenvolvimento de genes é um deles. A resistência à metilina ou cefalosporina foi conferida pelo gene *mecA* e seus genes homólogos *mecB* e *mecC* (BECKER et al., 2014; ZHOU et al., 2018). O gene *mecA* codifica PBP2a ou PBP2', um tipo específico de proteína de ligação à penicilina (PBP). Essas proteínas degradam o anel  $\beta$ -lactâmico, que confere a atividade da penicilina, cefalosporina e metilina (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2009; ZHOU et al., 2018). Outra estratégia de resistência presente é a bomba de efluxo, que é capaz de expulsar ativamente os agentes antimicrobianos para fora da célula (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009; ZHOU et al., 2018).

#### **2.8.4. *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* foi descoberta pela primeira vez por Edwin Klebs, um microbiologista alemão. É uma bactéria gram-negativa, não móvel, encapsulada, em forma de bastonete e pertencente à família das Enterobacteriaceae. Podem ser encontradas comumente no ambiente, como águas superficiais, esgotos, solo e também nas plantas. Podem também, colonizar a camada mucosa de mamíferos, como a cavidade oral e trato gastrointestinal (KAUR; VADIVELU; CHANDRAMATHI, 2018; MATSEN; SPINDLER; BLOSSER, 1974; SELDEN et al., 1971). Elas são o agente causador de vários tipos de infecções em humanos, incluindo infecções do trato respiratório, trato urinário e corrente sanguínea (MARTIN; BACHMAN, 2018; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

*K. pneumoniae* pode ser distinguida e classificada por sorotipagem com base em seus antígenos de cápsula. Existem atualmente cerca de 82 sorotipos, sendo 77 pertencentes ao antígeno K e outros 12 pertencentes ao sorotipo antígeno O. Entre todos os sorotipos, o K1 e K2 são os mais virulentos devido à sua cápsula de polissacarídeo que proporciona escapar da fagocitose por macrófagos (BRISSE; ISSENHUTH-JEANJEAN; GRIMONT, 2004; KAUR; VADIVELU; CHANDRAMATHI, 2018; ØRSKOV; FIFE-ASBURY, 1977).

Esse patógeno está presente no grupo das diversas bactérias que apresentaram um aumento dramático na resistência a antimicrobianos nas últimas

décadas. Vários mecanismos de resistência a antibióticos são encontrados neste microrganismo. O genoma acessório é fundamental para a resistência aos antibióticos em *K. pneumoniae*, contendo genes de resistência baseados em plasmídeo e rapidamente reduzindo o arsenal de antibióticos eficazes contra este microrganismo (MARTIN; BACHMAN, 2018).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Sintetizar biologicamente e caracterizar as nanopartículas de prata produzidas, bem como, avaliar a atividade antimicrobiana das mesmas em pH ácido, neutro e básico.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- Produzir e caracterizar nanopartículas de prata biogênicas de origem fúngica e vegetal;
- Determinar a influência do pH ácido, neutro e básico na atividade antibacteriana das nanopartículas;
- Determinar a influência do pH ácido, neutro e básico na cinética de crescimento bacteriano em contato com as AgNP;
- Determinar a influência do pH ácido, neutro e básico na atividade antimicrobiana das AgNPs na inibição da formação de biofilmes bacterianos;
- Observar as alterações ultraestruturais causadas na morfologia das bactérias pelas AgNPs.

## **4.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Produção de AgNP fúngica**

Para a produção da AgNP de origem fúngica, foi utilizado o fungo *Lichtheimia ornata*, que foi previamente cultivado em Ágar Malte (Acumedia, Michigan, USA) enriquecido com 0,5% de extrato de levedura (Himedia, Mumbai, Índia) em pH 5,6 a 28° C por três dias. Após o crescimento, os discos miceliais de 0,9 cm foram retirados e depositados em placas contendo Ágar malte e incubados a 28° C novamente por

três dias. Após esse período, o micélio foi separado dos meios de cultura e inserido em frascos Erlenmeyer contendo água destilada estéril, em uma proporção de 1 g de micélio para 10 mL de água, e então incubado em shaker à 28° C, 150 rotações por minuto (rpm), durante três dias. Após esse período, o conteúdo do Erlenmeyer foi centrifugado, e o sobrenadante separado da massa micelial, e posteriormente submetido à exposição de nitrato de prata (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA) a 10 mM e então incubado novamente por quatro dias a 28° C. Posteriormente, as AgNPs formadas foram lavadas com centrifugações a 15000 rpm por 30 minutos e ressuspensas com água ultrapura, esse processo foi repetido três vezes.

#### **4.2. Produção de AgNP vegetal**

A AgNP vegetal foi produzida a partir do extrato bruto da planta *Trichilia catigua*, popularmente conhecida como catuaba. Sua metodologia de produção é patenteada e pertencente à GRAL Bioativos LTDA.

#### **4.3. Caracterização das nanopartículas de prata biogênicas**

A caracterização da AgNP vegetal foi realizada no Instituto de Pesquisas Tecnológicas, em São Paulo (IPT-SP). Enquanto a AgNP fúngica foi caracterizada na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no Instituto Federal do Paraná (IFPR) campus Londrina.

##### **4.3.1 Potencial Zeta**

As medidas de potencial ( $\zeta$ ) foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Southborough, UK. O potencial foi determinado pela direção e a velocidade do movimento das partículas, em exposição a um campo elétrico. As amostras foram diluídas para uma concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  utilizando água destilada. Em seguida, foram dispostas em células capilares equipadas com eletrodos de ouro.

##### **4.3.2. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)**

O tamanho das AgNPs foi determinado por DLS utilizando o equipamento ZetaSizer Nano-ZS. O movimento browniano faz com que a intensidade da luz disperse a partir de uma variação do tempo. Desta forma, partículas grandes apresentam uma movimentação lenta e menores uma movimentação mais rápida, apresentando variações na dispersão da luz.

### **4.3.3 Fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDXRF)**

A técnica de fluorescência de raios X por dispersão em energia foi escolhida para medir as concentrações das AgNPs. O espectrômetro utilizado foi o EDX-7000 da SHIMADZU. Para as medidas o tubo de raios X foi submetido a uma tensão de 50 kV e corrente de 20  $\mu$ A. Amostras padrões de 5 mL com diferentes concentrações de AgNO<sub>3</sub> (1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10,0 mM) foram utilizadas para fins de calibração. Todas as amostras foram depositadas em células descartáveis, com dupla abertura, sobre uma película de polipropileno com 5  $\mu$ m de espessura, ambos da SPEX SamplePrep, e medidas durante o período de 60 segundos.

## **4.4. Determinação da atividade antibacteriana em pH neutro, ácido e básico**

### **4.4.1. Microrganismos utilizados**

Para este trabalho foram utilizados microrganismos de diferentes origens, tanto cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) quanto isolados de patologias de origem animal, como infecção urinária de animais de estimação e mastite bovina.

Os microrganismos utilizados foram: *Enterococcus faecium* (ATCC 6569), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* MTS 26 multirresistente (isolado de mastite bovina), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* 428 (rugosa), *Escherichia coli* 004 multirresistente (isolado de infecção urinária animal), *Escherichia coli* 012 multirresistente (isolado de infecção urinária animal), *Escherichia coli* MTS 011 multirresistente (isolado de mastite bovina), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Klebsiella pneumoniae* 013 multirresistente (isolado de infecção urinária animal).

#### **4.4.2. Tamponamento e ajuste de pH dos meios de cultura**

Para a realização dos testes em condições de pH ácido, neutro e básico, foi utilizado meio de cultura Mueller Hinton (Difco, Detroit, USA), tamponado com Tris Base (Promega, Madison, USA). As quantidades de cada item foram usadas de acordo com especificações definidas pelo fabricante. Após a pesagem, as quantidades definidas de meio e tampão foram misturadas em um béquer. Com o auxílio de uma proveta, foi medido um volume de água destilada com aproximadamente 5 mL a menos do volume pré-definido e misturado no béquer juntamente com os outros componentes. Posteriormente, o pH do meio tamponado foi ajustado em pHmetro (Mettler Toledo, FE20) com soluções de HCl e NaOH. O pH final para meio ácido foi 6,0, para o meio neutro 7,0, e para o meio básico 9,0. Após o ajuste, as soluções foram colocadas novamente na proveta, e completadas com água destilada até o volume final definido anteriormente. Após isso, o pH dos meios foi medido novamente e então esterilizado em autoclave a 121° C por 15 minutos. Após a esterilização em autoclave e previamente a todos os testes, foram retiradas alíquotas de cada meio e mensuradas com fitas de papel indicadoras de pH (EMD Millipore).

#### **4.4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Os ensaios de microdiluição seriada em caldo foram realizados em triplicata, utilizando uma metodologia adaptada do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

#### **4.4.4. Preparo do inóculo**

Para todos os testes realizados, culturas bacterianas de cada espécie usada foram crescidas em placas de Petri contendo meio Mueller Hinton (Difco, Detroit, USA) por 24 horas. Foram selecionadas de 3 a 5 colônias, e com o auxílio de uma alça bacteriológica essas colônias foram homogeneizadas em solução salina à 0,9% de NaCl, até atingir a turvação igual a 0,5 da escala MacFarland, indicando aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia), o ajuste foi realizado visualmente. Posteriormente, foi adicionado 10  $\mu$ L dessa suspensão em 990  $\mu$ L de meio MH líquido, resultando em uma diluição 1:100 e uma suspensão bacteriana de  $7,5 \times 10^6$ , que cairá em  $7,5 \times 10^5$  por poço na placa de teste. Esse processo foi repetido três vezes, e a cada repetição foi usado um meio com pH

diferente para realizar a diluição, resultando em três inóculos diferentes em pH ácido (6,0), neutro (7,0) e básico (9,0).

#### **4.4.5. Diluições seriadas**

Para ambas AgNPs foi testado a concentração inicial de 500  $\mu\text{M}$ . A diluição das mesmas foi realizada na própria placa do teste. Para a diluição seriada, o conteúdo dos poços da primeira fileira foi homogeneizado e após isso foi transferido 50  $\mu\text{L}$  de cada poço para o poço abaixo, esse processo foi repetido até o final da placa. Ao chegar na última fileira, após a homogeneização os 50  $\mu\text{L}$  remanescentes foram descartados, resultando em um volume final de 50  $\mu\text{L}$  em todos os poços. Posteriormente, foi realizado a adição de 50  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano em todos os poços da placa (com exceção do controle negativo). Nos poços do controle positivo, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de meio e 50  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano. No controle negativo, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de meio.

Após o preparo do teste, as placas foram incubadas em estufa a 37° C por 24 horas. Posterior a isso, foi feita a leitura visual, definindo a CIM<sub>50</sub> como a menor concentração que inibiu o crescimento do microrganismo.

#### **4.4.6. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Após a leitura visual das placas do teste de CIM foi feito, em triplicata, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  da concentração inibitória mínima de cada poço e pipetado em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (Himedia, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas em estufa a 37° C por 24 h. Após esse período, foi feita a leitura das placas e a concentração bactericida mínima foi definida como a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano (99,9% de redução da população bacteriana).

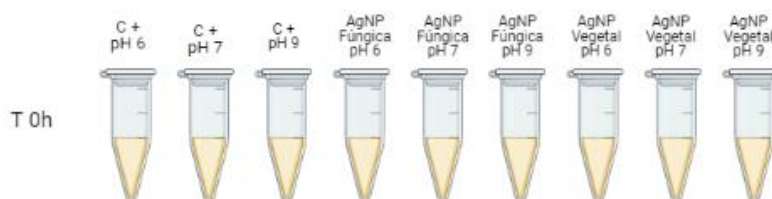
#### **4.5. Curva de crescimento e morte (Time-Kill curve)**

Diferente do teste anterior, que foi realizado em microplacas de 96 poços, este foi realizado em microtubos do tipo eppendorf de 1,5 mL. Para os ensaios de curva de crescimento, em algumas amostras a concentração utilizada foi uma faixa acima do respectivo valor de CIM de cada microrganismo, com exceção das cepas com a CIM

mais alta, como 500  $\mu\text{M}$ , por exemplo, nesses casos foi usado a concentração exata de CIM. Previamente ao início do teste, foram preparados seis microtubos contendo as soluções estoque de AgNPs. Sendo três microtubos em condições de pH 6,7, e 9 para a AgNP fúngica, e três microtubos nas mesmas condições para a AgNP vegetal. Os estoques foram feitos com o dobro das concentrações desejadas no ensaio.

#### 4.5.1. Preparo do teste

Para cada microrganismo testado foram usados seis conjuntos de microtubos (Figura 10), cada um correspondente aos pontos de 0, 2, 4, 7, 10, e 24 h. Cada conjunto foi composto por três microtubos para controle positivo, três microtubos contendo tratamento com AgNP fúngica, e três microtubos contendo tratamento com AgNP vegetal.



**Figura 10.** Representação do conjunto de microtubos do ponto inicial da curva de crescimento.

**Fonte:** autoria própria (2021).

Após o preparo das soluções estoque de AgNPs e identificação dos microtubos, foi pipetado 100  $\mu\text{L}$  de meio nos controles positivos e 100  $\mu\text{L}$  das soluções estoque das AgNPs fúngica e vegetal nos microtubos correspondentes aos tratamentos. Por fim, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano em todos os microtubos. Com exceção do conjunto correspondente ao ponto de 0 h, que foi pipetado e diluído logo em seguida, os pontos seguintes foram incubados em estufa a 37° C.

#### 4.5.2. Diluições e plaqueamento

Posteriormente, foi acompanhado o tempo de incubação e a cada período determinado um conjunto de microtubos foi retirado da estufa e diluído de forma seriada. Para isto, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do conteúdo do microtubo de teste em 900 $\mu\text{L}$  de solução salina 0,9%, foram feitas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ , dependendo do ponto da curva. Para cada teste, foram escolhidas três das diluições feitas e plaqueadas em triplicata. O plaqueamento foi realizado pipetando-se 10  $\mu\text{L}$  das soluções em placas

de Petri contendo ágar Mueller Hinton (MH). Após isso as placas foram incubadas em estufa a 37° C.

#### **4.5.3. Contagem de colônias**

Após 18 a 24h de incubação das placas, o número de UFC de todos os controles e tratamentos foram contados. O critério para escolha da diluição a ser contabilizada foi definido como a diluição que apresentasse entre 10 a 100 UFC. Após a contagem, foi feito a média dos valores obtidos de cada triplicata, que então foi aplicada na seguinte fórmula:  $\text{UFC/ml} = \text{Média da contagem de UFCs da triplicata} \times \text{Fator de diluição} \times \text{Fator alíquota}$ . Após aplicar a fórmula, os valores obtidos foram usados para construir o gráfico demonstrando a curva.

#### **4.6. Formação e inibição de biofilme**

A avaliação da capacidade de inibição na formação de biofilmes bacterianos, foi adaptada de acordo com o protocolo de STEPANOVIĆ et al., (2007). Para todas as amostras a concentração utilizada foi de uma faixa abaixo do valor de CIM respectivo de cada microrganismo.

Para este teste, todos os meios MH com pH ajustado foram suplementados com 1% de glicose (Synth, Diadema, SP). O preparo do inóculo foi realizado de acordo com os testes anteriores e ajustado uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml. O ensaio de formação de biofilme foi realizado em microplacas de 96 poços. Inicialmente foi adicionado o controle positivo de todas as amostras, em triplicata, sendo 100 µL de meio e 100 µL de inóculo bacteriano. Para as triplicatas com tratamento de AgNPs, foram feitas soluções estoque com as respectivas concentrações de CIM de cada cepa usada em condições de pH ácido, neutro e básico. Após isso foi adicionado 100 µL da solução estoque de AgNP e 100 µL de inóculo. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, o conteúdo das placas foi vertido em um descarte e os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) 0,01M com pH 7,4, por três vezes, as placas foram deixadas para secar ao ar livre. Para a fixação, os poços foram preenchidos com 150 µL de metanol durante 20 minutos. Passado esse tempo,

o metanol foi descartado e a placa foi deixada para secar em temperatura ambiente. Para a coloração foi adicionado 150 µL de cristal violeta 2% durante 15 minutos, após isso a placa foi lavada em água corrente até retirar todo o corante. Posteriormente foi pipetado 150 µL de etanol 95% (Synth, Diadema, SP). O conteúdo dos poços foi transferido para uma nova placa e foi realizada leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan Go) a um comprimento de onda de 570 nm. As cepas foram classificadas como: não formadora de biofilme, fracamente formadora de biofilme, moderadamente formadora de biofilme e fortemente formadora de biofilme. O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrão acima da média de D.O dos controles. A classificação das cepas foi definida conforme mostrado a seguir: a)  $DO \leq DOc$  = não formadora; (b)  $DOc < DO \leq (2x DOc)$  = fraca formadora; (c)  $(2x DOc) < DO \leq (4x DOc)$  = moderada formadora; (d)  $(4x DOc) < DO$  = forte formadora.

#### 4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras escolhidas para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram definidas de acordo com os valores de CIM e as curvas de crescimento, usando como critério as diferenças de comportamento entre as condições de pH testadas e valores de CIM intermediários nas duas AgNPs. O tempo de incubação das amostras também foi determinado a partir dos resultados da curva. Para a microscopia foi escolhido uma bactéria de cada grupo, sendo, *E. coli* 012, e *S. aureus* MTS 26.

A amostra de *E. coli* 012 foi preparada no pH 9, com tempo de incubação de 2 horas e concentração de 125 µM e 31,25 µM para a AgNP fúngica e vegetal, respectivamente. Por conta da susceptibilidade da espécie a nanopartículas de prata e do curto período de incubação, as amostras foram realizadas com os valores uma faixa abaixo do valor encontrado no teste de CIM.

A amostra de *S. aureus* MTS 26 foi realizada no pH 7, com tempo de incubação de 7 horas e metade da concentração encontrado no teste de CIM, sendo 250 µM e 62,5 µM para a AgNP fúngica e vegetal, respectivamente.

Ambas amostras foram preparadas da seguinte forma: em um microtubo, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano no pH determinado (feito conforme citado anteriormente), e 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque de AgNP, contendo o triplo da concentração desejada na amostra. Os controles positivos foram realizados nas três condições de pH, pipetando-se 100  $\mu\text{L}$  de meio e 100  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano. Após isso, os microtubos foram incubados em estufa a 37° C de acordo com o tempo determinado para cada amostra.

Passado o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos e o pellet celular de cada amostra foi ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de PBS, uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  de cada suspensão foi retirada e transferida para lâminas de vidro revestidas por poli-L-isina. Após isso, o material foi fixado com uma solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M contendo 2% de glutaraldeído durante 20h, posteriormente foram feitas três lavagens com cacodilato de sódio 0,1 M. A amostra foi pós-fixada em 1% de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) por 2 h e novamente lavadas três vezes com cacodilato de sódio 0,1 M. Posterior a fixação, foi realizado o processo de desidratação, submetendo as lâminas fixadas a sucessivos gradientes de etanol (70, 80, 90 e 100%). Em seguida, foi realizado a secagem em secador de ponto crítico utilizando  $\text{CO}_2$  (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), e então feito o revestimento com ouro no processo de metalização (BALTEC SDC 050 Sputter Coater), após isso as amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi usada para investigar a atividade antibacteriana das AgNPs e as alterações morfológicas ocasionadas nas células, as imagens foram tiradas com aumentos de 30000x e 16000x. Para a escolha das imagens usadas foram observados cerca de 30 campos em aumentos diferentes.

#### **4.8. Análise estatística**

Os resultados coletados na curva de crescimento foram analisados através da análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Duncan para comparação entre os grupos. As análises foram feitas utilizando o programa R Statistical Software, versão 3.1.0. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização AgNPs

A biorredução dos íons de prata à nanopartículas pôde ser visualizada inicialmente através da mudança de cor das soluções de acordo com tempo de incubação. As técnicas de potencial zeta e DLS foram utilizadas para investigar a carga e estabilidade das soluções coloidais e tamanho das nanopartículas, respectivamente.

O potencial zeta reflete a carga na superfície das nanopartículas e pode variar entre negativo e positivo, bem como em magnitude, de acordo com o agente de revestimento ou dos reagentes utilizados na síntese (EL BADAWY et al., 2011). Através da soma das forças repulsivas e atrativas entre as nanopartículas dispersas é possível obter dados sobre a estabilidade da solução, no caso de soluções instáveis pode ocorrer fenômenos de agregação das NPs. Os valores de potencial zeta geralmente relacionados com alta estabilidade de partículas em uma suspensão coloidal, ocorrem quando esse valor encontra-se abaixo ou igual a -30 mV, ou superior, ou igual a +30 mV (ALMEIDA; DE OLIVEIRA; HOTZA, 2017; MIRHOSSEINI et al., 2008). Conforme apresentado na tabela 1, o potencial zeta das amostras encontra-se dentro dos valores citados, confirmando a estabilidade das soluções coloidais.

As nanopartículas de ambas soluções coloidais apresentam-se dentro do tamanho médio aceito para que sejam considerados nanomateriais (entre 1 e 100 nm), conforme descrito por BERA e BELHAJ (2016).

Apesar de ambas AgNPs apresentarem tamanhos mais elevados quando comparadas a outras nanopartículas descritas, este fator pode ser visto como uma vantagem por possuírem uma toxicidade menor para células eucarióticas. Uma vez que quanto menores as partículas (4 a 20 nm) mais tóxicas elas podem se tornar (FILON et al., (2015); RAI, (2020).

AgNP origem	Potencial $\zeta$ (mV)	DLS (nm)	Concentração (mM)	Formato
Fungo <i>Lichtheimia ornata</i>	- 17,90	93,80	7,7	Esférico
Planta <i>Trichilia catigua</i>	- 23,27	82,73	10,0	Esférico

**Tabela 1.** Potencial zeta ( $\zeta$ ), espalhamento dinâmico de luz (DLS), concentração e formato das nanopartículas sintetizadas.

## 5.2. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

Microrganismo	Valores de CIM AgNP Fúngica ( $\mu\text{M}$ )		
	pH 6	pH 7	pH 9
<i>E. faecium</i> (ATCC 6569)	250	500	250
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	250	250	62,5
<i>S. aureus</i> MTS 26	500	500	250
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	62,5	62,5	62,5
<i>E. coli</i> 428	250	250	125
<i>E. coli</i> 004	250	250	250
<i>E. coli</i> 012	500	500	250
<i>E. coli</i> MTS 011	250	250	31,25
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	500	250	250
<i>K. pneumoniae</i> 013	250	250	125

**Tabela 2.** Valores da concentração inibitória mínima da AgNP fúngica em pH ácido, neutro e básico.

Microrganismo	Valores de CIM AgNP Vegetal ( $\mu\text{M}$ )		
	pH 6	pH 7	pH 9
<i>E. faecium</i> (ATCC 6569)	31,25	31,25	31,25
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	62,5	31,25	31,25
<i>S. aureus</i> MTS 26	62,5	62,5	62,5
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	7,8	7,8	7,8
<i>E. coli</i> 428	31,25	31,25	15,6
<i>E. coli</i> 004	15,6	62,5	31,25
<i>E. coli</i> 012	62,5	62,5	62,5
<i>E. coli</i> MTS 011	31,25	31,25	15,6
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	62,5	31,25	31,25
<i>K. pneumoniae</i> 013	62,5	62,5	31,25

**Tabela 3.** Valores da concentração inibitória mínima da AgNP vegetal em pH ácido, neutro e básico.

Microrganismo	Valores de CBM AgNP Fúngica ( $\mu\text{M}$ )		
	pH 6	pH 7	pH 9
<i>E. faecium</i> (ATCC 6569)	>500	500	>500
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	250	250	62,5
<i>S. aureus</i> MTS 26	500	500	500
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	62,5	62,5	62,5
<i>E. coli</i> 428	500	500	500
<i>E. coli</i> 004	250	250	250
<i>E. coli</i> 012	500	500	250
<i>E. coli</i> MTS 011	250	250	250
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	500	500	250
<i>K. pneumoniae</i> 013	500	500	125

**Tabela 4.** Valores da concentração bactericida mínima da AgNP fúngica em pH ácido, neutro e básico.

Microrganismo	Valores de CBM AgNP Vegetal ( $\mu\text{M}$ )		
	pH 6	pH 7	pH 9
<i>E. faecium</i> (ATCC 6569)	>500	>500	>500
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	62,5	125	125
<i>S. aureus</i> MTS 26	125	125	>125
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	7,8	7,8	7,8
<i>E. coli</i> 428	62,5	31,25	31,25
<i>E. coli</i> 004	125	62,5	62,5
<i>E. coli</i> 012	125	125	125
<i>E. coli</i> MTS 011	31,25	62,5	31,25
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	250	250	125
<i>K. pneumoniae</i> 013	62,5	62,5	31,25

**Tabela 5.** Valores da concentração bactericida mínima da AgNP vegetal em pH ácido, neutro e básico.

As tabelas 2 e 3 apresentam as concentrações inibitórias mínimas das AgNPs fúngica e vegetal, respectivamente. No geral, os valores de CIM mais baixos foram encontrados na amostra de *E. coli* (ATCC 25922), tanto para a AgNP fúngica quanto para a vegetal. Entre as Gram-positivas o CIM variou entre 500  $\mu\text{M}$  e 250  $\mu\text{M}$ , com exceção do menor valor atingido (62,5  $\mu\text{M}$ ) em pH básico com a AgNP fúngica. Para a AgNP vegetal os valores de CIM das Gram-positivas ficaram entre 31,25  $\mu\text{M}$  e 62,5  $\mu\text{M}$ . Os resultados de Scandorieiro et al. (2016) e Nakazato et al. (2019), em estudos utilizando AgNPs fúngicas provenientes de espécies de *Fusarium oxysporum*, corroboram com os resultados de CIM da AgNP fúngica em *E. coli* (ATCC 25922) utilizados neste estudo. Os resultados de Scandorieiro et al. (2016) também corroboram com os resultados encontrados com a AgNP fúngica em *S. aureus* (ATCC 25923) nas condições de pH 6 e 7.

Devido à diferença estrutural na composição das paredes celulares de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, em alguns casos as AgNPs tem efeito consideravelmente menor no crescimento de bactérias Gram-positivas, como encontrado no trabalho de FIGUEIREDO et al., (2019). As Gram-negativas possuem lipopolissacarídeos (LPS) na parte externa, e abaixo uma camada fina de peptideoglicano. As cargas negativas do LPS são atraídas pela carga positiva fraca das AgNPs. Por outro lado, a parede celular das bactérias Gram-positivas é composta principalmente por uma camada espessa de peptideoglicano, que consiste de pontes cruzadas entre cadeias polissacarídicas lineares e peptídeos, formando uma estrutura rígida tridimensional. (FRANCI et al., 2015). Além disso, a afinidade entre os íons de prata e o peptideoglicano é muito alta, e esses íons podem ficar presos na parede celular e não alcançar o interior da membrana (NAKAMURA et al., 2019; VELUSAMY et al., 2016). Desta forma, naturalmente ocorre uma interação maior das AgNPs com bactérias Gram-negativas, o que pode explicar o motivo de algumas das cepas deste estudo terem apresentado um valor de CIM tão baixo em relação às outras.

Como descrito por FIGUEIREDO et al., (2019) outros aspectos que influenciam a atividade antibacteriana das AgNPs são o tamanho, a morfologia e fatores como o coating. Conforme descrito anteriormente, as AgNPs fúngica e vegetal utilizadas neste trabalho possuem forma esférica e tamanhos de 93,8 nm e 82,73 nm, com potencial zeta de -17,9 mV e -23,27 mV, respectivamente. A partir dos resultados encontrados nos ensaios de CIM é possível observar que a AgNP vegetal apresentou um potencial

antimicrobiano maior em relação à fúngica, um dos fatores que podem ser atribuídos a isso vem de seu tamanho menor que pode permitir mais facilidade para penetrar na célula.

FRANCI et al., (2015) cita que para uma eficácia maior NPs de tamanho reduzido e potencial zeta positivo são ideais, por conta da ação das forças eletrostáticas. Existem relatos na literatura que mostram que a atração eletrostática entre células bacterianas carregadas negativamente e NPs carregadas positivamente é crucial para a atividade das NPs como materiais bactericidas (HAMOUDA; BAKER, 2000; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004; STOIMENOV et al., 2002). No entanto, as AgNPs usadas neste estudo encontravam-se carregadas negativamente, e mesmo assim apresentaram atividade antibacteriana frente a diferentes microrganismos, assim como encontrado nos trabalhos de FIGUEIREDO et al., (2019) e NAKAZATO et al., (2019). Mesmo com as cargas negativas entre microrganismo e AgNP FRANCI et al., (2015) e CHOI e HU (2008), relatam que com a dissolução das NPs em meio líquido, ocorre a liberação de uma certa quantidade de prata catiônica, nesse caso, atribuindo as propriedades antibacterianas às características físicas das NPs e à liberação dos íons de prata.

Os resultados obtidos demonstraram amplo espectro de ação das AgNPs usadas em diferentes microrganismos. Em ambas NPs ocorreu influência da condição de pH na atividade antimicrobiana, nesse caso, algumas amostras apresentaram um valor de CIM menor na condição de pH básico, em relação às outras condições testadas.

Foi observado um número maior de amostras com essa característica com o uso da AgNP fúngica, que apresentou atividade inibitória em concentrações menores no pH básico dentre seis das dez cepas testadas (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MTS 26, *E. coli* 428, *E. coli* 012, *E. coli* MTS 011 e *K. pneumoniae* 013), enquanto a AgNP vegetal apresentou essa característica apenas em três cepas Gram-negativas (*E. coli* 428, *E. coli* MTS 11, e *K. pneumoniae* 13). Dentre os resultados da AgNP vegetal, também foi possível observar alguns casos onde a atividade antimicrobiana foi diminuída pelo pH, como ocorrido em *S. aureus* (ATCC 25923) e *K. pneumoniae* (ATCC 700603) que apresentaram um CIM maior em pH ácido, enquanto no pH neutro e básico os valores foram iguais e uma faixa abaixo do encontrado em pH ácido. Essas duas amostras são isolados clínicos, e uma delas (*K. pneumoniae* ATCC 700603)

isolado de um paciente com infecção urinária, o que pode ter contribuído para esse resultado, levando em conta que o microrganismo se encontrava em pH ácido, estando bem adaptado a prosperar nessa condição. Fora as amostras citadas anteriormente, outras quatro testadas com a AgNP vegetal apresentaram valor de CIM igual em todas as condições de pH.

HAJIPOUR et al., (2012) cita que o pH do meio pode influenciar na estrutura das NPs e conseqüentemente influenciar na atividade antimicrobiana, e hipotetiza que à medida que o pH diminui para a faixa ácida, a liberação de íons de NPs, bem como aminoácidos e peptídeos de bactérias aumenta a dissolução de NPs e conseqüentemente aumenta o potencial antimicrobiano, enquanto o pH básico pode agir diminuindo ou aumentando o potencial antimicrobiano. O pH de uma solução representa a concentração de íons de hidrogênio e, portanto, ao alterar o pH, a carga superficial das NPs poderá ser alterada.

FERNANDO e ZHOU (2019), demonstraram mudanças ocasionadas por tempo (1 h, 24 h, 7 dias e 24 dias) em AgNPs recém sintetizadas e sem revestimento expostas a diferentes condições de pH em ambiente aquoso, permitindo o monitoramento e compreensão do comportamento das partículas. No geral, foi observado que o pH exerceu forte influência nas propriedades das AgNPs, uma vez que comandou a carga superficial, agregação e dissolução oxidativa das mesmas. Além disso, foi verificado que as AgNPs foram afetadas predominantemente pelo pH sob os fenômenos de agregação e dissolução. Em pH ácido e neutro, as partículas foram desestabilizadas resultando em maior taxa de agregação. Em condições alcalinas, as partículas foram re-estabilizadas devido à presença de íons hidroxila, resultando em suspensões mais estáveis.

Ao conduzir estudos de atividade antibacteriana NPs são geralmente expostas a vários ambientes líquidos sob condições *in vitro* e condições *in vivo*, como meio de cultura, fluidos corporais, e sangue. Portanto, a estabilidade das NPs em meio aquoso tornou-se um grande problema, uma vez que afeta significativamente o tamanho, relação superfície-volume, morfologia, cinética de liberação de íons de prata, e a atividade antibacteriana (TANG; ZHENG, 2018; YANG et al., 2012). Os problemas gerais de estabilidade relacionados a AgNPs em tais condições biológicas relevantes incluem a estabilidade de dispersão contra agregação e estabilidade química inibindo

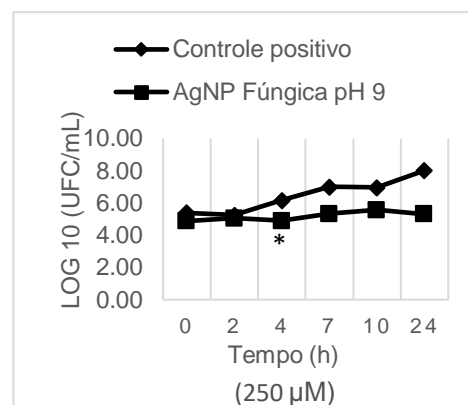
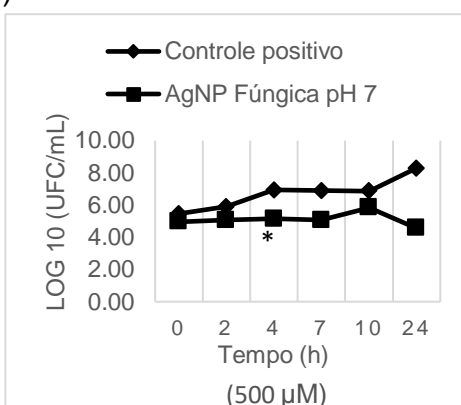
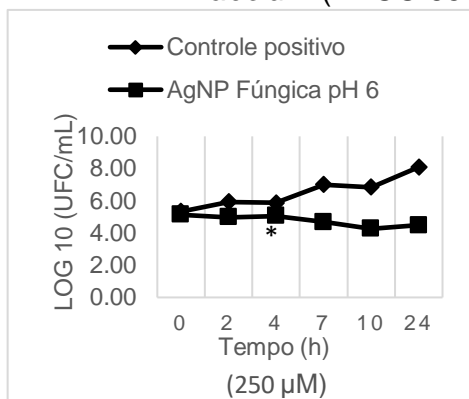
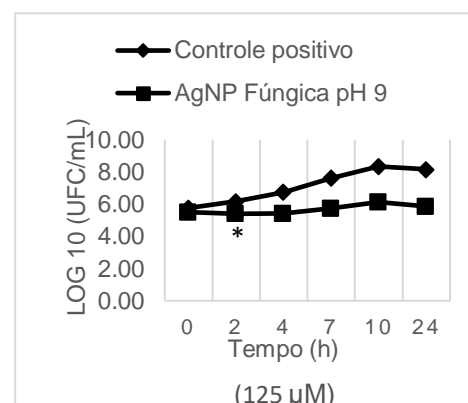
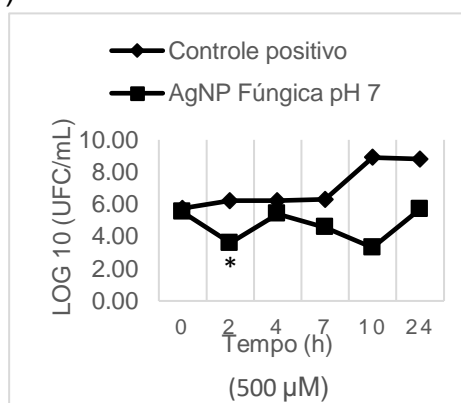
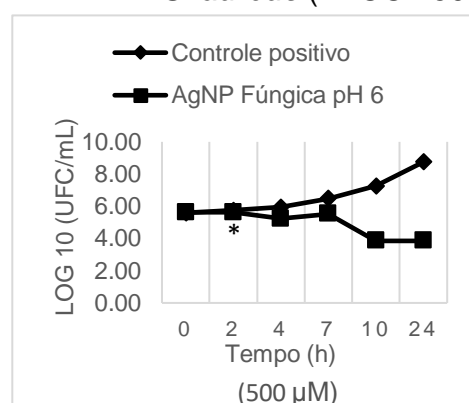
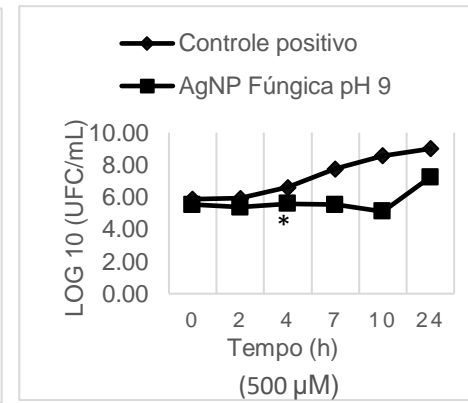
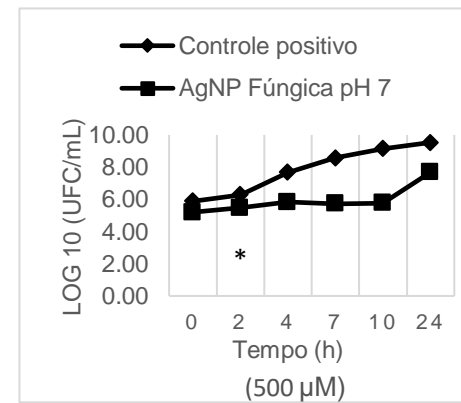
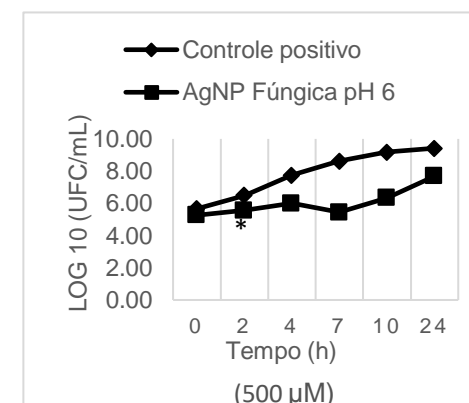
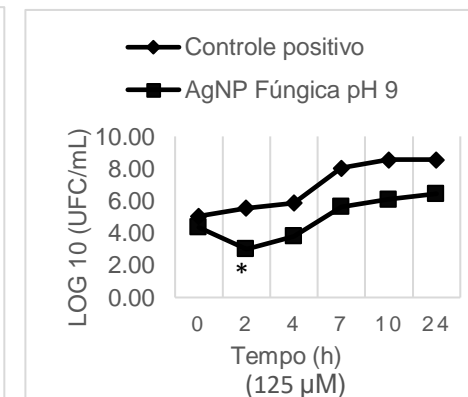
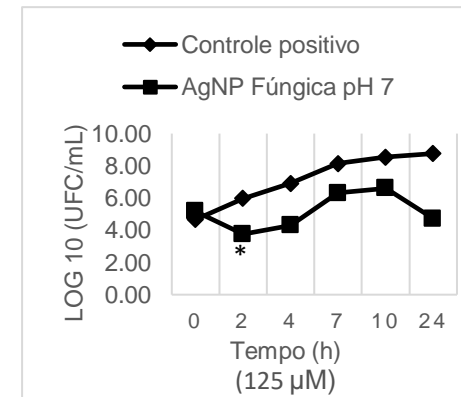
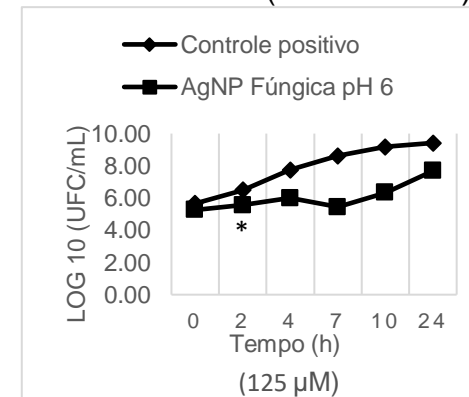
a liberação de íons de prata processos de dissolução oxidativa de AgNPs na presença de oxigênio dissolvido (TANG; ZHENG, 2018).

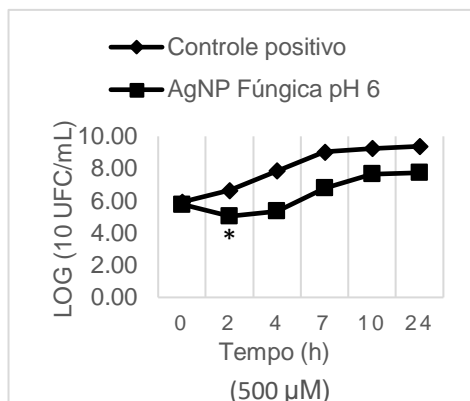
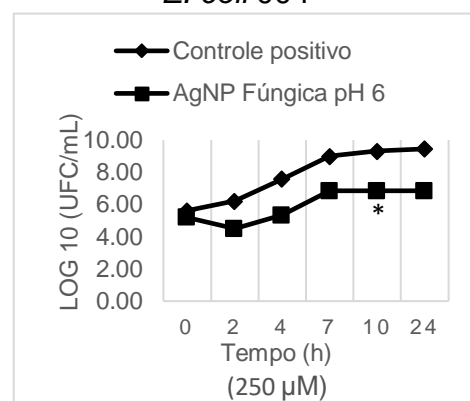
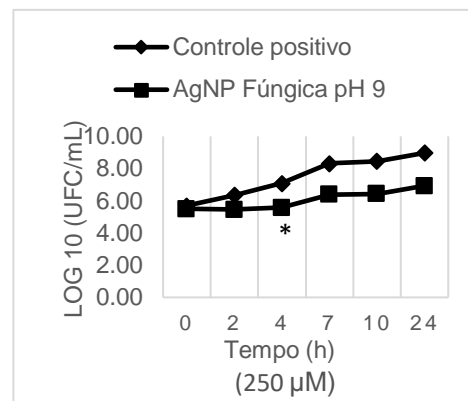
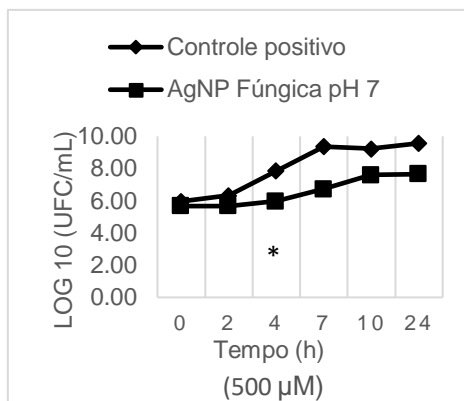
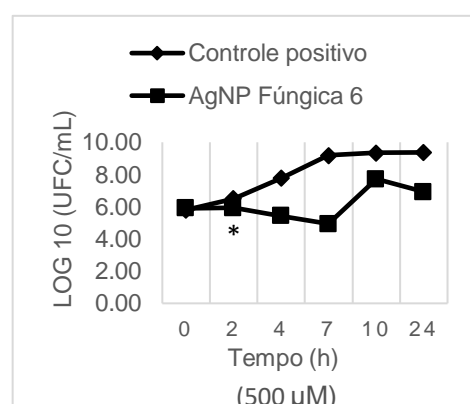
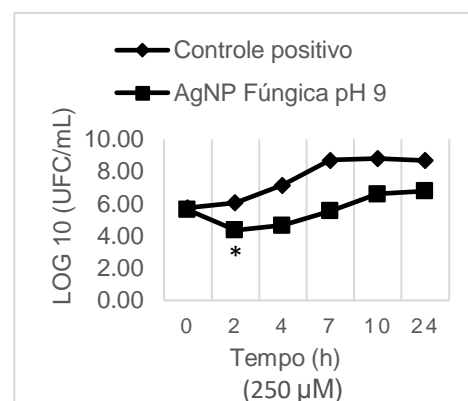
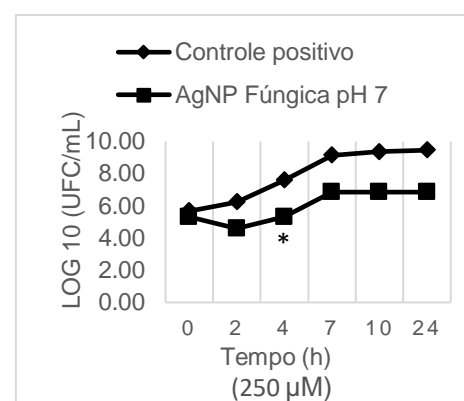
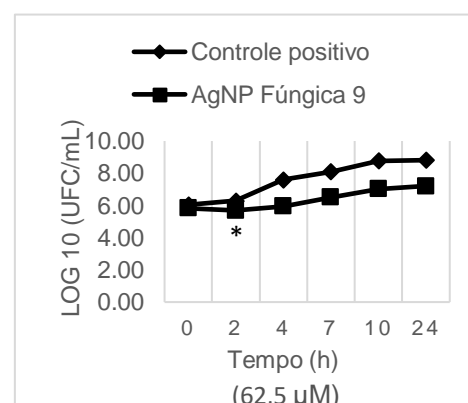
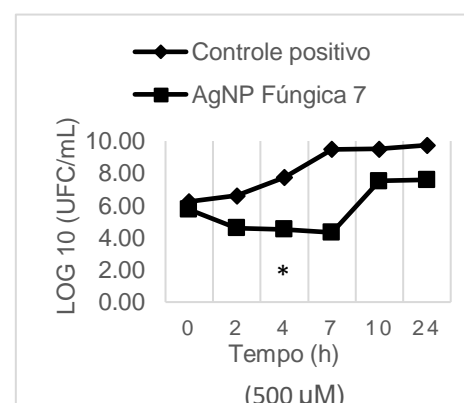
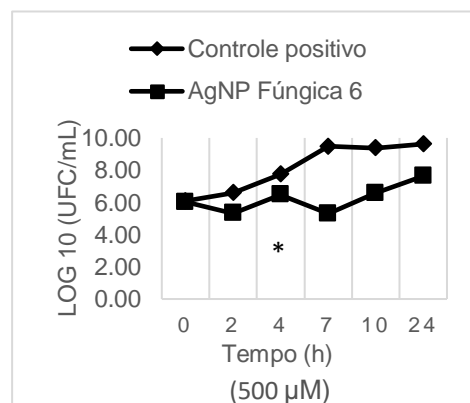
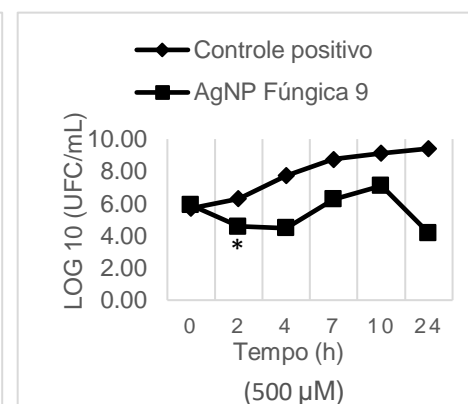
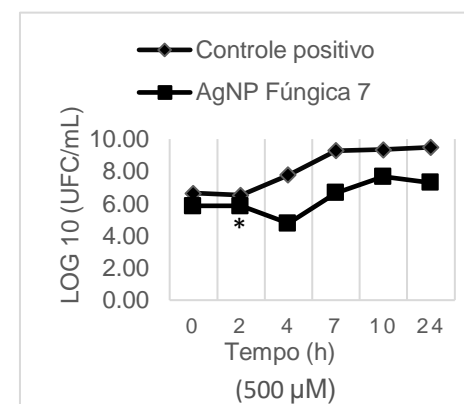
Conforme mencionado anteriormente, a carga positiva dos íons Ag<sup>+</sup> é crítica para sua atividade bactericida através de atrações eletrostáticas entre a parede celular da bactéria carregada negativamente e íons Ag<sup>+</sup> positivamente carregados (LIAO; LI; TJONG, 2019; SLAVIN et al., 2017). Os agentes presentes no coating e estabilizadores usados na síntese para prevenir a agregação de nanopartículas coloidais inevitavelmente exercem uma influência sobre suas cargas superficiais (ABBASZADEGAN et al., 2015; EL BADAWY et al., 2011; LEE et al., 2011; LIAO; LI; TJONG, 2019).

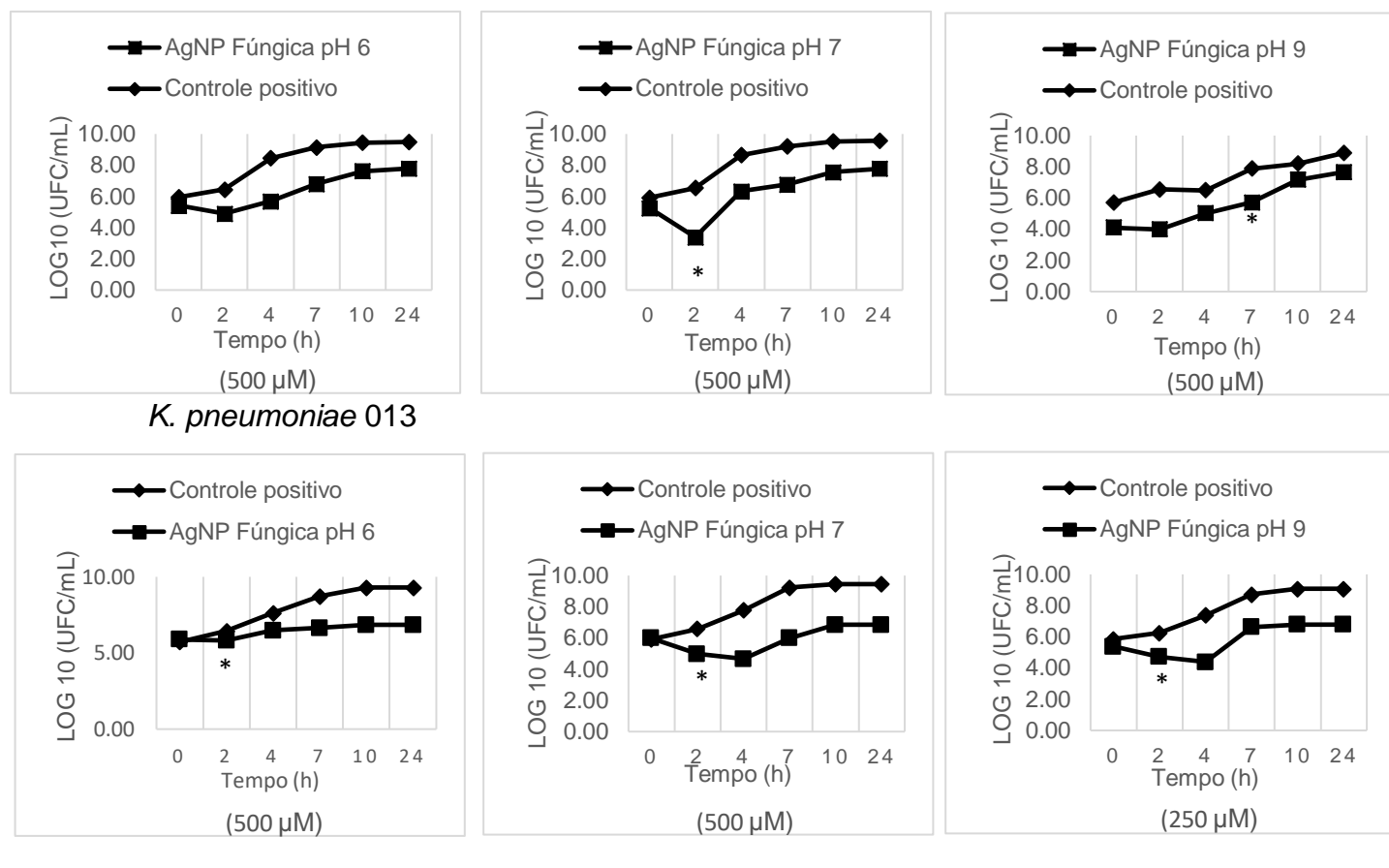
Por serem de naturezas diversas as AgNPs usadas neste estudo apresentam propriedades diferentes, que variam conforme a rota de síntese utilizada. Dessa forma, os biopolímeros presentes no coating de cada uma podem ter influenciado na sua interação com o pH do meio.

A superfície de partículas pode ser definida como uma região de transição entre o interior do material e uma fase provida apenas de organização de curto alcance. Nesta superfície podem existir camadas não estequiométricas com desequilíbrio de cargas. Quando em contato com um solvente, estas cargas interagem com as moléculas do solvente ou íons solúveis e podem dar origem a cargas elétricas adsorvidas. Os principais íons capazes de interagir com a superfície dos óxidos e determinar a carga superficial são H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup> (íons determinantes de potencial), ou seja, uma variação no pH de uma suspensão é de relevante importância para a modificação das cargas superficiais (CASTRO; GOUVÊA, 2000; ZUYI; WENMING, 1998). Nesse aspecto, uma das suposições que pode ser feita é de que a condição de pH básico na AgNP fúngica possa ter agido alterando as cargas superficiais da mesma, de forma que aumentasse a atração eletrostática entre o microrganismo e a NP, consequentemente aumentando a atividade.

### **5.3. Curva de crescimento e morte**

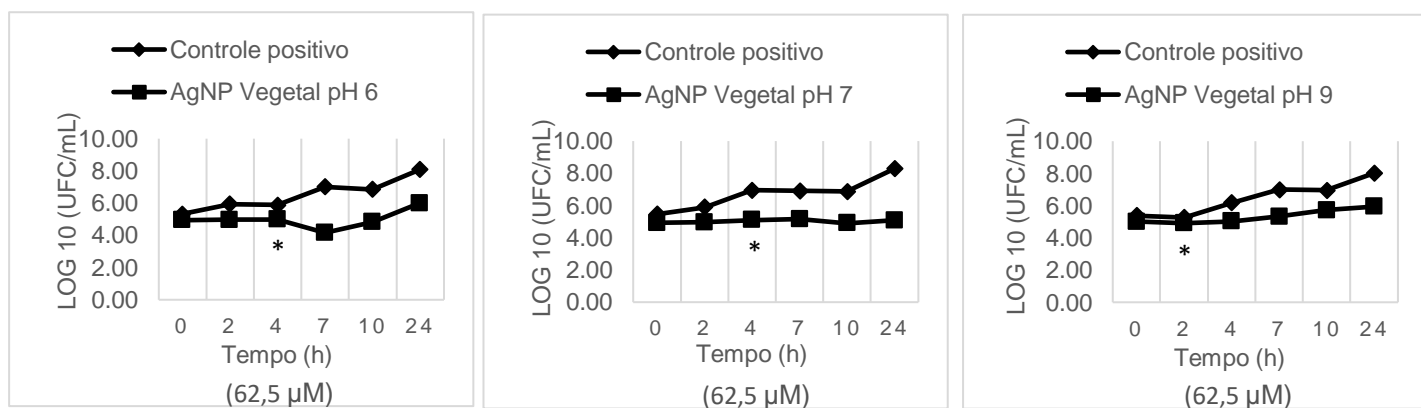
*E. faecium* (ATCC 6569)*S. aureus* (ATCC 25923)*S. aureus* MTS 26*E. coli* (ATCC 25922)*E. coli* 428

*E. coli* 004*E. coli* 012*E. coli* MTS 011*K. pneumoniae* (ATCC 700603)

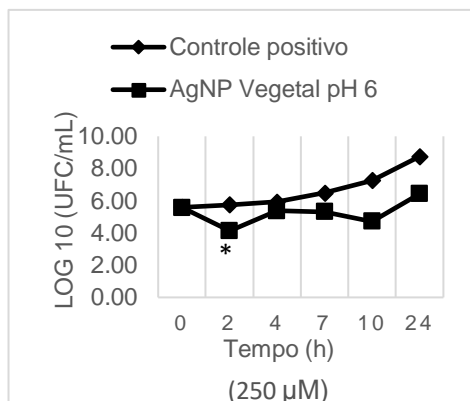
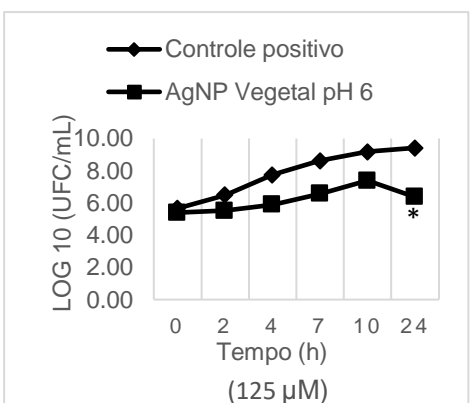
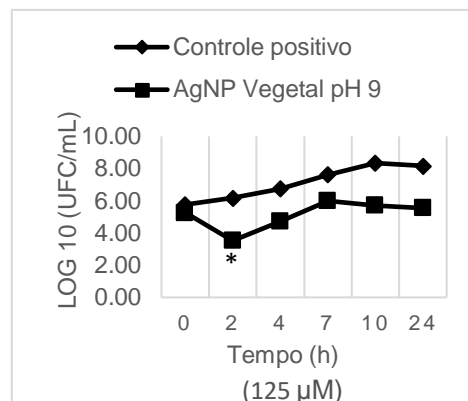
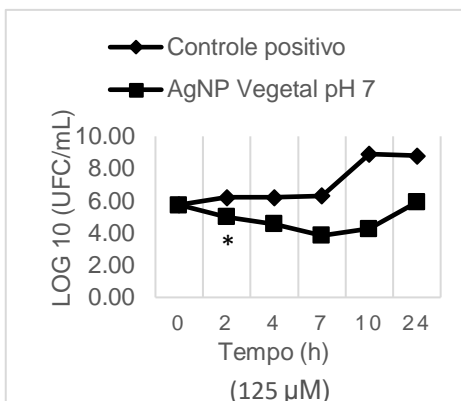
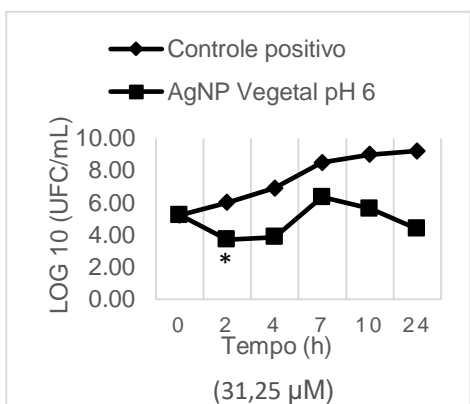
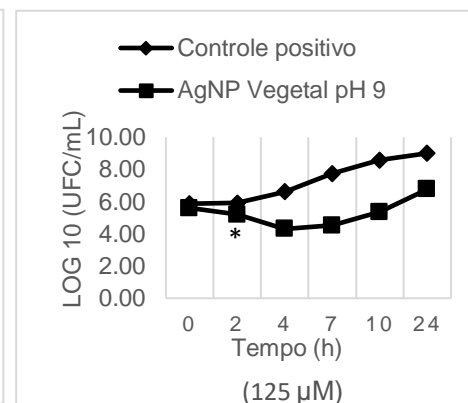
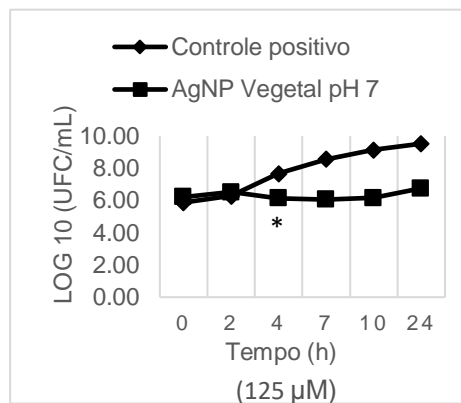
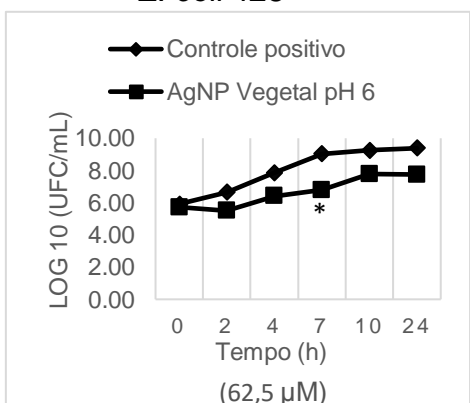
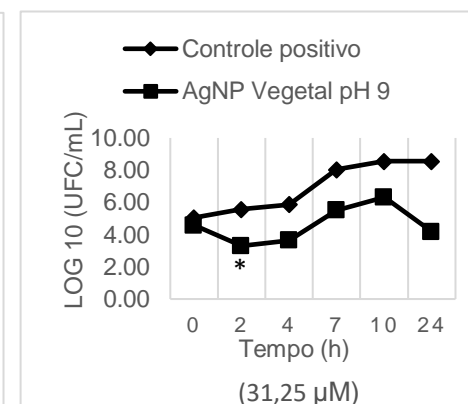
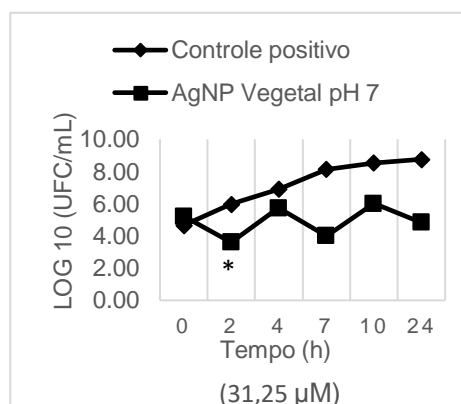
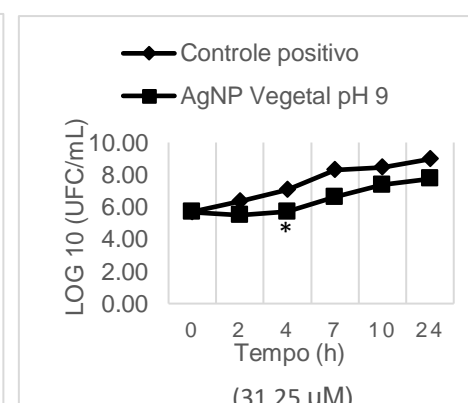
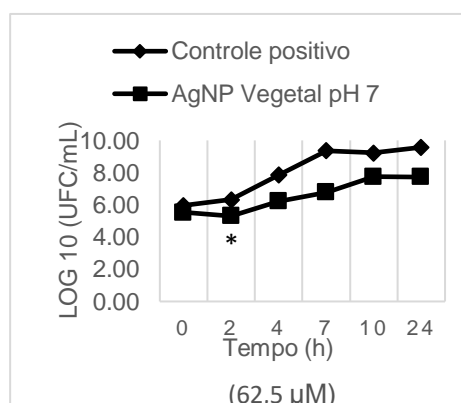


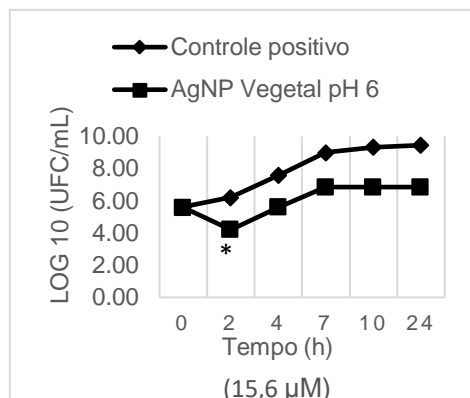
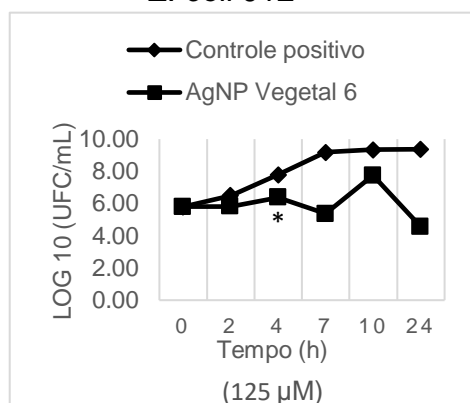
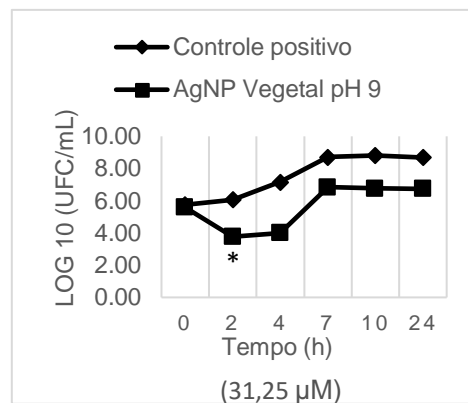
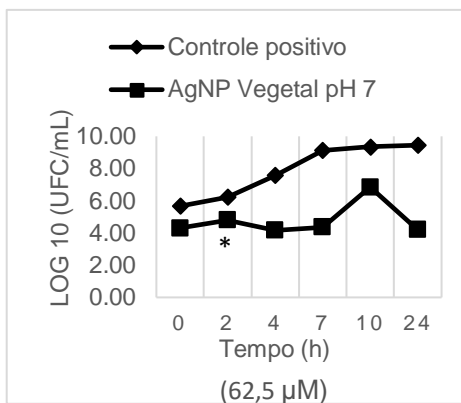
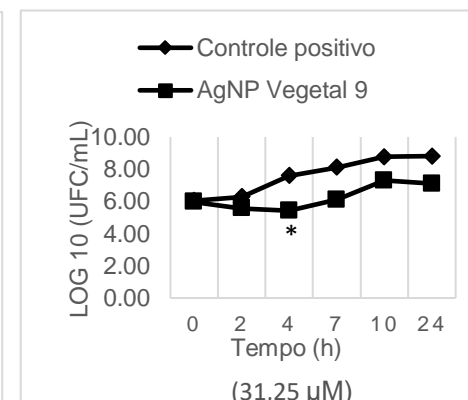
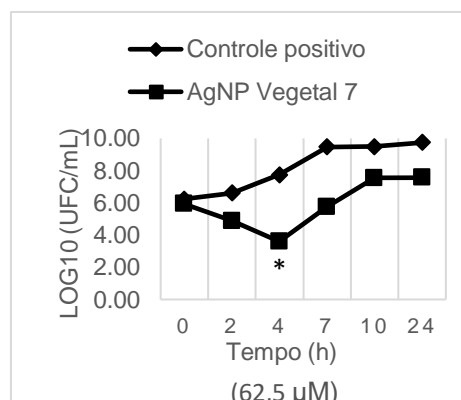
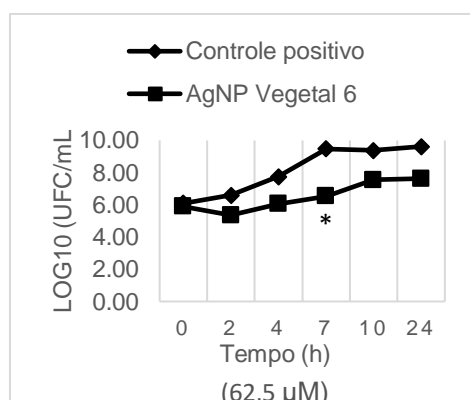
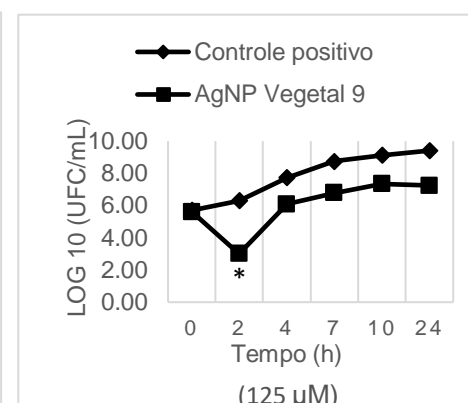
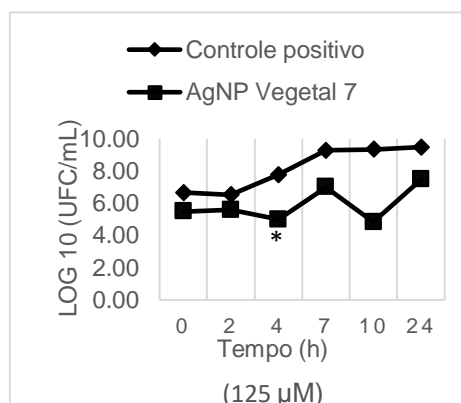
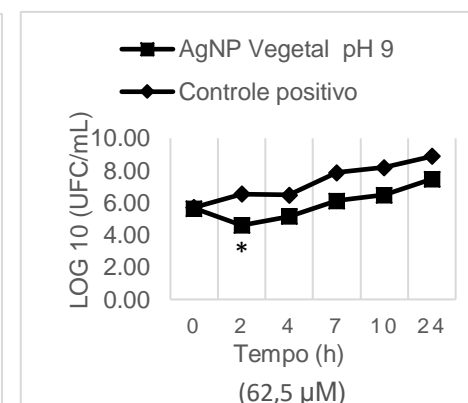
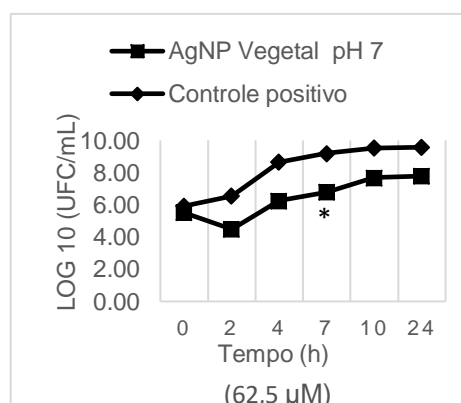
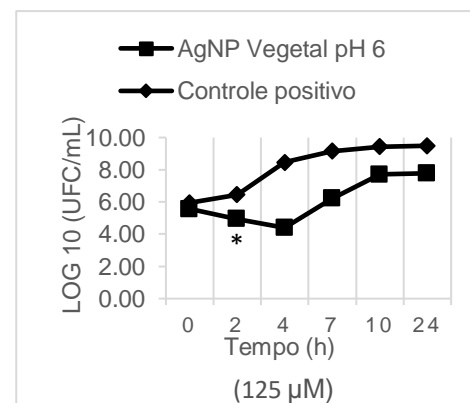
**Figura 11.** Painel comparativo das curvas de crescimento e morte realizadas nas condições de pH ácido, neutro e básico, tratadas com AgNP fúngica nos microrganismos: *E. faecium* (ATCC 6569), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus* MTS 26, *E. coli* (ATCC25922), *E. coli* 428, *E. coli* 004, *E. coli* 012, *E. coli* MTS 011, *K. pneumoniae* (ATCC 700603), *K. pneumoniae* 013. O asterisco representa significância estatística. Os valores de µM entre parênteses indicam a concentração usada em cada tratamento.

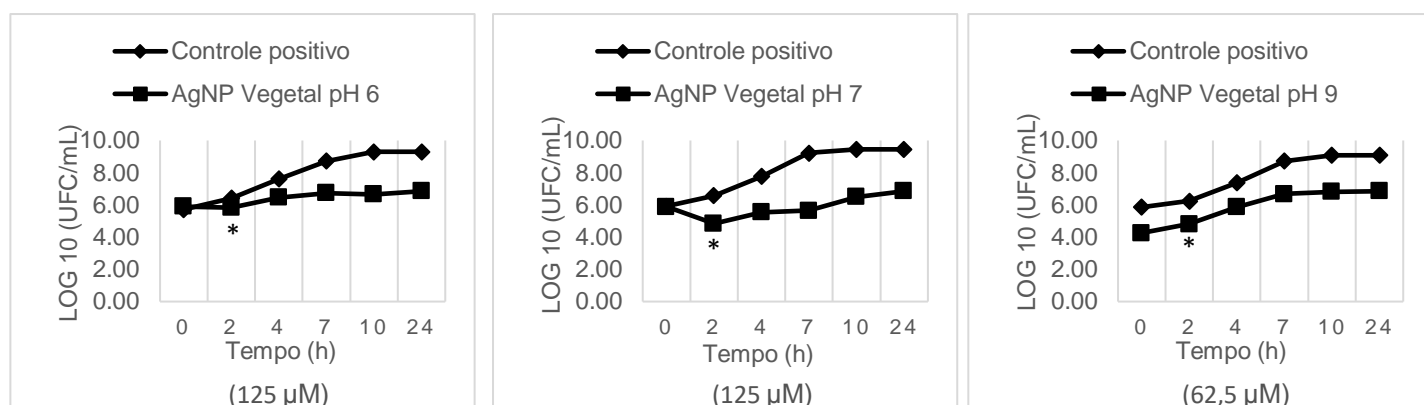
### *E. faecium* (ATCC 6569)



### *S. aureus* (ATCC 25923)

*S. aureus* MTS 26*E. coli* (ATCC 25923)*E. coli* 428*E. coli* 004

*E. coli* 012*E. coli* MTS 011*K. pneumoniae* (ATCC 700603)

*K. pneumoniae* 013

**Figura 12.** Painel comparativo das curvas de crescimento e morte realizadas nas condições de pH ácido, neutro e básico, tratadas com AgNP vegetal nos microrganismos: *E. faecium* (ATCC 6569), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus* MTS 26, *E. coli* (ATCC25922), *E. coli* 428, *E. coli* 004, *E. coli* 012, *E. coli* MTS 011, *K. pneumoniae* (ATCC 700603), *K. pneumoniae* 013. O asterisco representa significância estatística. Os valores de µM entre parênteses indicam a concentração usada em cada tratamento.

Nos ensaios de curva de crescimento foi possível observar algumas amostras que apresentaram uma característica de tolerância ao antimicrobiano, sendo capazes de continuar se reproduzindo de forma exponencial, porém em taxas reduzidas. Alguns dos microrganismos que apresentaram essa característica foram: *K. pneumoniae* (ATCC 700603) e *K. pneumoniae* 013 em pH ácido, e *E. faecium* (ATCC 6569), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* MTS 011, e *K. pneumoniae* ATCC (700603) em pH básico com uso da AgNP fúngica. Já para AgNP vegetal ocorreu em *E. coli* MTS 011 em pH ácido, *K. pneumoniae* ATCC (700603) em pH neutro, e *E. faecium* (ATCC 6569), *E. coli* MTS 011, e *K. pneumoniae* ATCC (700603) em pH básico.

Esse resultado foi observado em grande parte das amostras de *K. pneumoniae*. Com tratamento da AgNP fúngica sobre a amostra *K. pneumoniae* 013 essa característica de tolerância ao antimicrobiano ocorreu principalmente em pH ácido. As duas amostras da espécie usadas neste estudo foram isoladas de infecções urinárias, que naturalmente contém um pH ácido ao qual o microrganismo pode estar adaptado, dessa forma contribuindo para este resultado. No entanto, no tratamento com AgNP vegetal esta cepa apresentou essa característica de forma mais acentuada no pH básico do que nas outras condições testadas. No geral, os isolados dessa espécie apresentaram essa característica em todas as condições com as ambas AgNPs.

SALAS-OROZCO et al., (2019) cita alguns dos possíveis mecanismos de resistência a AgNPs que podem ser encontrados em algumas bactérias. Os mecanismos de resistência intrínseca podem incluir permeabilidade da membrana externa, bombas de efluxo e genes de resistência cromossômica. Os mecanismos extrínsecos incluem mutações e plasmídeos contendo genes de resistência.

Bactérias não são capazes de desenvolver resistência a AgNPs em comparação com os antibióticos (RAI et al., 2012; SALAS-OROZCO et al., 2019; SHRESTHA et al., 2010). Embora nem todos os mecanismos sejam bem conhecidos, as AgNPs podem interagir simultaneamente com vários alvos na célula microbiana, dificultando a geração de resistência por bactérias (SALAS-OROZCO et al., 2019). É conhecido a existência de algumas bactérias com resistência a íons de prata devido à presença de determinantes no genoma que facilitam a resistência mediada por efluxo de íons metálicos (ACHARYA et al., 2018; LOSASSO et al., 2014). Cada bactéria possui mecanismos regulatórios específicos que controlam diferentes atividades dos transportadores de membrana. Proteínas de várias famílias de transportadores foram reconhecidas como tendo papel significativo no efluxo de íons metálicos (ACHARYA et al., 2018; LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

MARQUES et al., (2019) analisou ao todo 101 cepas de *Klebsiella pneumoniae* causadoras de infecção do trato urinário em animais de estimação e humanos na unidade de tratamento intensivo (UTI). O gene *oqxAB*, relacionado à bomba de efluxo foi comum em 95,0% das amostras analisadas. Além disso, 80% dos isolados de *K. pneumoniae* de animais de companhia eram multirresistentes e a maioria das cepas possuía resistência a mais de cinco categorias de antimicrobianos.

ACHARYA et al., (2018) encontrou uma cepa de *K. pneumoniae* (AWD5) resistente à íons de prata. A análise de genoma dessa cepa, revelou a presença de dois operons que regulam a resistência sobre prata e cobre, compreendendo, um operon estrutural e um regulatório. O início da transcrição do operon estrutural é dependente da concentração de cobre e prata presentes no meio. Este é o sistema de efluxo catiônico que medeia a resistência ao cobre e prata nessa amostra.

A amostra de *E. coli* 011, isolado de mastite bovina, se demonstrou menos suscetível em pH básico com AgNP fúngica, e em pH ácido e básico com AgNP vegetal. Sabe-se que durante essa patologia o pH do lúmen da glândula do animal

pode variar de alcalino a ácido conforme a doença progride (ANDREWS et al., 2008; COSTA et al., 2014; VANGROENWEGHE; LAMOTE; BURVENICH, 2005).

No início dos sintomas clínicos, o pH tende a ser elevado devido às grandes quantidades de substâncias alcalinizantes produzidas pelo organismo para compensar a acidez produzida pela fermentação bacteriana. Além disso, nesta fase, níveis elevados de células imunes do plasma atingem os alvéolos lactíferos pela corrente sanguínea, que aumentam o pH devido à natureza alcalina do plasma (ANDREWS et al., 2008; COSTA et al., 2014). À medida que o processo infeccioso avança, maiores quantidades de ácido são produzidas a partir da inflamação e fermentação dos açúcares pelas bactérias, fazendo com que o pH diminua e chegue perto de 5 (ANDREWS et al., 2008; COSTA et al., 2014; VANGROENWEGHE; LAMOTE; BURVENICH, 2005). Possivelmente esse isolado estava bem adaptado a sobreviver nessas duas condições de pH, dessa forma os resultados obtidos com essa amostra podem estar ligados a características de cada antimicrobiano.

As proteínas da membrana externa de bactérias Gram-negativas (porinas) formam canais cheios de água, permitindo o influxo e efluxo de compostos de baixo peso molecular através da membrana externa da célula bacteriana (NIKAIDO, 1994; RADZIG et al., 2013). A influência de mutações nos genes que codificam porinas na sensibilidade de *E. coli* aos íons de prata mostram que as porinas estão envolvidas no transporte desses íons (LI; NIKAIDO; WILLIAMS, 1997; PUGSLEY; SCHNAITMAN, 1978; RADZIG et al., 2013).

RADZIG et al., (2013) investigou o efeito de mutações dos genes que codificam as porinas OmpF e OmpC, na sensibilidade de *E. coli* a AgNPs e nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), e demonstrou que no caso de cepas mutantes desprovidas de porinas OmpF ou OmpC, ou ambas as porinas eram mais resistentes aos íons de prata em comparação a cepa de tipo selvagem, o que indica que as porinas podem estar envolvidas no transporte de prata na célula. No caso das AgNP, as cepas mutantes demonstraram aumento na resistência em até 4 a 8 vezes, o que sugere que as porinas são fatores importantes nos mecanismos de ação antibacteriana da AgNP.

A cepa de *E. coli* 428 (rugosa) também apresentou tolerância às AgNPs, e mesmo com a presença do antimicrobiano foi capaz de continuar se multiplicando mesmo que em taxas reduzidas. Esse microrganismo foi o único do estudo que

apresentou comportamento semelhante em todas as condições de pH testadas com ambas AgNPs. Levando em conta as diferenças entre os outros resultados obtidos, pode-se atribuir os resultados dessa amostra, especificamente, a características intrínsecas do microrganismo.

Devido a mutações em genes responsáveis pela síntese de cadeias polissacarídicas, algumas cepas de *E. coli* podem sofrer variações de lisa para rugosa, perdendo, assim, sua especificidade antigênica. Estas cepas se autoaglutinam em solução salina e, portanto, não podem ser sorotipadas (LIOR, 1994). Dessa forma, as mutações nesses genes específicos podem ocasionar a perda parcial ou completa da cadeia polissacarídica. Este fator pode ter contribuído para os resultados obtidos nas curvas, causando uma redução na ação do antimicrobiano, decorrente da falta de parede e conseqüentemente da carga, impactando de forma negativa a atração eletrostática entre NP e microrganismo, que compõem um papel importante do potencial antimicrobiano das NPs.

Algumas amostras como *S. aureus* MTS 26 e *E. coli* 004, ambas tratadas com AgNP fúngica, apresentaram comportamentos semelhantes entre as três condições testadas. A cepa de *E. coli* 004 apresentou um declínio no ponto inicial, seguido de uma recuperação e aumento populacional até os pontos entre 7 e 10 horas, a partir de onde manteve um comportamento estacionário até o ponto final. A cepa de *S. aureus* não apresentou declínio nas primeiras horas, e sim nos pontos entre 7 e 10 horas, seguido de uma recuperação nos pontos seguintes, que se manteve até o ponto final de 24 horas. O mesmo não foi observado com a AgNP vegetal, que apresentou comportamentos distintos entre as três condições, o que sugere que em alguns casos, o comportamento observado nas curvas pode não ter sido influenciado predominantemente pelo pH, mas também por componentes do antimicrobiano usado.

#### 5.4. Formação e Inibição de Biofilme

Microrganismo	Controle positivo pH 6	Tratamento AgNP Fúngica pH 6	Controle positivo pH 7	Tratamento AgNP Fúngica pH 7	Controle positivo pH 9	Tratamento AgNP Fúngica pH 9
<i>E. faecium</i> (ATCC 6569)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	(++)	(+)	(++)	(++)	(++)	(++)
<i>S. aureus</i> MTS 26	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>E. coli</i> 428	(-)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+++)
<i>E. coli</i> 004	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)
<i>E. coli</i> 012	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)
<i>E. coli</i> MTS 011	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)	(+++)
<i>K. pneumoniae</i> 013	(++)	(+)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)

**Tabela 6.** Resultados dos testes de inibição da formação de biofilme da AgNP fúngica nos pH's ácido, neutro e básico. (-) = não aderido; (+) = fracamente aderido; (++) = moderadamente aderido; (+++) = fortemente aderido.

Microrganismo	Controle positivo pH 6	Tratamento AgNP Vegetal pH 6	Controle positivo pH 7	Tratamento AgNP Vegetal pH 7	Controle positivo pH 9	Tratamento AgNP Vegetal pH 9
<i>E. faecium</i> (ATCC 6569)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	(++)	(-)	(++)	(+)	(++)	(-)
<i>S. aureus</i> MTS 26	(-)	(-)	(+)	(+)	(++)	(-)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	(-)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)
<i>E. coli</i> 428	(-)	(-)	(+)	(+)	(+++)	(+)
<i>E. coli</i> 004	(+)	(+)	(+)	(-)	(++)	(-)
<i>E. coli</i> 012	(+)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)
<i>E. coli</i> MTS 011	(-)	(-)	(+)	(+)	(+++)	(+)
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	(++)	(-)	(++)	(++)	(+++)	(+)
<i>K. pneumoniae</i> 013	(++)	(-)	(+++)	(++)	(+++)	(-)

**Tabela 7.** Resultados dos testes de inibição da formação de biofilme da AgNP vegetal em pH ácido, neutro e básico. (-) = não aderido; (+) = fracamente aderido; (++) = moderadamente aderido; (+++) = fortemente aderido.

Como o intuito do teste foi determinar a influência de cada pH na inibição da formação de biofilmes, as concentrações de AgNPs utilizadas foram metade do valor de CIM de cada microrganismo. Desta forma, não houve um grande número de amostras onde a formação de biofilme foi totalmente impedida. No caso da AgNP fúngica, não houve inibição completa da formação de biofilme em nenhuma amostra tratada. Ocorrendo no máximo uma diminuição de amostras com biofilme moderadamente aderido para fracamente aderido, que foi observado nas cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e as duas cepas de *K. pneumoniae* em pH ácido, e em *S. aureus* MTS 26 e *K. pneumoniae* (ATCC 700603) em pH neutro. Para os ensaios de biofilme com a AgNP fúngica, o pH básico teve um efeito negativo, ocasionando uma formação de biofilme maior nas amostras tratadas com antimicrobiano em relação às amostras não tratadas. De acordo com os resultados de ambas AgNPs, aparentemente, as cepas de *K. pneumoniae* desenvolvem melhor formação de biofilme em pH básico, o que também pode ter contribuído para o resultado negativo da AgNP fúngica com esse microrganismo. Resultados semelhantes foram encontrados por HANEY, ROWE e ROBINSON (2012), onde houve um aumento da biomassa de biofilme após o tratamento das células de *Pseudomonas aeruginosa* com NPs de óxido de ferro.

Como mostrado em testes anteriores, a AgNP vegetal apresentou um potencial antimicrobiano maior, e conseqüentemente uma atividade maior na inibição da formação de biofilmes. Em pH ácido, houve inibição em *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* 012, e as duas cepas de *K. pneumoniae*. Em pH básico ocorreu o melhor índice de inibição e diminuição de biofilmes em relação a outras condições de pH, inibindo formação em duas cepas de *S. aureus*, *E. coli* 004 e *K. pneumoniae* 13, e causando diminuição da formação em todas as cepas restantes, com exceção de *E. faecium* (ATCC 6569). Em pH neutro também foi observado inibição nas cepas de *E. coli* 004 e *E. coli* 012, e diminuição do biofilme em *S. aureus* (ATCC 25923) e *K. pneumoniae* 013.

Os resultados de um estudo semelhante de SIDDIQUE e colaboradores (2020) realizado com cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*, indicaram que na maioria dos casos, o tratamento de células com concentrações subinibitórias de AgNPs reduz significativamente a formação de biofilme de maneira dose-dependente, e sugeriu que a inibição do biofilme em *K. pneumoniae* pode ser devido ao rompimento da matriz exopolissacarídica.

O mecanismo de ação exato das nanopartículas de prata em estudos relacionados ao biofilme ainda não foi demonstrado. Sabe-se que a excreção de substâncias adesivas (polissacarídeos e proteínas) é crucial para a fixação inicial dos organismos, bem como para manter as bactérias do biofilme unidas (LEWIS, 2001; MASURKAR et al., 2012).

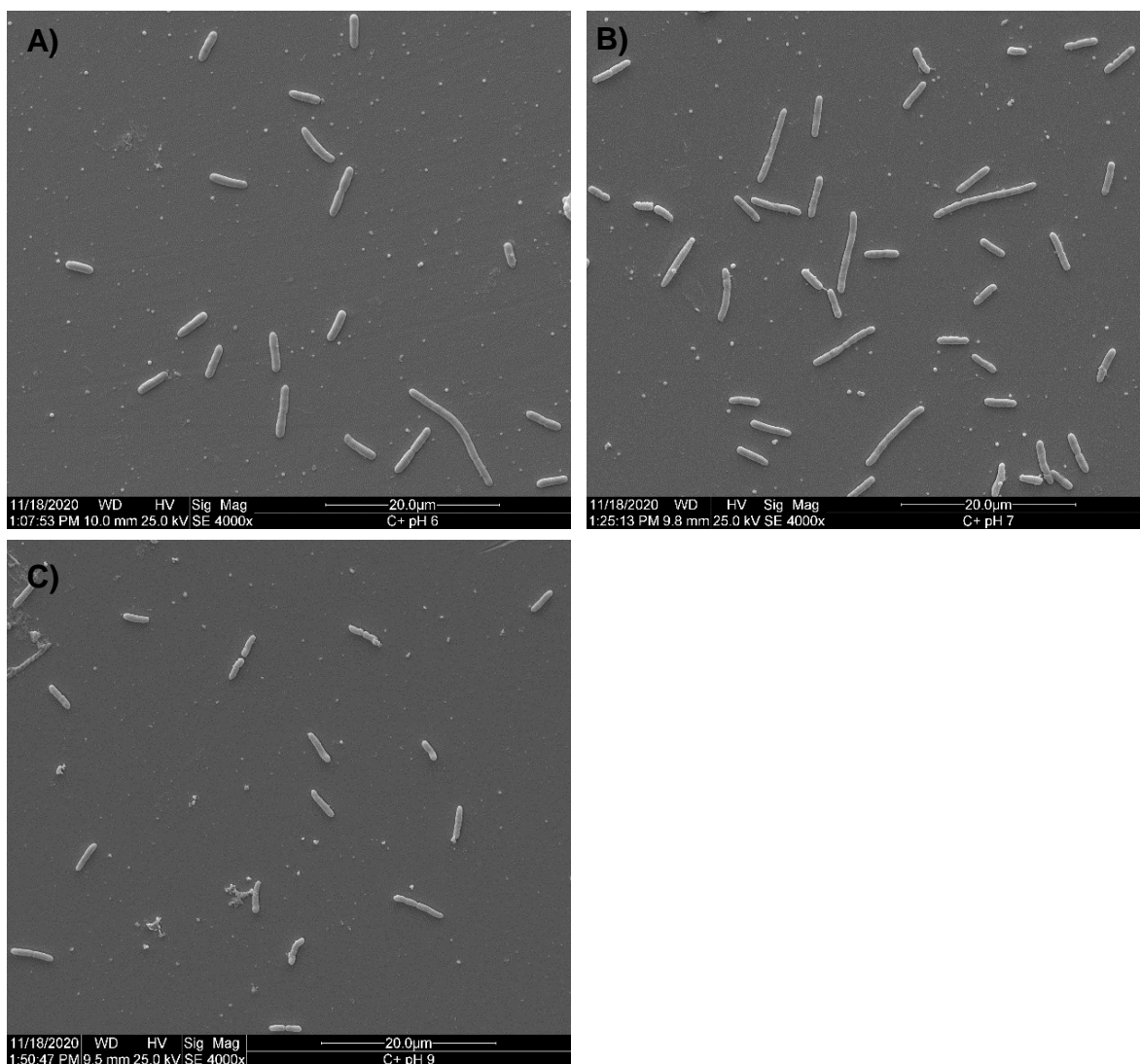
A AgNP vegetal demonstrou atividade nas três condições testadas em *S. aureus* (ATCC 25923), principalmente em pH ácido e básico onde ocorreu a inibição total da formação de biofilme, enquanto no pH neutro houve uma diminuição de formação de biofilme moderada para fraca. Já para a amostra de *S. aureus* MTS 26 ocorreu inibição apenas em pH básico.

Um estudo de MASURKAR et al., (2012) também demonstrou possibilidade de prevenção da formação de biofilme utilizando AgNPs biogênicas em cepas de *S. aureus*, e concluíram que o mecanismo de ação pode estar envolvido na neutralização das substâncias adesivas, evitando a fixação e conseqüentemente a formação de biofilme.

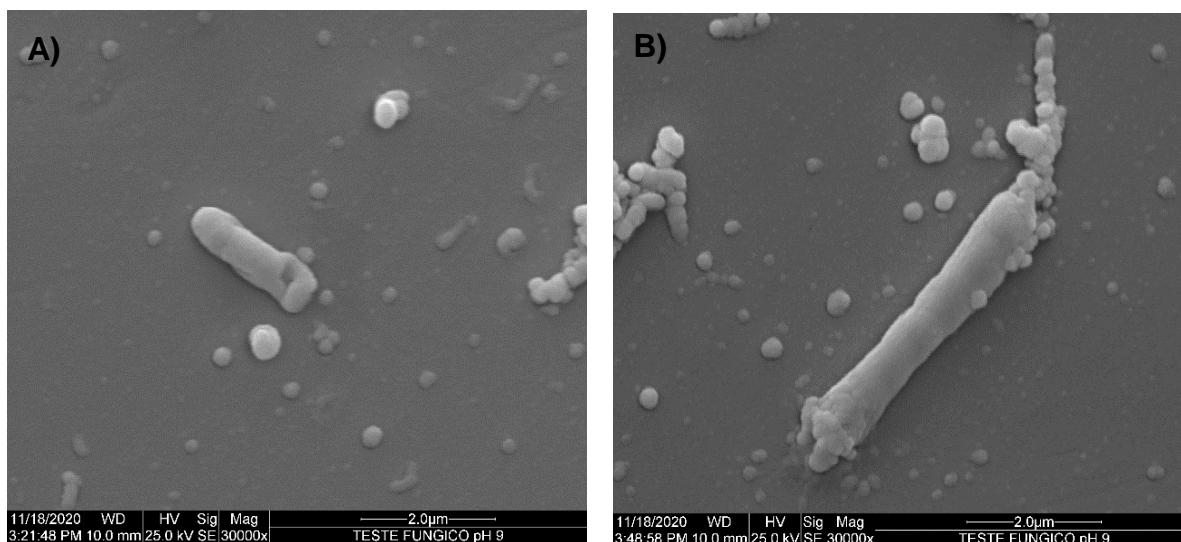
A atividade anti-biofilme de AgNPs também foi demonstrada em outros estudos, focados principalmente em bactérias que apresentam resistência aos antibióticos convencionais (FRANCI et al., 2015; ANSARI et al., 2015; ANSARI et al., 2014a).

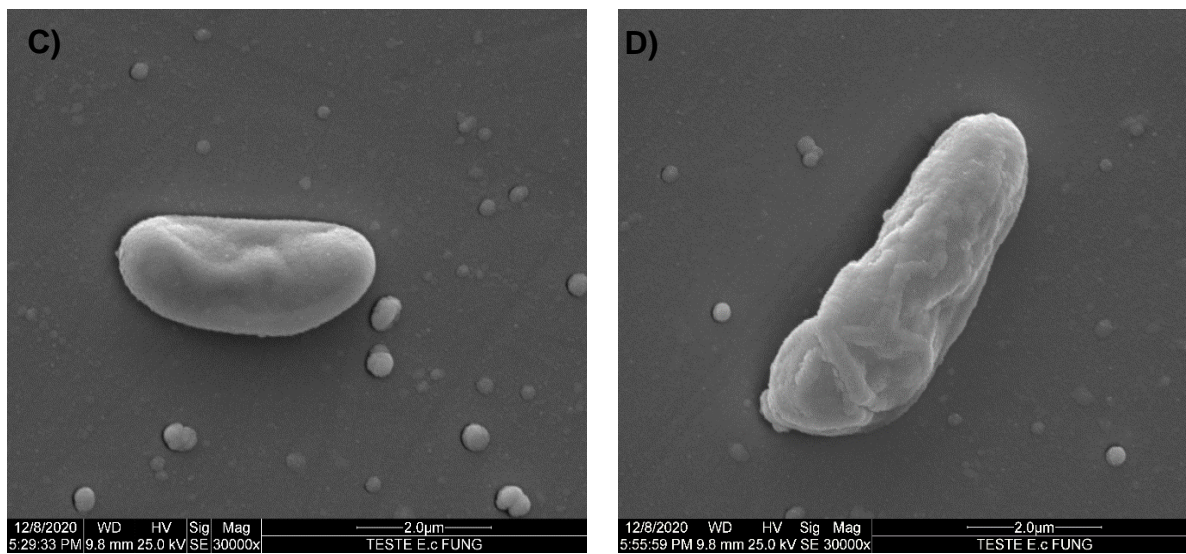
## **5.5. Análise estrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura**

Os resultados de microscopia eletrônica de varredura demonstraram uma variedade de danos às células tratadas com AgNPs. Já as células não tratadas apresentaram suas formas comuns, sem qualquer tipo de alteração anormal na morfologia, conforme apresentado nas figuras 13 e 16.

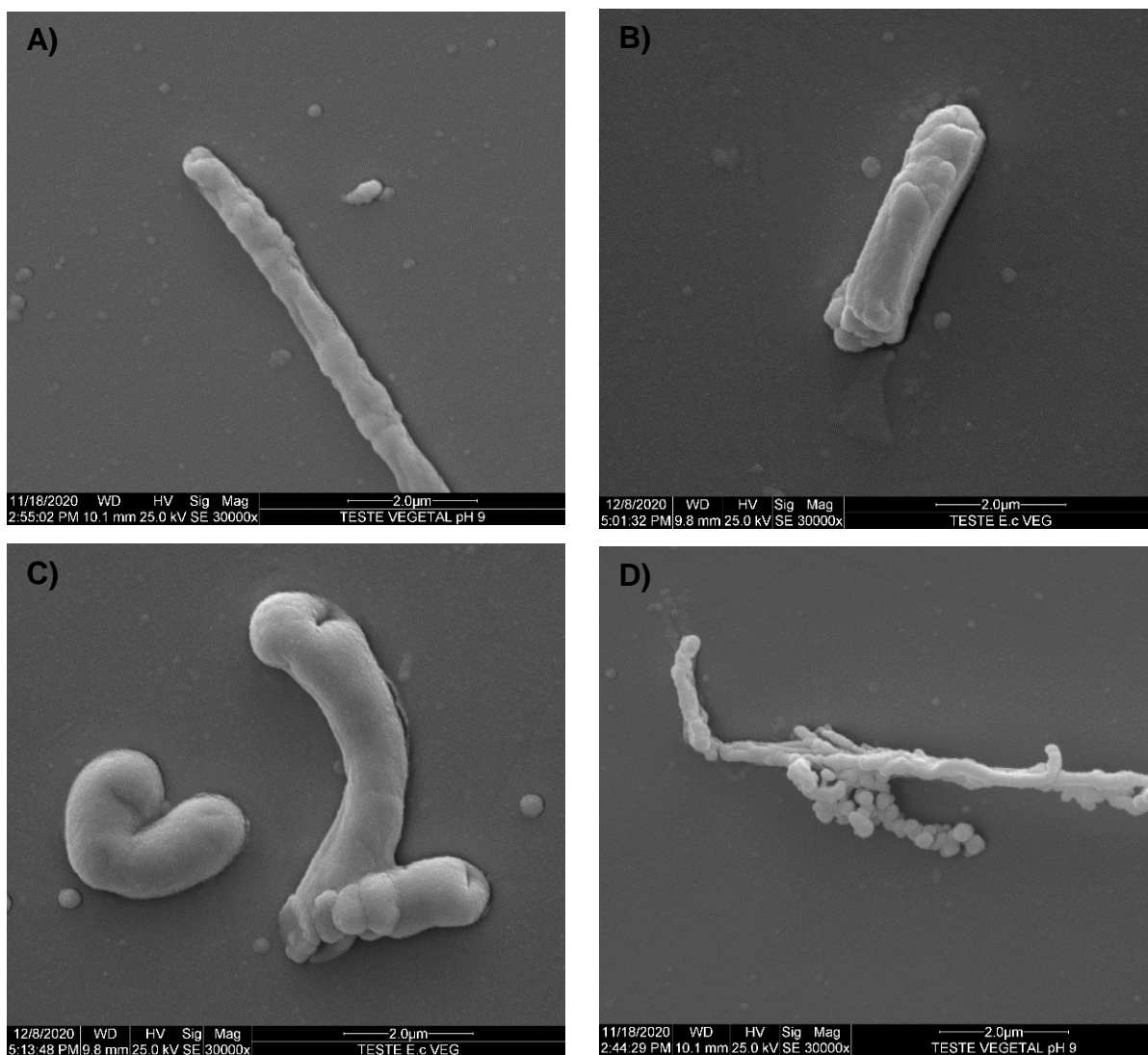


**Figura 13.** Microscopia eletrônica de varredura da amostra *E. coli* 012 sem tratamento, após 2 horas de incubação. **(A)** *E. coli* 012 em meio com pH 6. **(B)** *E. coli* 012 em meio com pH 7. **(C)** *E. coli* 012 em meio com pH 9.

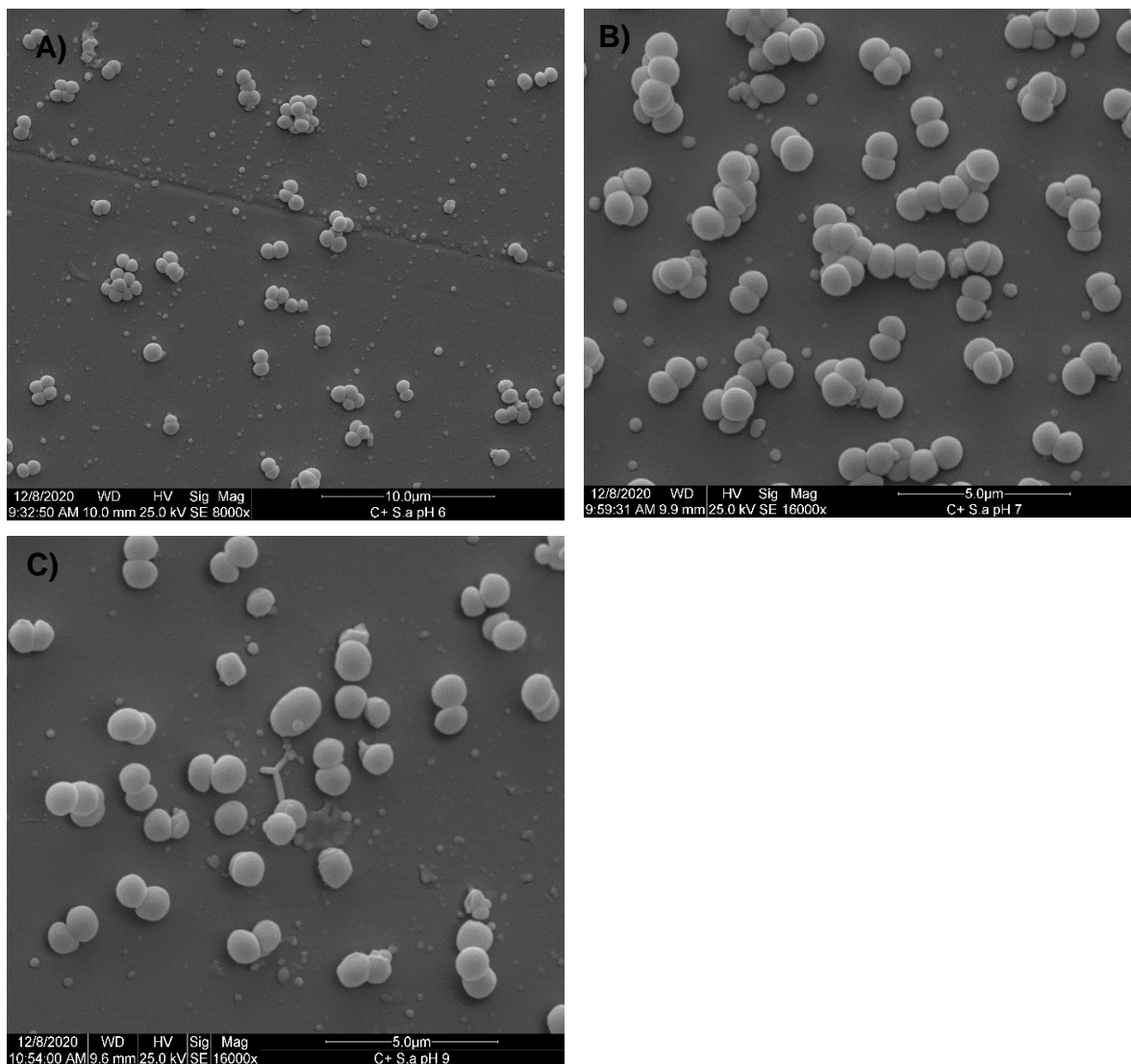




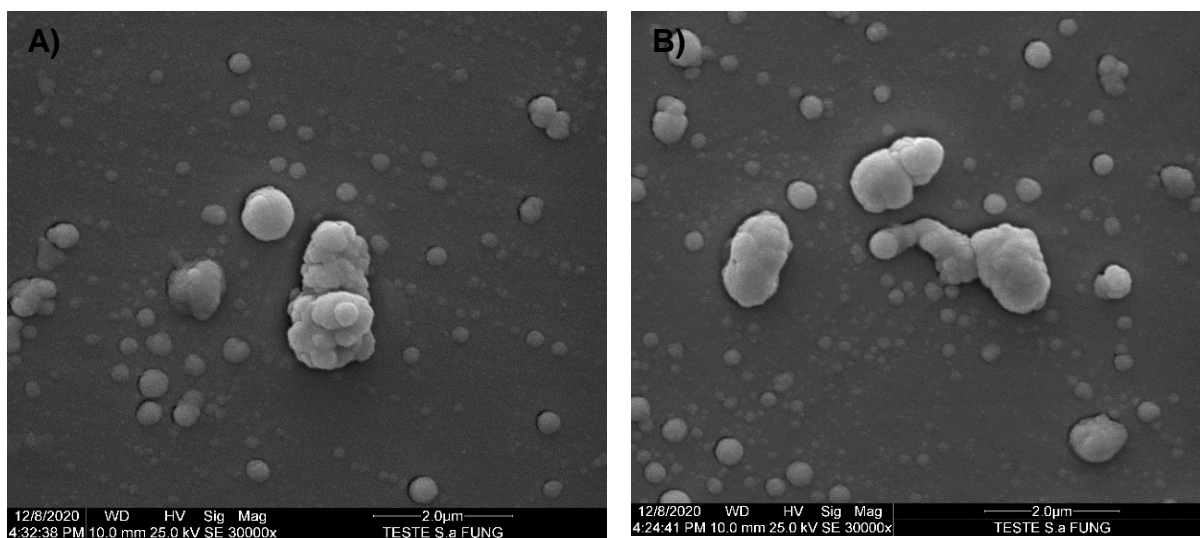
**Figura 14.** Microscopia eletrônica de varredura da amostra *E. coli* 012, tratada com 125 µM de AgNP fúngica, após 2 horas de incubação em pH 9. (A, B, C, D) Aumento de 30000x.

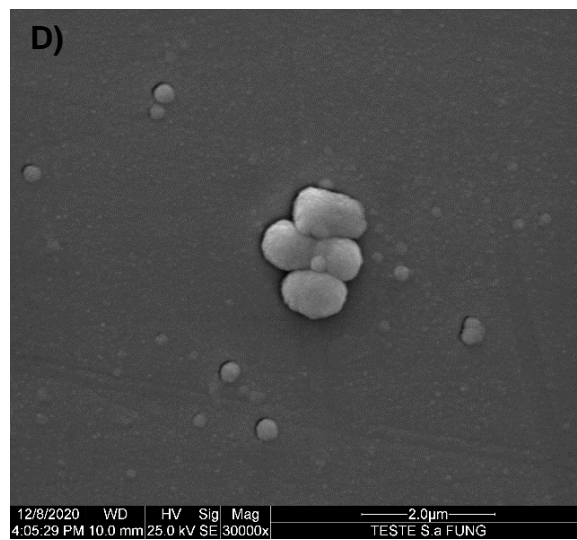
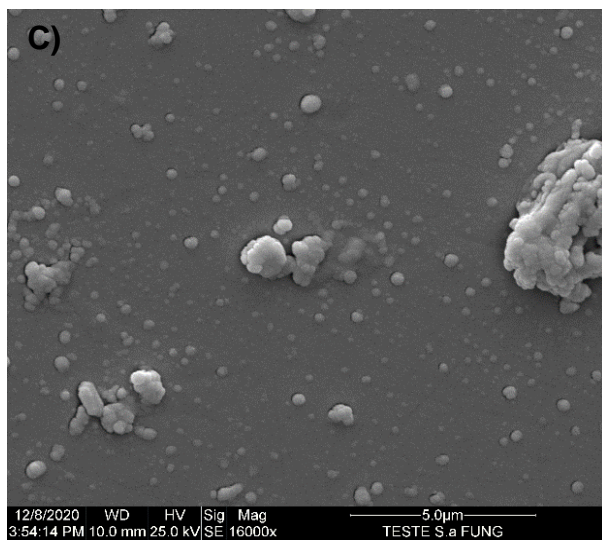


**Figura 15.** Microscopia eletrônica da varredura da amostra *E. coli* 012, tratada com 31,25 µM de AgNP vegetal, após 2 horas de incubação em pH 9. (A, B, C, D) Aumento de 30000x.

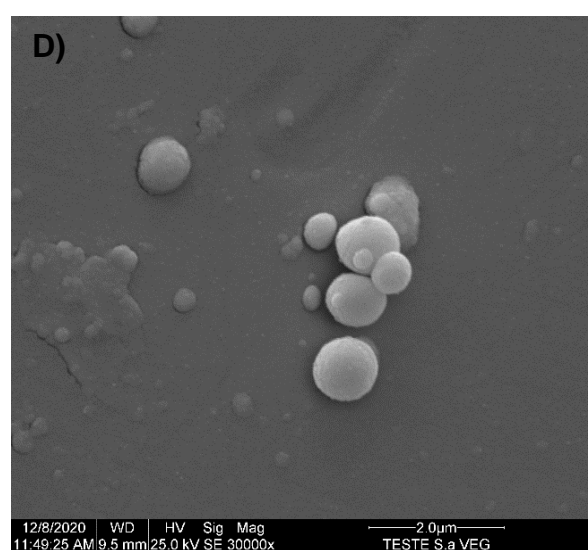
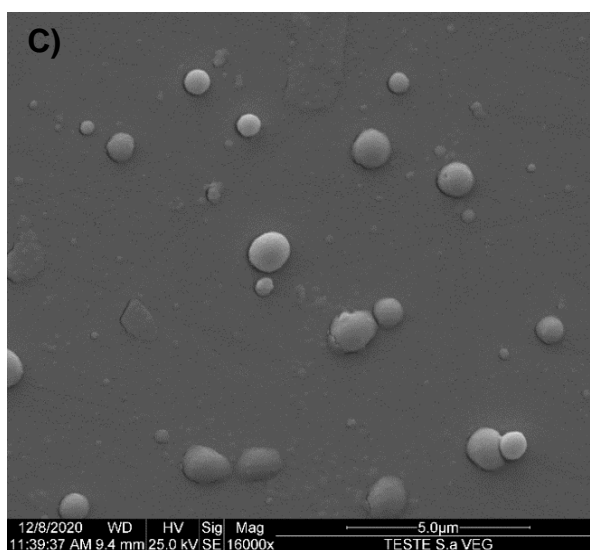
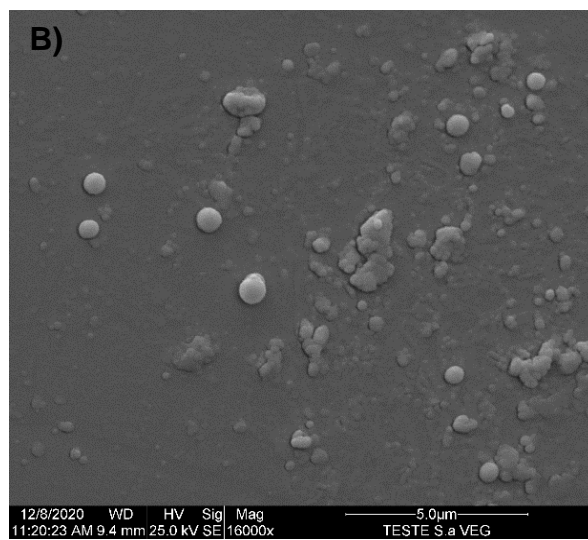
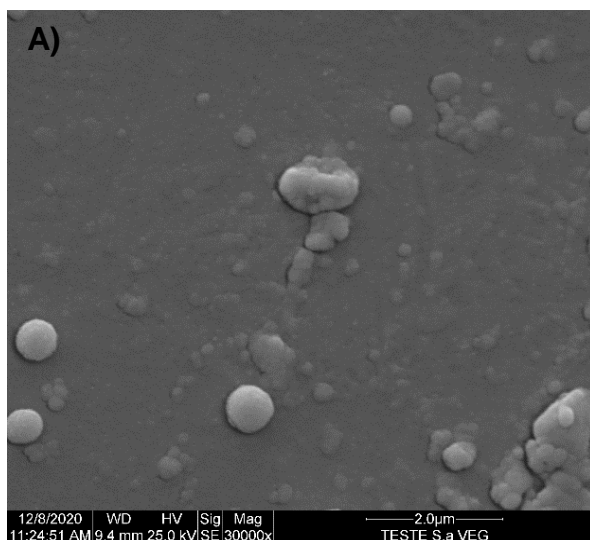


**Figura 16.** Microscopia eletrônica de varredura de amostra *S. aureus* MTS 26 sem tratamento, após 7 horas de incubação. (A) *S. aureus* MTS 26 em meio com pH 6. (B) *S. aureus* MTS 26 em meio com pH 7. (C) *S. aureus* MTS 26 em meio com pH 9.





**Figura 17.** Microscopia eletrônica de varredura da amostra *S. aureus* MTS 26, tratada com 250 µM de AgNP fúngica, após 7 horas de incubação em pH 7. (A, B, D) Aumento de 30000x. (C) Aumento de 16000x.



**Figura 18.** Microscopia eletrônica de varredura da amostra *S. aureus* MTS 26, tratada com 31,25  $\mu\text{M}$  de AgNP vegetal, após 7 horas de incubação em pH 7. (B, C) Aumento de 16000x. (A, D) Aumento de 30000x.

As amostras de *E. coli* 012 tratadas com AgNP fúngica apresentaram deformações na superfície e formação de cavidades de forma irregular, condizente com resultados já encontrados por SONDI e SALOPEK-SONDI (2004) e AMRO et al., (2000). Os tratamentos com AgNP vegetal apresentaram deformações como alongamento e fragmentação das células, assim como encontrado por CHATTERJEE et al., (2015). Neste tratamento também foi observado a formação de vesículas externas, como visto por CLÉBIS et al., (2021) em um estudo feito com micropartículas de prata encapsuladas em mel.

As amostras de *S. aureus* MTS 26 apresentaram alterações semelhantes tanto para a AgNP fúngica quanto para a vegetal, ocasionando o aparecimento de protuberâncias e diversas vesículas externas nas células, assim como os resultados obtidos por SCANDORIEIRO et al., (2016) em um estudo utilizando AgNPs e óleo essencial de orégano.

## 6.0. CONCLUSÃO

A partir dos ensaios de caracterização foi possível concluir que as AgNPs produzidas apresentaram boa estabilidade e tamanho dentro do normal para nanopartículas sintetizadas por sistemas biológicos. Além disso, ambas exibiram atividade antibacteriana frente a todos os microrganismos testados. A AgNP de origem vegetal apresentou um potencial antimicrobiano superior à AgNP de origem fúngica, no entanto a AgNP fúngica apresentou mais influência do pH. Outros ensaios demonstraram a influência da condição de pH na atividade antimicrobiana da nanopartícula, e também a cinética de comportamento dos microrganismos quando em contato com o antimicrobiano. Em suma, foi possível observar que o pH do meio pode influenciar a atividade antimicrobiana da AgNP, e que essa influência é dependente de características da nanopartícula que podem ser oriundas da síntese e também do microrganismo usado.

## 7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEGAN, A. et al. The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. e720654, 15 fev. 2015.

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. **Nature**, v. 146, n. 3713, p. 837–837, dez. 1940.

ACHARYA, D. et al. Shape dependent physical mutilation and lethal effects of silver nanoparticles on bacteria. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 201, 9 jan. 2018.

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. **Nanoscale**, v. 5, n. 16, p. 7328–7340, 21 ago. 2013.

AHEARN, D. G.; MAY, L. L.; GABRIEL, M. M. Adherence of organisms to silver-coated surfaces. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 372–376, out. 1995.

AHMAD, F. et al. Biological synthesis of metallic nanoparticles (MNPs) by plants and microbes: their cellular uptake, biocompatibility, and biomedical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 7, p. 2913–2935, abr. 2019.

AHMED, M. O.; BAPTISTE, K. E. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. **Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 24, n. 5, p. 590–606, jun. 2018.

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. **Future Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 933–940, ago. 2011.

ALMEIDA, É. S.; DE OLIVEIRA, D.; HOTZA, D. Characterization of silver nanoparticles produced by biosynthesis mediated by *Fusarium oxysporum* under different processing conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 9, p. 1291–1303, set. 2017.

AMENDOLA, V.; MENEGHETTI, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. **Physical chemistry chemical physics: PCCP**, v. 11, n. 20, p. 3805–3821, 28 maio 2009.

AMINI, S. M. Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 103, p. 109809, out. 2019.

AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, 2010.

AMINOV, R.; MACKIE, R. Aminov RI, Mackie RI.. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 271: 147-161. **FEMS microbiology letters**, v. 271, p. 147–61, 1 jul. 2007.

AMRO, N. A. et al. High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. **Langmuir**, v. 16, n. 6, p. 2789–2796, 21 mar. 2000.

ANDRA, S. et al. Phytosynthesized metal oxide nanoparticles for pharmaceutical applications. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, n. 7, p. 755–771, jul. 2019.

ANDREWS, A. H. et al. **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.

ANSARI, M. A. et al. Gum arabic capped-silver nanoparticles inhibit biofilm formation by multi-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 688–699, jul. 2014.

ANSARI, M. A. et al. Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 101–109, mar. 2015.

BECKER, K. et al. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “mec alphabet” with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 304, n. 7, p. 794–804, out. 2014.

BECKER, K. et al. Staphylococcus aureus from the German general population is highly diverse. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 307, n. 1, p. 21–27, jan. 2017.

BENTLEY, R.; BENNETT, J. W. What is an antibiotic? Revisited. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 303–331, 2003.

BERA, A.; BELHAJ, H. Application of nanotechnology by means of nanoparticles and nanodispersions in oil recovery - A comprehensive review. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, v. 34, p. 1284–1309, 1 ago. 2016.

BERTHE, T. et al. Evidence for Coexistence of Distinct Escherichia coli Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4684–4693, ago. 2013.

BEUTLER, J. A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 46, n. 1, p. 9.11.1-9.11.21, 2009.

BONDARENKO, O. et al. Particle-cell contact enhances antibacterial activity of silver nanoparticles. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e64060, 2013.

BOVERHOF, D. R. et al. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 137–150, 1 out. 2015.

BRISSE, S.; ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; GRIMONT, P. A. D. Molecular Serotyping of Klebsiella Species Isolates by Restriction of the Amplified Capsular Antigen Gene Cluster. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3388–3398, ago. 2004.

BSI. British Standards Institution. **Nanoparticles Vocabulary**. London, United Kingdom: Pas 71, 2011.

CAO, H. et al. Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. **Biomaterials**, v. 32, n. 3, p. 693–705, jan. 2011.

CASTRO, R. H. R. DE; GOUVÊA, D. Estudo da estabilidade de dispersões de SnO<sub>2</sub> utilizando L-Arginina ou quitosana como dispersantes. **Cerâmica**, v. 46, n. 300, p. 214–219, dez. 2000.

CHATTERJEE, T. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1850, n. 2, p. 299–306, fev. 2015.

CHEN, Y.-H.; YEH, C.-S. Laser ablation method: use of surfactants to form the dispersed Ag nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 197, n. 1, p. 133–139, 4 fev. 2002.

CHOI, O.; HU, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 12, p. 4583–4588, 15 jun. 2008.

CHUGH, H. et al. Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. sup1, p. 1210–1220, 2018.

CLÉBIS, V. H. et al. Atividade antibacteriana de micropartículas de prata encapsuladas com méis de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona bipunctata* / Antibacterial activity of silver microparticles encapsulated with honeys from *Apis mellifera* and *Scaptotrigona bipunctata*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 1, p. 933–948, 19 fev. 2021.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2012.

COSTA, J. C. M. et al. Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 666–671, abr. 2014.

CUNHA, S. et al. Lipid Nanoparticles for Nasal/Intranasal Drug Delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 34, n. 3, p. 257–282, 2017.

DE FÁTIMA SILVA LOPES, M. et al. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 191–198, 25 ago. 2005.

DE SOUSA MARCIAL, S. P.; CARNEIRO, G.; LEITE, E. A. Lipid-based nanoparticles as drug delivery system for paclitaxel in breast cancer treatment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, n. 10, p. 340, 14 out. 2017.

DEFRATES, K. et al. Protein Polymer-Based Nanoparticles: Fabrication and Medical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, 9 jun. 2018.

DESHPANDE, L. M. et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 2, p. 163–170, jun. 2007.

DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, p. 100–115, mar. 2009.

DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Drug Development Research**, v. 67, n. 1, p. 55–60, 2006.

DUONG, V.-A.; NGUYEN, T.-T.-L.; MAENG, H.-J. Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 20, 18 out. 2020.

DURÁN, N. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 789–799, abr. 2016.

EL BADAWY, A. M. et al. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 283–287, 1 jan. 2011.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, 1 out. 2012.

FERNANDO, I.; ZHOU, Y. Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. **Chemosphere**, v. 216, p. 297–305, fev. 2019.

FIGUEIREDO, E. et al. New Approach For Simvastatin As An Antibacterial: Synergistic Effect With Bio-Synthesized Silver Nanoparticles Against Multidrug-Resistant Bacteria. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 7975–7985, 3 out. 2019.

FRANCI, G. et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 5, p. 8856–8874, 18 maio 2015.

FREESTONE, I. et al. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. **Gold Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 270–277, dez. 2007.

GORRIE, C. et al. Genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Microbial Genomics**, v. 5, n. 7, jul. 2019.

GORUP, Luiz Fernando. Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos. 2010.

GURUNATHAN, S. et al. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 328–335, 1 nov. 2009.

GURUNATHAN, S.; CHOI, Y.-J.; KIM, J.-H. Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles on Endometritis Caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in Dairy Cattle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 16 abr. 2018.

HADRUP, N.; LAM, H. R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver--a review. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 68, n. 1, p. 1–7, fev. 2014.

HAJIPOUR, M. J. et al. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 499–511, 1 out. 2012.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1034–1043, jul. 2009.

HAMOUDA, T.; BAKER, J. R. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 3, p. 397–403, set. 2000.

HANEY, C.; ROWE, J. J.; ROBINSON, J. B. Spions Increase Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 03, n. 04, p. 508, 31 out. 2012.

HOLT, K. B.; BARD, A. J. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag<sup>+</sup>. **Biochemistry**, v. 44, n. 39, p. 13214–13223, 4 out. 2005.

HOSEINZADEH, E. et al. Antimicrobial potential of synthesized zinc oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, n. 25–27, p. 4969–4976, 29 jul. 2014.

HOSEINZADEH, E. et al. A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 120–128, 2017.

HOSEINZADEH, E.; P, M. Sensitivity Coefficient and Death Kinetics of *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus* to Zinc Oxide and Copper Oxide Nanoparticles. **Journal of Isfahan Medical School**, v. 30, 1 jan. 2012.

HULLA, J.; SAHU, S.; HAYES, A. Nanotechnology: History and future. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318–1321, 1 dez. 2015.

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

IVASK, A. et al. Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. **ACS nano**, v. 8, n. 1, p. 374–386, 28 jan. 2014.

JAO, D. et al. Protein-Based Drug-Delivery Materials. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 5, 9 maio 2017.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 1050–1074, 3 abr. 2018.

JO, Y.-K.; KIM, B. H.; JUNG, G. Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. **Plant Disease**, v. 93, n. 10, p. 1037–1043, out. 2009.

JONES, S. A. et al. Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber dressing. **Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 12, n. 3, p. 288–294, jun. 2004.

JUNG, J. H. et al. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. **Journal of Aerosol Science**, v. 12, n. 37, p. 1662–1670, 2006.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.

KASHYAP, P. L. et al. Myconanotechnology in agriculture: a perspective. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 191–207, fev. 2013.

KAUR, C. P.; VADIVELU, J.; CHANDRAMATHI, S. Impact of Klebsiella pneumoniae in lower gastrointestinal tract diseases. **Journal of Digestive Diseases**, v. 19, n. 5, p. 262–271, maio 2018.

KHAN, A. U. et al. Fungi-assisted silver nanoparticle synthesis and their applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 1, p. 1–20, jan. 2018.

KHEZERLOU, A. et al. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 505–526, 1 out. 2018.

KLEMM, E. J.; WONG, V. K.; DOUGAN, G. Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 51, p. 12872–12877, 18 dez. 2018.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: GILMORE, M. S. et al. (Eds.). . **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

KRUIS, F.; FISSAN, H.; RELINGHAUS, B. Sintering and evaporation characteristics of gas-phase synthesis of size-selected PbS nanoparticles. **Materials Science and Engineering B**, v. 69–70, p. 329–334, 19 jan. 2000.

KYTSYA, A. et al. The Kinetic Rate Law for the Autocatalytic Growth of Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 47, n. 6, p. 351–360, 2015.

LARESE FILON, F. et al. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 72, n. 2, p. 310–322, jul. 2015.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 4, p. 18033, 31 maio 2018.

LEE, H. J. et al. Antimicrobial polyethyleneimine-silver nanoparticles in a stable colloidal dispersion. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 505–511, 1 nov. 2011.

LEE, S. H.; JUN, B.-H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 17 fev. 2019.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371–384, jun. 2013.

LEON, L.; CHUNG, E. J.; RINALDI, C. Chapter 1 - A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. In: CHUNG, E. J.; LEON, L.; RINALDI, C. (Eds.). . **Nanoparticles for Biomedical Applications**. Micro and Nano Technologies. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1–4.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999–1007, abr. 2001.

LI, J. et al. Biosynthesis of gold nanoparticles by the extreme bacterium Deinococcus radiodurans and an evaluation of their antibacterial properties. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 5931–5944, 2016.

LI, P.-W. et al. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 197, n. 2, p. 82–87, 16 ago. 2010a.

- LI, W.-R. et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 1115–1122, jan. 2010b.
- LI, X. Z.; NIKAIDO, H.; WILLIAMS, K. E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag<sup>+</sup> and are deficient in porins. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 19, p. 6127–6132, out. 1997.
- LIAO, C.; LI, Y.; TJONG, S. C. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 21 jan. 2019.
- Lior H. Classification of *Escherichia coli*. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. United Kingdom, 1994.
- LOSASSO, C. et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella* serovars. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 227, 2014.
- LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 20 ago. 1998.
- MA, H. et al. Spontaneous Organization of Individual Silver Nanoparticles into One-Dimensionally Ordered Nanostructures. **ChemPhysChem**, v. 5, p. 713–716, 17 maio 2004.
- MACDONALD, A.; SMITH, A. Classics in infectious diseases." On abscesses". Alexander Ogston (1844–1929). **Rev Infect Dis**, v. 6, p. 122–128, 1984.
- MAHMOUDI, M. et al. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5610–5637, 14 set. 2011.
- MALARKODI, C. et al. Biosynthesis and Antimicrobial Activity of Semiconductor Nanoparticles against Oral Pathogens. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2014, p. 347167, 2014.
- MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531–1551, 1 jun. 2010.
- MARQUES, C. et al. *Klebsiella pneumoniae* causing urinary tract infections in companion animals and humans: population structure, antimicrobial resistance and

virulence genes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 3, p. 594–602, 1 mar. 2019.

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.

MASURKAR, S. A. et al. Effect of biologically synthesised silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* biofilm quenching and prevention of biofilm formation. **IET nanobiotechnology**, v. 6, n. 3, p. 110–114, set. 2012.

MATSEN, J. M.; SPINDLER, J. A.; BLOSSER, R. O. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. **Applied Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 672–678, out. 1974.

MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 2, p. 269–281, jun. 2017.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165–196, 25 abr. 2001.

MEHRABI, M. et al. Chitosan-based Nanoparticles in Mucosal Vaccine Delivery. **Archives of Razi Institute**, v. 73, n. 3, p. 165–176, set. 2018.

MIRHOSSEINI, S. H. et al. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on  $\zeta$ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1–3, p. 47–56, 2008.

MOHAMMADINEJAD, R. et al. Plant molecular farming: Production of metallic nanoparticles and therapeutic proteins using green factories. **Green Chemistry**, v. 21, 6 mar. 2019.

MOHAMMADPOURDOUNIGHI, N. et al. Preparation of chitosan nanoparticles containing *Naja naja oxiana* snake venom. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 137–143, fev. 2010.

MOHR, K. I. History of Antibiotics Research. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 398, p. 237–272, 2016.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, out. 2005.

MORRIS, J.; WILLIS, J. US Environmental Protection Agency nanotechnology white paper. **US Environmental Protection Agency: Washington, DC**, p. 1–133, 2007.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 50, n. 1, p. 161–177, jul. 2000.

MÜLLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C. M. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 8, n. 3, p. 207–227, set. 2011.

NAKAMURA, S. et al. Synthesis and Application of Silver Nanoparticles (Ag NPs) for the Prevention of Infection in Healthcare Workers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, 24 jul. 2019.

NAKAZATO, G. et al. Violacein@Biogenic Ag system: synergistic antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 12, p. 1433–1437, dez. 2019.

NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 6, p. 3905–3908, 11 fev. 1994.

NIÑO-MARTÍNEZ, N. et al. Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Metal and Metal Oxide Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, 8 jun. 2019.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 4, p. 1177–1183, 15 fev. 2011.

ØRSKOV, I.; FIFE-ASBURY, M. A. New *Klebsiella* Capsular Antigen, K82, and the Deletion of Five of Those Previously Assigned. 1977.

OVAIS, M. et al. Role of plant phytochemicals and microbial enzymes in biosynthesis of metallic nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 16, p. 6799–6814, 1 ago. 2018.

PAITAN, Y. Current Trends in Antimicrobial Resistance of Escherichia coli. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 416, p. 181–211, 2018.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712–1720, mar. 2007.

PANACEK, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 110, n. 33, p. 16248–16253, 24 ago. 2006.

PARADA, J. et al. The nanotechnology among US: are metal and metal oxides nanoparticles a nano or mega risk for soil microbial communities? **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 157–172, mar. 2019.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, out. 1998.

POSADOWSKA, U.; BRZYCHCZY-WŁOCH, M.; PAMUŁA, E. Gentamicin loaded PLGA nanoparticles as local drug delivery system for the osteomyelitis treatment. **Acta of Bioengineering and Biomechanics**, v. 17, n. 3, p. 41–48, 2015.

PUGSLEY, A. P.; SCHNAITMAN, C. A. Outer Membrane Proteins of Escherichia coli VII. Evidence That Bacteriophage-Directed Protein 2 Functions as a Pore. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1181–1189, mar. 1978.

RADZIG, M. A. et al. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 102, p. 300–306, 1 fev. 2013.

RAI, M. **Nanotechnology in Skin, Soft Tissue, and Bone Infections**. [s.l.] Springer, 2020.

RAI, M. K. et al. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 841–852, maio 2012.

RAZA, T. et al. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 68, n. 5, p. 768–772, maio 2018.

REIDY, B. et al. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. **Materials**, v. 6, n. 6, p. 2295–2350, 5 jun. 2013.

ROBERTS, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of Staphylococcus aureus infections of the skin and soft tissue. **Internal Medicine Journal**, v. 35 Suppl 2, p. S97-105, dez. 2005.

ROSA, Ramon Gabriel Teixeira. Caracterização de nanopartículas de Bi produzidas por ablação a laser. 2014.

ROUGET, C. Des substances amylicées dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (chitine). **Comp. Rend**, v. 48, p. 792–795, 1859.

RYCENGA, M. et al. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 6, p. 3669–3712, 8 jun. 2011.

SABLE, S. V. et al. Bioreduction mechanism of silver nanoparticles. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 107, p. 110299, fev. 2020.

SALAS-OROZCO, M. et al. Mechanisms of Resistance to Silver Nanoparticles in Endodontic Bacteria: A Literature Review. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, p. e7630316, 20 jan. 2019.

SANDRI, G. et al. Opportunities offered by chitosan-based nanotechnology in mucosal/skin drug delivery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 401–412, 2015.

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.

SELDEN, R. et al. Nosocomial klebsiella infections: intestinal colonization as a reservoir. **Annals of Internal Medicine**, v. 74, n. 5, p. 657–664, maio 1971.

SHRESTHA, A. et al. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. **Journal of endodontics**, v. 36, n. 6, p. 1030–1035, 2010.

SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A.; RAO, R. A. K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 14, 16 fev. 2018.

SIDDIQUE, M. H. et al. Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 6398165, 2020.

SINGH, A. et al. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. **Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)**, v. 25, p. e00427, mar. 2020.

SLAVIN, Y. N. et al. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. **Journal of nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2017.

SONAJE, K. et al. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. **Biomaterials**, v. 31, n. 12, p. 3384–3394, abr. 2010.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177–182, 1 jul. 2004.

STEPANOVIĆ, Srdjan et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

STOIMENOV, P. K. et al. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. **Langmuir**, v. 18, n. 17, p. 6679–6686, 1 ago. 2002.

SUN, Y.; XIA, Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5601, p. 2176–2179, 13 dez. 2002.

SYAFIUDDIN, A. et al. A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 64, n. 7, p. 732–756, 2017.

TANG, S.; ZHENG, J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 13, p. e1701503, 2018.

TARHINI, M.; GREIGE-GERGES, H.; ELAISSARI, A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 522, n. 1–2, p. 172–197, 30 abr. 2017.

TCHERNIAK, A. et al. Probing a Century Old Prediction One Plasmonic Particle at a Time. **Nano Letters**, v. 10, n. 4, p. 1398–1404, 14 abr. 2010.

TENOVER, F. C.; MCDONALD, L. C. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 300–305, ago. 2005.

TOLOCHKO, N. K. History of nanotechnology. **Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)**, 2009.

VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, p. 337–356, 2014.

VANGROENWEGHE, F.; LAMOTE, I.; BURVENICH, C. Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. **Domestic animal endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 283–293, 2005.

VELUSAMY, P. et al. Biopolymers Regulate Silver Nanoparticle under Microwave Irradiation for Effective Antibacterial and Antibiofilm Activities. **PloS One**, v. 11, n. 6, p. e0157612, 2016.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management**, v. 40, n. 4, p. 277–283, abr. 2015.

VIMBELA, G. V. et al. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3941–3965, 2017.

VON EIFF, C. et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 1, p. 11–16, 4 jan. 2001.

WAKSMAN, S. A. What is an antibiotic or an antibiotic substance? **Mycologia**, v. 39, n. 5, p. 565–569, out. 1947.

WEBER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 197–200, 10 mar. 2000.

WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 13, n. 47, 20 nov. 2008.

WERTHEIM, H. F. L. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, dez. 2005.

WICKI, A. et al. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 200, p. 138–157, 28 fev. 2015.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257–1272, 7 maio 2004.

**World Health Organization (WHO).** Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. WHO, Geneva, Switzerland, 2014.

WU, X. et al. Photovoltage mechanism for room light conversion of citrate stabilized silver nanocrystal seeds to large nanoprisms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 29, p. 9500–9506, 23 jul. 2008.

XIU, Z. et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano Letters**, v. 12, n. 8, p. 4271–4275, 8 ago. 2012.

YANG, X. et al. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 1119–1127, 17 jan. 2012.

YAO, Y. et al. The Toxicity Of Metallic Nanoparticles On Liver: The Subcellular Damages, Mechanisms, And Outcomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 8787–8804, 2019.

YEE, C. et al. One-Phase Synthesis of Thiol-Functionalized Platinum Nanoparticles. **Langmuir**, v. 15, n. 13, p. 4314–4316, 1 jun. 1999.

ZAFFIRI, L.; GARDNER, J.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. **Journal of Investigative Surgery: The Official Journal of the Academy of Surgical Research**, v. 25, n. 2, p. 67–77, abr. 2012.

ZAWADZKA, K. et al. Surface area or diameter – which factor really determines the antibacterial activity of silver nanoparticles grown on TiO<sub>2</sub> coatings? **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 3275–3281, 18 jun. 2014.

ZHANG, E. et al. Advances in chitosan-based nanoparticles for oncotherapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 115004, 15 out. 2019.

ZHANG, Q. et al. Seed-mediated synthesis of Ag nanocubes with controllable edge lengths in the range of 30-200 nm and comparison of their optical properties. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 32, p. 11372–11378, 18 ago. 2010.

ZHANG, W. et al. Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 29, n. 15, p. 4647–4651, 16 abr. 2013.

ZHANG, X.-F. et al. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 13 set. 2016.

ZHANG, Y. et al. Incidence, clinical characteristics, and outcomes of nosocomial Enterococcus spp. bloodstream infections in a tertiary-care hospital in Beijing, China: a four-year retrospective study. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, 4 jul. 2017.

ZHAO, X. et al. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 817–835, set. 2018.

ZHOU, K. et al. A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 7333–7347, 9 nov. 2018.

ZINJARDE, S. Bio-inspired nanomaterials and their applications as antimicrobial agents. **Chronicles Young Sci.**, v. 3, p. 1–74, 1 jan. 2012.

ZUYI, NULL; WENMING, NULL. Comparison between the One pK and Two pK Models of the Metal Oxide-Water Interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 208, n. 1, p. 248–251, 1 dez. 1998.