



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ERICK KENJI NISHIO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MECANISMOS DE AÇÃO
DE NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Londrina
2019

ERICK KENJI NISHIO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MECANISMOS DE AÇÃO
DE NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Defesa da tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina
2019

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

N724a Nishio, Erick Kenji.
Atividade antibacteriana e mecanismos de ação de nanopartículas de ouro / Erick Kenji Nishio. - Londrina, 2019.
92 f.

Orientador: Gerson Nakazato.
Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Atividade antibacteriana - Tese. 2. Nanopartículas - Tese. 3. Mecanismo de ação - Tese. 4. Microrganismos multirresistentes - Tese. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

ERICK KENJI NISHIO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MECANISMOS DE AÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Defesa da tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Profa. Dra. Giovana Carolina Bodnar
Universidade Positivo – UP

Profa. Dra. Paula Signolfi Cyoia
Pitágoras

Londrina, 19 de setembro de 2019.

AGRADECIMENTO

Dedico um agradecimento especial à Universidade Estadual de Londrina, que começou a fazer parte da minha vida há exatos 10 anos, onde cursei Graduação, Especialização, Mestrado e agora, Doutorado.

Agradeço à todas as instituições públicas que tivemos parcerias, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Universidade Federal do ABC (UFABC).

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária, pelo financiamento deste trabalho.

Agradeço a todo povo brasileiro, que mesmo não tendo conhecimento, possibilitou o desenvolvimento de toda essa trajetória.

Dedico um grande agradecimento ao prof. Dr. Gerson Nakazato, que me recebeu pela primeira vez no Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada (LBBA - NIP3) em 2011, e desde então vem me orientando em todos os trabalhos e conquistas que alcancei durante a trajetória acadêmica.

Um agradecimento especial a prof^a. Dr^a. Renata Kobayashi, que foi durante todo esse percurso no LBBA, uma segunda orientadora e mentora de todos os momentos.

Agradeço à toda a equipe do LBBA - NIP3, pela convivência, colaboração, solidariedade e troca de experiências. Sem dúvidas os alunos ali presentes fazem toda a diferença, fazem o laboratório andar, e o tornam mais aconchegante.

Agradecimentos especiais ao prof. Dr. Celso Nakamura (UEM) por disponibilizar o uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão. Ao prof. Admilton de Oliveira (UEL) pela disponibilização Microscópio Eletrônico de Varredura. Ao prof. Dr. Sidney Lourenço e ao Ms. Neusmar Cordeiro (UTFPR) pela ajuda na síntese das nanopartículas. A profa. Dra. Amedea Seabra (UFABC) pela ajuda na caracterização das nanopartículas.

Agradeço a Sara Scandorieiro grande parceira da vida acadêmica de uma década, a Heloisa Martins pela parceria de laboratório e de encarar um novo desafio em outra área, e a Érica Figueiredo pelas conversas acadêmicas e emocionais.

Um agradecimento especial para Paula Cyoia, Vanessa Koga e Meiriele das Neves que ajudaram não somente dentro do laboratório, mas fora dele nos momentos de jogos, comidas, e muitas aventuras. Pode parecer algo fútil, mas em meio a tanta pressão e incerteza foi uma válvula de escape que nos manteve firmes.

Um grande agradecimento ao Tiago Porfirio que vem me ajudando em todos os momentos, sejam de felicidade ou de dificuldade. Sem dúvida muitas das conquistas se devem ao apoio dele.

Por fim, e talvez o mais importante agradecimento, à minha família. Aqui estou hoje graças aos meus pais, que fizeram de tudo para que eu conseguisse alcançar meus sonhos, chegar a lugares que eles não puderam chegar. Não há nenhuma pessoa que consiga focar em seus objetivos sem esse pilar tão importante nos apoiando. Portanto essa conquista é sem dúvidas de vocês também. Muito obrigado!

NISHIO, Erick Kenji. **Atividade antibacteriana e mecanismos de ação de nanopartículas de ouro**. 2019. 92 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, Brasil, 2019.

RESUMO

Os metais nobres têm um histórico de uso na medicina bastante antigo. Há relatos de uso desde 1.500 AC, no entanto deram lugar aos antibióticos após a grande descoberta da penicilina. Porém com a emergência de microrganismos multirresistentes, a busca por “novos antimicrobianos” tem levado pesquisadores a “antigos medicamentos”, como o ouro. Apesar de antigo, o ouro vem ganhando uma nova forma de destaque, a nanopartícula de ouro (AuNP). Neste estudo, foi avaliada a atividade antimicrobiana de AuNP quimicamente sintetizadas, bem como seus possíveis mecanismos de ação. A atividade antibacteriana foi testada frente a cepas Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo multirresistentes utilizando técnicas de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e curva de tempo e morte. Já as alterações na bactéria, internas e externas, foram avaliadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) respectivamente. Com relação a avaliação dos mecanismos que a AuNP age sobre a bactéria, foram testados permeabilidade de membrana, produção total de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, degradação de ácidos nucleicos e perfil de proteínas totais. Além disso, foi avaliada a citotoxicidade em células primárias (hemácias) e de linhagem (HEp-2). Os valores de CIM₅₀ foram de 0,05 µg/ml e de 1,56 µg/ml, para Gram-positivos e Gram-negativos, respectivamente. Para ambos os grupos, a AuNP apresentou efeito bactericida. Nas imagens de MEV observamos extravasamento de material citoplasmático, e na MET observamos acúmulo de AuNP na membrana e citoplasma, lise de membrana e liberação de vesículas de membrana externa, que podem estar relacionadas ao *quorum-sensing* ocasionando aglomeração das células bacterianas. Os ensaios de mecanismos mostraram desestabilização de membrana e permeabilidade, indução de EROs e consequente danos a proteínas, lipídeos e material genético. Já os ensaios de citotoxicidade mostraram uma concentração citotóxica (CC₅₀) de 2,12 µg/ml, e uma concentração hemolítica (HC₅₀) de 50,97 µg/ml. Esses resultados indicam um grande potencial bactericida das AuNP, agindo em vários alvos dentro da bactéria. O valor de CC₅₀ relativamente baixo, pode ser devido às propriedades antitumorais relatadas para as AuNP. Portanto, as AuNPs exibem um grande potencial para aplicação como antimicrobiano e controle de microrganismos multirresistentes.

Palavras-chave: Antimicrobianos, citotoxicidade, *quorum-sensing*, multirresistente.

NISHIO, Erick Kenji. **Antibacterial activity and mechanisms of action of gold nanoparticles**. 2019. 92 p. Thesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, Brasil, 2019.

ABSTRACT

Noble metals have a long history of use in medicine. They have been used since 1,500 BC until the great discovery of penicillin. However, with the emergence of multiresistant microorganisms, the search for “new antimicrobials” has led researchers to “old drugs”, as in the gold. Although old, gold has been gaining a new prominent form of gold nanoparticle (AuNP). In this study, we evaluated the antimicrobial activity of chemically synthesized AuNP, as well as its possible mechanisms of action. Antibacterial activity was tested against Gram-positive and Gram-negative, including multiresistant strains using microdilution techniques to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and time-kill curve. The internal and external changes in bacteria were evaluated by transmission electron microscopy (TEM) and scanning (SEM) respectively. Regarding the evaluation of the mechanisms that AuNP acts on the bacteria, membrane permeability, total production of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, protein carbonylation, nucleic acid degradation and total protein profile were investigated. In addition, cytotoxicity on primary (red blood cells) and lineage (HEp-2) cells was evaluated. The MIC₅₀ values were 0.05 µg/ml and 1.56 µg/ml for Gram-positive and Gram-negative, respectively. For both groups, AuNP had a bactericidal effect. In SEM images we observed cytoplasmic leakage, and in TEM we observed AuNP accumulation in the membrane and cytoplasm, membrane lysis and release of outer membrane vesicles, which may be related to *quorum-sensing* causing agglomeration of bacterial cells. Mechanism assays showed membrane destabilization and permeability, ROS induction and consequent damage to proteins, lipids and genetic material. Then the cytotoxicity assays showed a cytotoxic concentration (CC₅₀) of 2.12 µg/ml, and a hemolytic concentration (HC₅₀) of 50.97 µg/ml. These results indicate a large bactericidal potential of AuNP, acting on various targets within the bacterium. The relatively low CC₅₀ value may be due to the reported anti-tumor properties for AuNP. Therefore, AuNPs have great potential for antimicrobial application and of multiresistant microorganisms control.

Keywords: Antimicrobials, cytotoxicity, *quorum-sensing*, multiresistant.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	18
Tabela 2	28
Tabela 3	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	12
Figura 2	15
Figura 3	17
Figura 4	19
Figura 5	24
Figura 6	25
Figura 7	26
Figura 8	35
Figura 9	36

LISTA DE ABREVIATURAS

γ	Gamma
μg	Microgramas
16HBE	Células de epitélio bronquial
a	Massa
A549	Células de carcinoma
Abs	Absorbância
A.C.	Antes de cristo
Ag	Prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
As	Arsênio
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
Au	Ouro
AuCl ₂ ⁻	Dicloro aurato
AuCl ₃	Tricloreto de ouro
AuNP	Nanopartícula de ouro
b	Superfície
B.A.	Baixa atividade
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	butylated hydroxytoluene
C2C12	Mioblasto de rato
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CC ₅₀	Concentração citotóxica que inibe 50% das células
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CCE	Centro de Ciências Exatas
CFU	Colony Forming Unit
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CO ₂	Gás carbônico
CTAB	Brometo de cetiltirmetilamônio
Cu	Cobre
DAFIS	Departamento Acadêmico de Física

dH2O	Água deionizada
DLA	Linfoma de ascite de Dalton
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine
Dr	Doutor
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico dupla fita
DT	1-Dodecanetiol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramas
GNR	Gold Nanorod
h	Horas
HaCaT	Queranócitos humanos
HAuCl ₄	Ácido cloroáurico
HC ₅₀	Concentração hemolítica que lisa 50% das células
HCl	Ácido clorídrico
HEp-2	Células de carcinoma epitelial
HEPG-2	Carcinoma de fígado humano
Hg	Mercúrio
HSAB	Hard-Soft Acid Base
IVP	Infavermelha Próxima
J774	Macrófago de rato
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LAPA	Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária
LSP	Linfócitos de Sangue Periférico
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance
M	Molar

MCF7	Carcinoma de mama humano
MDA	malondialdehyde
MDR	Multidrug Resistant
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Magnésio
MGL	Modelo de Gota Líquida
MH	Mueller-Hinton
MHA	6-mercaptophexanoico ácido
MHB	Mueller-Hinton Broth
MIA	Membrane Integrity Assay
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
min	Minutos
ml	Miligramas
mm	Milímetros
MR	Multirresistente
MRSA	<i>S. aureus</i> metilicilina-resistente
MSC	Células-tronco primárias
MTB	Mercaptodecil Trimetilamonio Brometo
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
mV	Milivolt
N	Número de átomos
N	Nitrogênio
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
nm	Nanômetros
O	Oxigênio
°C	Graus celsius
OMV	outer membrane vesicles
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
PAA	Ácido poli-amico
PBS	phosphate buffered saline
PDI	Índice de polidispersidade
PEG	Polietilenoglicol

PEI	Polietilinoimina
pH	Potencial Hidrogeniônico
pMBA	p-mercaptobenzoico ácido
PR	Paraná
PSM	Phenomenological Shell Model
R	Raio
RAW	Macrófagos
RBC	Red Blood Cell
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Reactive Oxygen Species
rs	Raio de Wigner-Seitz
R-SH	Sulfidrina
S	Enxofre
s	Seconds
S.A.	Sem atividade
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SEM	Scanning Electron Microscopy
SERS	Espectroscopia Raman amplificada por superfície
SFT	Surfactina
SI	Selectivity Index
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	São Paulo
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico simples fita
TBA	thiobarbituric acid
TCA	Trichloroacetic acid
Te	Telúrio
TEM	Transmission Electron Microscopy
THP1	Macrófago humano
THPC	Cloreto de tetra-hidroximetil-fosfônio
Ti	Titânio
TPPMS	Monosulfonato de Tifenilfosfano
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UK	United Kingdom

USA	United States of America
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta Visível
v	Volume
VRE	<i>Enterococcus</i> vancomicina-resistente
w	Weight
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	RESISTÊNCIA BACTERIANA	17
2.2.	METAIS ANTIMICROBIANOS	19
2.3.	HISTÓRIA DO OURO	20
2.4.	NANOTECNOLOGIA	22
2.5.	SUPERFÍCIE E VOLUME.....	24
2.6.	GEOMETRIA	25
2.7.	NANOPARTÍCULAS DE OURO	26
2.8.	SÍNTESE	27
2.8.1.	Síntese Física	27
2.8.2.	Síntese Química	28
2.8.3.	Síntese Biológica	28
2.9.	PROPRIEDADES.....	29
2.10.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	31
2.11.	ATIVIDADE ANTITUMORAL	40
2.12.	OUTRAS APLICAÇÕES	41
3.	REFERÊNCIAS	44
4.	ARTIGO	53
5.	CONCLUSÃO	92

1 INTRODUÇÃO

Desde o descobrimento e aplicação dos primeiros antimicrobianos vêm surgindo cada vez mais cepas multirresistentes, devido à pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado dos antimicrobianos. Cepas multirresistentes torna o tratamento mais difícil, custoso, resultando na prolongação da enfermidade e alta mortalidade (O'NEIL, 2015). Além disso, cepas multirresistentes exigem administração de altas doses de medicamentos o que acaba resultando em intolerância à toxicidade. Frente a esses problemas iniciou-se a busca por estratégias alternativas para o tratamento dessas infecções (ASLAM et al., 2018).

Dentre as alternativas, com os avanços no campo da nanobiotecnologia principalmente envolvendo o preparo de materiais de tamanhos e formas específicas os materiais em nanoescala vêm ganhando um destaque como agente antimicrobiano (NAUSHAD; RAJENDRAN; GRACIA, 2019).

As nanopartículas apresentam em torno de 0.1 a 100 nm de dimensão sendo um intermediário entre os materiais a granel e estruturas moleculares ou atômicas. Enquanto os materiais a granel possuem propriedades físicas constantes, as nanopartículas possuem características físicas, químicas, elétricas, mecânicas, magnéticas, ópticas além de propriedades biológicas (PHAN; HAES, 2019).

As atividades das nanopartículas são influenciadas principalmente pelo seu tamanho, portanto manipulações em escala nanométrica podem alterar facilmente as propriedades tanto físicas, químicas e biológicas das nanopartículas (AZHARUDDIN et al., 2019).

Alguns metais são importantes para determinadas funções celulares não encontradas em moléculas orgânicas, sendo estes indispensáveis para a vida de todos os organismos. Porém tais metais cruciais podem ser letais para as células quando presentes em altas concentrações. Além disso, outros metais, ditos não essenciais, como prata (Ag), mercúrio (Hg) e telúrio (Te) são extremamente tóxicos para bactérias, apresentando atividade antimicrobiana. Partículas metálicas em escala nanométrica são interessantes devido à sua facilidade de síntese e modificação química. A diminuição do tamanho dos metais a granel para escalas

nanométricas é uma oportunidade para desenvolver uma nova classe de materiais altamente adaptáveis, combinado a uma rica diversidade de composições, estruturas, propriedades (LEMIRE; HARRISON; TURNER 2013).

Alguns trabalhos comprovam a atividade antimicrobiana de nanopartículas metálicas, mostrando a sua eficácia contra diversas cepas, incluindo multirresistentes (CARDOZO et al. 2013; BIASI-GARBIN et al. 2015; FIGUEIREDO et al., 2019; SCANDORIEIRO et al., 2016). Algumas nanopartículas antimicrobianas podem apresentar também propriedade carreadora, ou seja, para entrega de medicamentos sítio específico. Tais nanopartículas têm sido comprovada sua efetividade no tratamento de doenças infecciosas incluindo as causadas por microrganismos multirresistentes (SHAIKH et al., 2019).

Nanopartículas de ouro (AuNP) demonstraram atividade antibacteriana contra cepas de *Aeromonas liquefaciens*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (ROTIMI et al., 2019; SANTHAKUMAR; KOPERUNCHOLAN, 2019). Incluindo cepas multirresistentes como *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Enterococcus* vancomicina-resistente (VRE) (TRAN; PROSENC; FRANKO, 2018). É considerada uma das mais convenientes devido suas propriedades físicas, químicas e biológicas (baixa toxicidade, biodisponibilidade, biocompatibilidade e estabilidade) (ARYA et al., 2019).

O tamanho nanométrico destas partículas permite comunicações com várias biomoléculas sobre as superfícies e no interior das células de modo que podem ser decodificados e designados para várias propriedades físico-químicas e bioquímicas destas células. De igual modo, sua potencial aplicação em sistemas de entrega de medicamentos e de imagem não invasiva oferece várias vantagens sobre agentes farmacêuticos convencionais (LOPES et al., 2019).

Diante do cenário de crescente multirresistência dos microrganismos cada vez mais estudos estão sendo realizados para a busca de antimicrobianos alternativos. Portanto o objetivo do presente trabalho foi avaliar as AuNP como possíveis “novos” antimicrobianos de amplo espectro, com potencial de prevenção de emergência de cepas bacterianas resistentes, bem como avaliar seus mecanismos de ação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

O manejo de infecções microbianas no antigo Egito, Grécia e China é bem documentado. A era moderna de antibióticos começou com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928. Desde então, os antibióticos transformaram a medicina moderna, e salvaram milhões de vidas. Porém, logo após a descoberta da penicilina, os relatos de resistência não demorou a aparecer (Figura 1), a emergência de resistência aos antibióticos é uma questão complexa e multifatorial (VENTOLA, 2015).

Um exemplo disso é a resistência de *Staphylococcus* à penicilina, que foi identificada antes da produção em larga escala do primeiro antibiótico em 1943. Pesquisas mostram que a diversidade genética necessária para esse tipo de resistência se desenvolver, não poderia ter ocorrido no curto período, desde o início do uso da penicilina. Essa descoberta mostrou que as bactérias possuem genes de resistência localizados em seu genoma. O desenvolvimento da resistência bacteriana aos diferentes antimicrobianos é, portanto, um processo natural, e existiria com ou sem a intervenção humana (MOREHEAD; SCARBROUGH, 2018).

No entanto, desde a introdução da penicilina, a pressão seletiva do uso de antibióticos, permite que esses mecanismos adaptativos bacterianos acelerem a seleção de bactérias naturalmente resistentes (DUIJKEREN et al., 2018).

Para os médicos, e aqueles que viveram de perto a angústia de uma infecção causada por microrganismos multirresistentes (MR), como paciente ou ao cuidar de um ente querido, não há necessidade de provar a importância de se combater MR. No entanto, para a maioria das pessoas, a ameaça de MR pode parecer um risco distante e abstrato, se é que se tem conhecimento (O'NEIL, 2015).

De acordo com uma previsão realizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015, se a resistência não for controlada, até 2050 o mundo produzirá, entre 2 e 3,5% menos, em termos econômicos. E talvez o mais impactante, espera-

se que 10 milhões a mais de pessoas morram a cada ano. Atualmente cerca de 700 mil pessoas morrem por ano devido a infecções por MR.

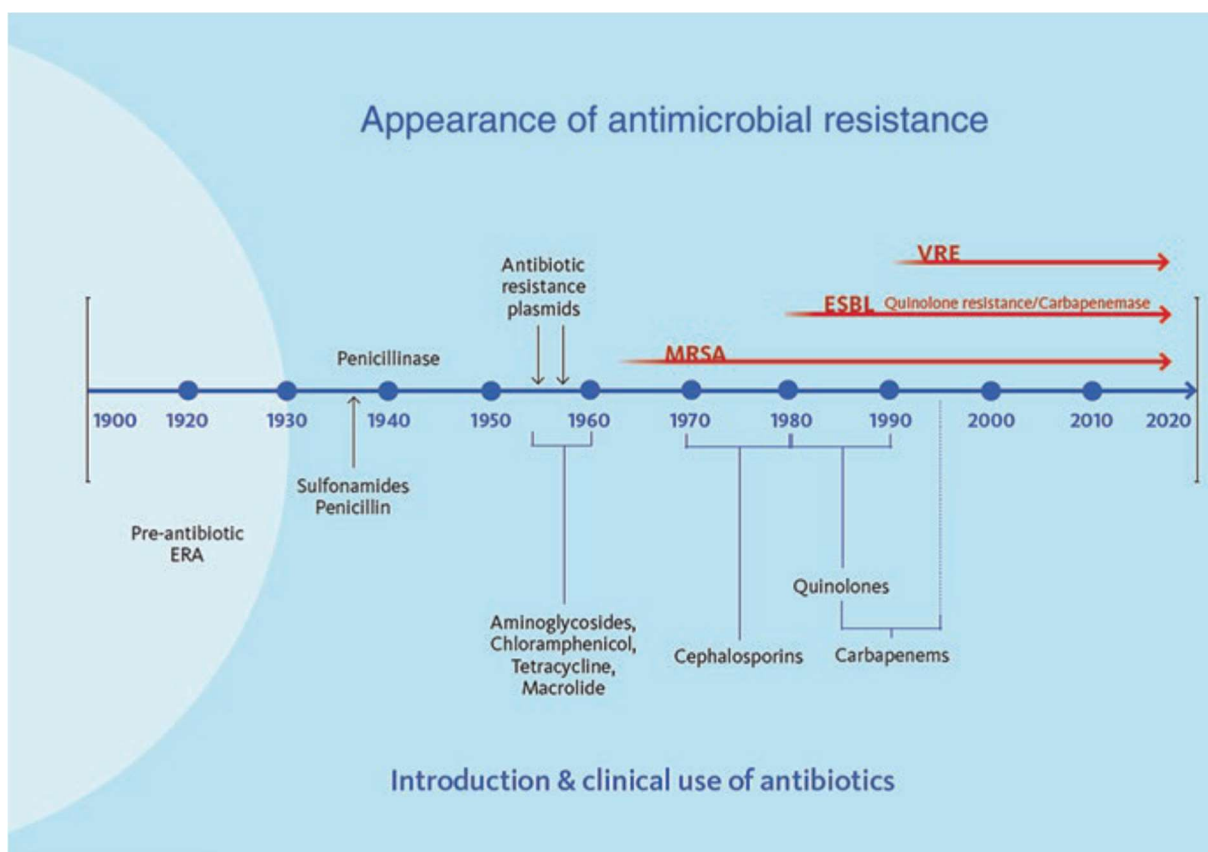


Figura 1. Linha de tempo do desenvolvimento de antibióticos e microrganismos resistentes. Fonte: FONG, 2018.

Apesar de sabermos que a resistência ocorre naturalmente nos microrganismos, o aumento no uso de antibióticos eleva as chances de seleção de populações microbianas cada vez mais resistentes. Duas tendências estão contribuindo para um crescimento global do consumo de antibióticos. Primeiro, o aumento da renda possibilita o acesso aos medicamentos. Isso está salvando vidas, mas também intensificando o uso - tanto racional quanto não racional - o que, por sua vez, está impulsionando a seleção. Segundo, o aumento da demanda por proteína animal e a consequente intensificação da produção de animais, está levando a um maior uso de antibióticos na pecuária, mais uma vez impulsionando a resistência (GELBAND et al., 2015).

Frente a essa situação, existem alguns caminhos a trilhar no intuito de controlar a situação: i) acompanhamento do uso de antibióticos em humanos e outros animais; ii) pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos; iii) intervenções para uso racionalizado de antimicrobianos (GELBAND et al., 2015).

2.2 METAIS ANTIMICROBIANOS

Os metais antimicrobianos também têm uma rica história de aplicação na medicina. O papiro de Edwin Smith - um antigo texto médico egípcio que remonta a 1.500 A.C., é o mais antigo tratado cirúrgico conhecido - é uma das primeiras obras escritas que documenta uso de um sal de cobre, como adstringente. Existem muitas aplicações históricas de prata em medicamento, incluindo o uso de suturas impregnadas com prata para reparar lesões vaginais após o parto, e o uso de nitrato de prata (AgNO_3) para prevenir infecções oculares por gonorreia em recém-nascidos, e o uso de folhas impregnadas com prata para prevenir a infecção de feridas cirúrgicas. Nos últimos dois séculos os médicos também usaram óxidos de Te, Mg e As, bem como sais de Cu e Hg, para tratar doenças como lepra, tuberculose, gonorreia e sífilis. O uso medicinal de metais perdurou até a descoberta da penicilina por Alexander Fleming na década de 1920, desde então as aplicações de metais rapidamente diminuiu. Agora, no início do século XXI, com a crescente ameaça de multirresistência e a escassez de novos antibióticos, o uso de metais antimicrobianos está ressurgindo (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

Os metais são capazes de inibir seletivamente as vias metabólicas, induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, e matar as bactérias multirresistentes. Assim como os antibióticos, os compostos metálicos são capazes de discernir entre alvos bacterianos e eucarióticos, entretanto, isso se deve às células que desviam os sistemas de transporte metálico e as metaloproteínas. Essa diferença diminui o uso de metais como material antibacteriano, bactericida e antibiofilme (GOLD et al., 2018).

2.3 HISTÓRIA DO OURO

Desde os primórdios, o brilho do ouro era relacionado à luz do sol, ao poder divino, a veículos de encantamentos e feitiços. Aqueles que usavam amuletos de ouro acreditavam que o ouro protegia a saúde do portador contra espíritos malignos ou feitiços, que poderiam causar doenças (HIGBY, 1982).

Durante a Idade Medieval, os alquimistas acreditavam na ideia do *elixir* da vida, que tinha o poder mágico de remover impurezas de metais, tornando-os o mais puro ouro, sendo capaz de prolongar a vida, e até mesmo de restaurar a juventude. Após estudos de destilação, passaram a produzir álcool e até mesmo ácidos minerais concentrados, como ácido clorídrico e nítrico, e que sua mistura chamada de *aqua regia*, era capaz de dissolver ouro. E acreditavam que o estudo dessa substância levaria à fórmula do *elixir* (HUTCHINGS; BRUST; SCHMIDBAUR, 2008).

O iconoclasta Arnald de Villanova (1235 - 1311) acreditava que o ser humano era um microcosmo, onde os planetas e seus metais correspondentes exerciam influência sobre partes do corpo humano. Especificamente do ouro dizia que possuía grande perfeição, estabilidade e influência celestial que representava o sol, e tais características tornavam o ouro uma substância limpa, e que possuía a capacidade de limpar o coração e a fonte da vida (HIGBY, 1982).

Arnald defendia o uso do ouro em forma consumível, no caso, ouro potável (*aurum potabile*). Porém por não conhecer a *aqua regia*, sua receita era colocar uma barra de ouro quente dentro do vinho por quatro a cinco vezes. Theophrastus von Hohenheim, mais conhecido como Paracelsus (1493 - 1541), trabalhava com um grande arsenal de remédios preparados quimicamente. Como médico iconoclasta, seguindo os passos de Arnald, prescrevia o *aurum potabile* para tratamento de melancolia, pois deixa o coração feliz (FAA et al., 2018).

Sucessores de Paracelsus chegaram a usar *aqua regia* produzindo sal solúvel $AuCl_3$. Muitos debates surgiram para discutir o valor e o perigo do uso de remédios preparados quimicamente (BLACKMAN; BINNS, 2009).

Apesar do grande fascínio dos alquimistas pelo ouro, devido à sua natureza inerte como material a granel, não permitia grandes possibilidades de novas

aplicações. Porém, com o advento de novas pesquisas foram descobrindo novas aplicações para o ouro (HUTCHINGS; BRUST; SCHMIDBAUR, 2008).

Robert Koch descobriu em 1890, que a solução de cianeto de ouro tinha a capacidade de inibir o crescimento do bacilo da tuberculose. Entretanto esta descoberta foi ignorada após o surgimento do Salvarsan, por Paul Ehrlich em 1910. Após esse acontecimento, o ouro passou a ser utilizado para o tratamento de tuberculose, até a comprovação da não eficácia (HIGBY, 1982).

Na década de 1920, acreditava-se que o bacilo da tuberculose causava artrite reumatoide, e o ouro passou a ser utilizado para o tratamento dessa doença. Em 1960, foi comprovado que o ouro apresentava valor significativo no tratamento de artrite reumatoide (HIGBY, 1982).

Em 1985 um medicamento a base de ouro, chamado Auranofina, foi aprovada para tratamento de artrite reumatoide. Tem seu perfil de toxicidade bem descrito e é considerado seguro para uso humano. Após a administração oral, 15 a 25% do fármaco pode ser detectado no plasma, onde se liga predominantemente à albumina. A maior parte é absorvida pelo trato gastrointestinal nos primeiros 20 minutos, em 1 a 2 h atinge um pico de concentração plasmática de 6 a 9 $\mu\text{g} / 100 \text{ ml}$. A meia-vida plasmática é de 15 a 25 dias, com eliminação quase total do corpo após 55 a 80 dias. A Auranofina é excretada principalmente nas fezes (85%) e urina (15%). Apenas 0,4% da dose administrada está concentrada nos rins (RODER; THOMSON, 2015).

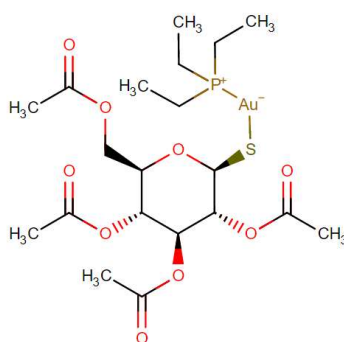


Figura 2. Estrutura química da Auranofina. Fonte: Auranofin, 2019

Embora compatíveis com linhagens celulares eucarióticas, as propriedades inertes do ouro não apresentam atividade antimicrobiana potente, a menos que sejam usadas em concentrações muito altas ou complexos iônicos (GOLD et al., 2018).

As técnicas de manipulação do ouro foram se desenvolvendo, principalmente após o relatório de Faraday em 1857, que descreveu uma solução com ouro finamente dividido. A motivação para o seu estudo foi devido a cor vermelha das partículas de ouro, um contraste marcante com o amarelo familiar do ouro em sua forma a granel. Depois de suas descobertas, a primeira metade do século XX, houve um crescimento constante do conhecimento no campo da ciência dos coloides. Porém, essa ciência das dimensões negligenciadas, como descrito por Wolfgang Ostwald, passou despercebida, até o advento da nanotecnologia nas últimas décadas do século XX (HEILIGTAG; NIEDERBERGER, 2013).

2.4 NANOTECNOLOGIA

A concepção de “nanômetro” foi proposta por Richard Zsigmondy, vencedor do prêmio Nobel em Química (1925). Utilizou o termo para caracterizar tamanho de partículas como coloides de ouro em microscópio. Porém a ideia de construir máquinas muito pequenas surgiu a partir de Richard Feynman, vencedor do prêmio Nobel em física (1965), em sua famosa palestra na Caltech em 1959 onde ele apresenta a ideia de manipulação a nível atômico. O termo nanotecnologia foi usado pela primeira vez por um pesquisador Norio Taniguchi, 15 anos depois para descrever processos nanométricos em semicondutores (HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

Em 2003, foi assinado nos EUA, a Lei de pesquisa e desenvolvimento de nanotecnologia do século XXI. Essa lei tornou a pesquisa em nanotecnologia prioridade nacional, e criou a Iniciativa nacional de nanotecnologia. Desde então a quantidade de trabalhos envolvendo nanotecnologia vem crescendo exponencialmente (ROCO, 2011) (Figura 3).

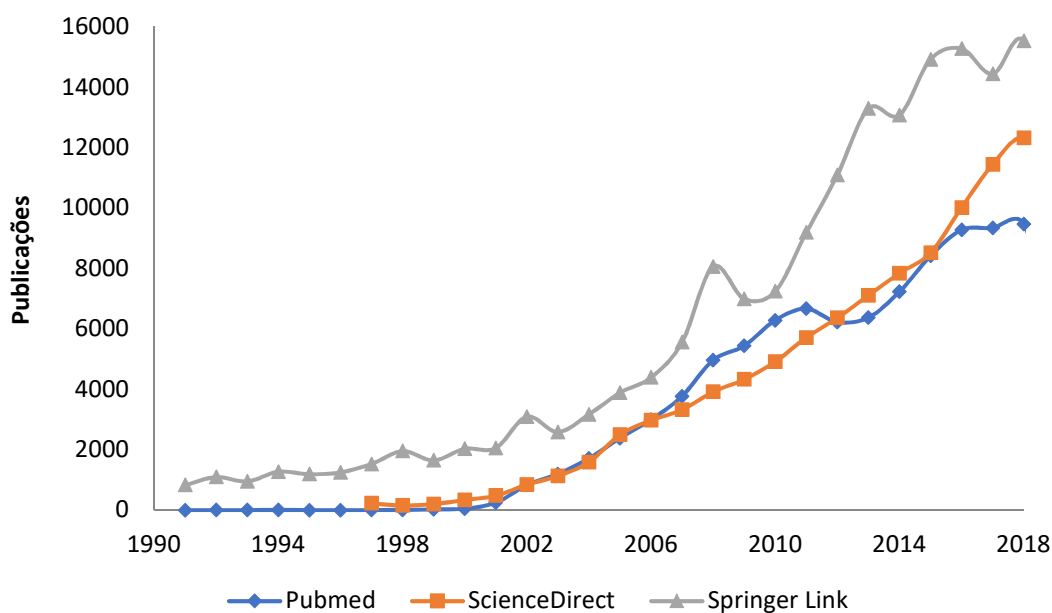


Figura 3. Gráfico de publicações envolvendo “nanotecnologia” ao longo dos anos de 1990 - 2018. FONTE: Autoria própria.

De acordo com Norio Taniguchi (1974) a “Nano-tecnologia” consiste principalmente no processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou por uma molécula. Atualmente é definida como o estudo de fenômenos na escala de 1–100 nm, embora seja conveniente aumentar o alcance um pouco nas duas extremidades. Nanotecnologia é a capacidade de criar, controlar e manipular objetos nessa escala com o objetivo de produzir novos materiais que possuam propriedades específicas (NSTC, 2000).

Partículas em nanoescala ou aglomerados podem ser formados da maioria dos elementos da tabela periódica, podendo ser classificados como metálicos, semicondutores, magnéticos, poliméricos, de acordo com seus constituintes. São caracterizados como homogêneos se eles contêm um único tipo de átomo, ou heterogêneo se compreenderem mais de um constituinte, além disso podem ser neutros ou carregados (ânions ou cátions) (BLACKMAN; BINNS, 2009).

Todas as substâncias, independentemente da composição, quando na faixa de tamanho inferior a 100 nm, apresentam novas propriedades. As nanopartículas metálicas são ótimos exemplos desse princípio. As propriedades ópticas, elétricas, mecânicas, magnéticas e químicas podem ser sistematicamente manipuladas

ajustando-se o tamanho, a composição e a forma dessa classe de materiais na escala de até 100 nm de comprimento (MIRKIN, 2005).

2.5 SUPERFÍCIE E VOLUME

Com relação à estimativa de tamanho dessas partículas, a descrição mais simples é o Modelo de Gota Líquida (MGL), onde considera-se a partícula como uma esfera homogênea com raio R , e cujo tamanho está relacionado ao número de átomos N (BLACKMAN; BINNS, 2009).

A relação é descrita na fórmula a seguir:

$$R = \frac{N^{1/3}}{r_s}$$

Onde r_s é o raio de Wigner-Seitz, da física do estado sólido. Definido como o raio de uma esfera cujo volume v é igual ao volume ocupado por um átomo no material a granel. Como exemplo, podemos observar a estimativa para uma partícula de cobre e ouro (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro ($2R$) de nanopartículas de cobre (Cu) e ouro (Au) baseada na fórmula do modelo de gota líquida (MGL).

N	$2R$ (nm)	
	Cu	Au
10^1	0,6	0,7
10^2	1,3	1,5
10^3	2,8	3,2
10^4	6,1	6,8
10^5	13,1	14,7
10^6	28,2	31,8
10^7	60,9	68,5
10^8	131,1	147,5

Fonte: Blackman; Binns, (2009).

Nanopartículas estão num estado de matéria intermediário entre os átomos e o estado sólido, com propriedades que dependem fortemente do tamanho, forma e material da partícula e também do seu ambiente. Uma representação simples da relação superfície/volume de uma partícula de tamanho N , temos:

$$x(N) = a + bN^{-1/3}$$

Onde o a refere-se a "massa" que está relacionada ao volume da partícula e b , refere-se a "superfície", que está relacionada a área de superfície (BLACKMAN; BINNS, 2009).

2.6 GEOMETRIA

Como podemos ver nos trabalhos com nanopartículas de ouro, existem descrição de diversas formas das nanopartículas sintetizadas, como esferas, bastões, cubos, caixas, estrelas, entre outros como podemos observar na Figura 4 (LOPES et al., 2019).

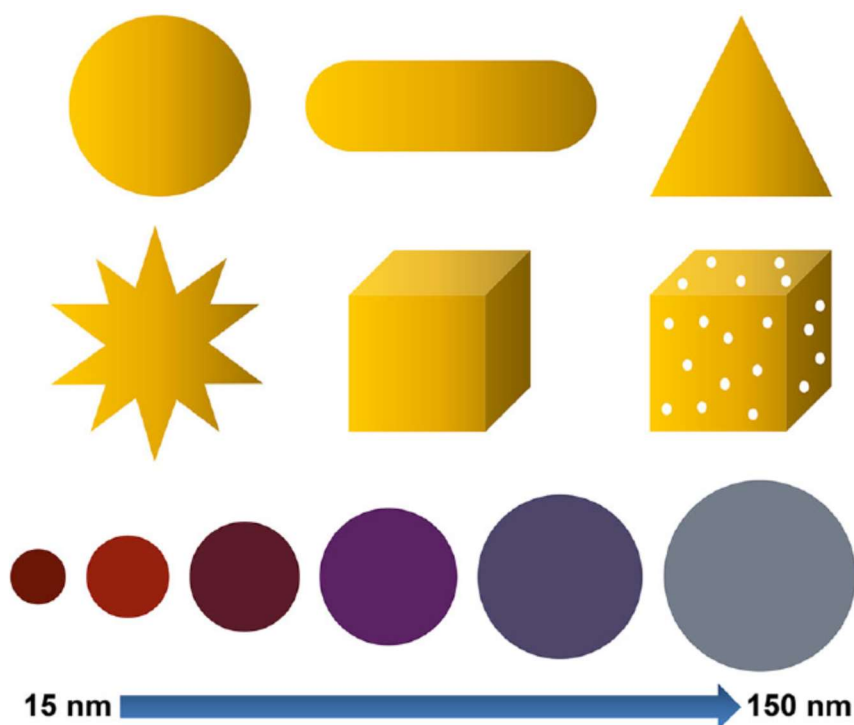


Figura 4. Imagens de diferentes formas de nanopartículas de ouro, e coloração conforme o tamanho. Fonte: LOPES et al. (2019).

As diversas geometrias das nanopartículas de ouro podem ser explicadas pelo modelo PSM (Phenomenological Shell Model). Nesse modelo a geometria depende do tamanho da nanopartícula, conseqüentemente da quantidade de átomos presentes, que influenciam as ligações nucleares e os elétrons da camada valente. Por exemplo, para uma partícula de ouro com 6 átomos, possui conformação é triangular, já partículas com 20 átomos apresentam conformação tetraédrica, e partículas com 58 átomos apresentam-se esféricas (NHAT et al., 2017).

2.7 NANOPARTÍCULAS DE OURO (AUNP)

Dentre os diversos tipos de nanopartículas, as aplicações potenciais de nanopartículas metálicas provaram ser as mais flexíveis devido à facilidade de síntese e controle sobre tamanho, forma, composição, estrutura e montagem. Isso resulta em sintonia fina de suas propriedades ópticas, que formam a base para várias aplicações. Entre todos os metais que são comumente usados para fazer nanopartículas, o ouro é um dos metais mais amplamente utilizado e estudado para aplicações biológicas (RAD; ABBASI; AFZALI, 2011; USMAN; AZIZ; SODIPO, 2019).

Diferente da sua forma a granel pouco reativa, ouro coloidal é considerado altamente reativo, permitindo novas aplicações. O ouro coloidal, também conhecido como nanopartículas de ouro, é uma suspensão (ou coloide) de partículas de ouro de tamanho nanométrico. As nanopartículas de ouro são comumente biocompatíveis, inertes, se ligam a várias biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos (GOYAL et al., 2019).

Atualmente, as AuNPs são amplamente utilizadas em aplicações de biologia molecular, como genômica, imunoenaios e química clínica, e aplicações médicas, como detecção e fototermólise de microrganismos e células cancerígenas, e administração direcionada de compostos, como peptídeos ou DNA. O tamanho de AuNPs governa as propriedades das nanopartículas e as aplicações para as quais

elas são usadas (MENON; RAJESHKUMAR; KUMAR, 2017; AZHARUDDIN et al., 2019).

2.8 SÍNTESE

Síntese de nanopartículas pequenas, monodispersas e com formas controladas é a chave principal na nanotecnologia. Existem duas classificações de síntese de nanopartículas: *top-down* (de cima para baixo) ou *bottom-up* (de baixo para cima). A primeira tem origem no material a granel e reduz o material a tamanhos nanométricos, porém é uma metodologia mais difícil de controlar as características das nanopartículas. Já a segunda tem origem em átomos ou moléculas para criar aglomerados em tamanhos nanométricos, essa metodologia é a mais utilizada, e envolve diferentes princípios: métodos físicos, químicos e biológicos (NASROLLAHZADEH et al., 2019).

Dentre os fatores importantes que influenciam a síntese, podemos destacar: o agente redutor, tempo de reação, temperatura, agente de encapsulamento/estabilizador e pH. Tais fatores controlam a forma geométrica e o tamanho das nanopartículas. Essas nanopartículas preparadas podem ser mantidas em solução ou secas e dispersas em qualquer solvente, sem agregação (SHAH et al., 2014).

2.8.1. Síntese Física

Os métodos físicos permitem o preparo de nanopartículas com facilidade e sem contaminação por agente de redução / encapsulamento, mas o controle da distribuição de seu tamanho parece ser ampliado devido aos processos de coagulação dos átomos. Uma das metodologias físicas utilizadas para síntese é a ablação a laser, onde o material a granel é colocado em solução e irradiado com pulsos de laser com alta repetição. A ablação a laser em meio líquido é um processo de múltiplos estágios com uma geometria intrinsecamente assimétrica, é possível identificar condições sintéticas descontínuas em direções longitudinais e

transversais, para o eixo de propagação do feixe (SCARAMUZZA; ZERBETTO; AMENDOLA, 2016).

Além destes, há métodos de pulverização, radiação γ , radiação ultravioleta (UV), micro-ondas, implantação de íons, entre outros (TRI et al., 2019).

2.8.2. Síntese Química

Uma das técnicas mais conhecidas para a síntese de AuNPs é baseada na redução de HAuCl_4 por citrato em água, que foi primeiramente projetado por Turkevich em 1951. Neste método, a solução de HAuCl_4 é fervida, e o citrato trissódico dihidratado é depois rapidamente adicionado à solução fervente, sob agitação vigorosa. Após alguns minutos, a cor da solução muda de amarelo claro para vermelho vinho. Este método resulta em AuNPs medindo cerca de 20 nm de diâmetro. Nesta técnica, os íons citrato desempenham um papel duplo, tanto como agentes estabilizadores quanto redutores (HERIZCHI et al., 2016; TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951).

Para a síntese, pode ser utilizado outros agentes redutores, agentes estabilizadores como podemos observar na Tabela 2. Além disso, as nanopartículas sintetizadas podem ser funcionalizadas dependendo da aplicação.

2.8.3. Síntese Biológica

Para a síntese de nanopartículas, houve um aumento no desenvolvimento de métodos saudáveis e ecológicos que não exigem a exploração de produtos químicos tóxicos (KANCHI; AHMED, 2018).

A síntese verde envolve fontes naturais como agentes redutores: fungos, bactérias, algas, vírus e plantas, entre os quais algas, são conhecidas como as “bio-nano fábricas”, pois são ambientalmente eficazes, acessíveis, são unicamente estruturadas, macroscópicas, e possuem alta capacidade de absorção de metal (MENON; RAJESHKUMAR; KUMAR, 2017).

2.9 PROPRIEDADES

As propriedades ópticas interessantes dessas nanopartículas de ouro são devidas à sua interação única com a luz. Na presença do campo eletromagnético oscilante da luz, os elétrons livres das nanopartículas metálicas sofrem uma oscilação em relação à rede metálica. Esse processo é ressonante em uma frequência específica da luz e é denominado de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR: Localized Surface Plasmon Resonance). Após a absorção, a ressonância plasmônica decompõe-se radiativamente, resultando em dispersão de luz, convertendo a luz absorvida em calor. Assim, para as nanoesferas de ouro com tamanho de partícula de cerca de 10 nm de diâmetro, tem-se um forte máximo de absorção em torno de 520 nm em solução aquosa devido ao seu LSPR. Essas nanoesferas mostram um deslocamento de pico de absorção com um aumento do seu tamanho, devido ao retardo eletromagnético em partículas maiores (LOUIS; PLUCHERY, 2012; MODY et al., 2010).

Além disso, as propriedades e aplicações das nanopartículas de ouro coloidal também dependem da sua forma. A Figura 5 mostra que a diferença na cor das soluções de partículas é maior para os bastões do que para as esferas. Por exemplo, as nanopartículas em forma de bastão têm duas ressonâncias: uma devido à oscilação plasmônica ao longo do eixo curto dos nanobastões e outra devido à oscilação plasmônica ao longo do eixo longo, que depende fortemente da proporção dos nanobastões, ou seja, relação comprimento-largura (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009; MODY et al.; 2010).

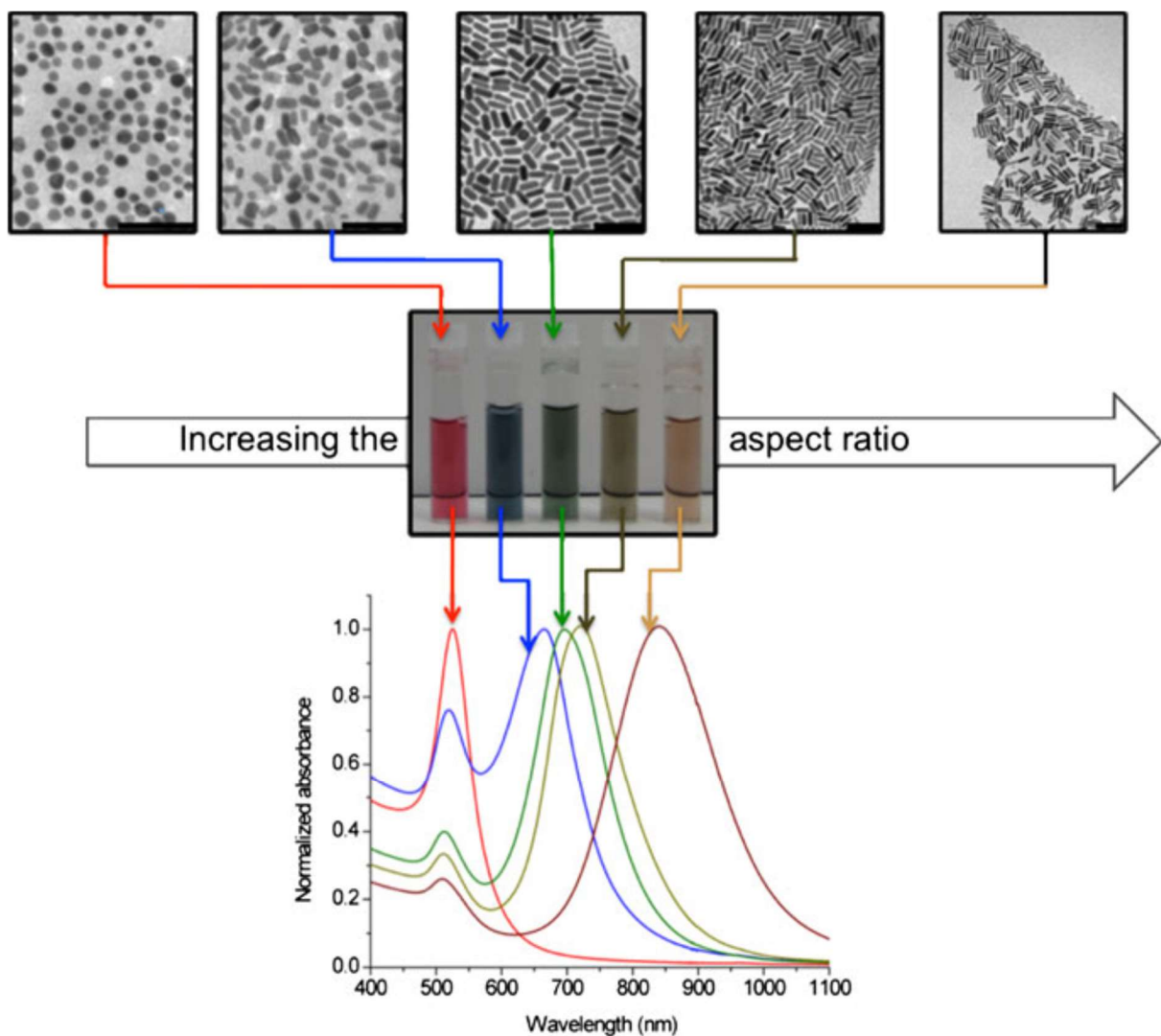


Figura 5. Ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) de diferentes formas e tamanhos de AuNP. Fonte: Alkilany; Murphy (2010).

Outra propriedade interessante das nanopartículas metálicas em geral é explicada pela Teoria ácido-base duro-mole (HSAB: Hard-Soft Acid Base), é outro conceito que é central para a reatividade dos metais. A classificação de HSAB, que foi determinado empiricamente, fornece uma ordem de metais de transição de acordo às suas preferências por ligantes orgânicos específicos (Figura 6).

Por exemplo, ácidos moles como Cu^+ , Ag^+ e Au^+ tendem a associar firmemente com bases moles, como a sulfidril (R-SH) grupos que são encontrados em proteínas. Conseqüentemente, a toxicidade antibacteriana destes metais é de

aproximadamente proporcional à sua afinidade por S (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

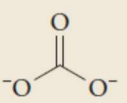
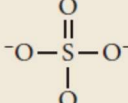
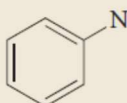
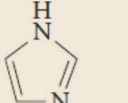
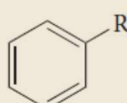

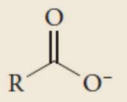
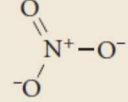
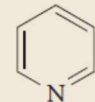
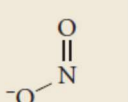


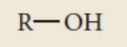

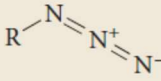

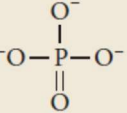

	Hard	Borderline	Soft
Acids	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cr ³⁺ , Al ³⁺ , Ga ³⁺ , Co ³⁺ , Fe ³⁺	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Bi ³⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Fe ²⁺	Cu ⁺ , Au ⁺ , Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Hg ⁺ , Cd ²⁺
Bases	 Carbonate  Sulphate	 Aniline  Imidazole	 Phenyl groups  Thiols
	 Carboxylates  Nitrate	 Pyridine  Nitrite	 Ethylene  Thioethers
	 Alcohols  Amines	 Azides Also: N ₂	 Cyanide Also: H ₂ S, H ₂ ⁻
	 Phosphate  Ethers Also: H ₂ O, OH ⁻ , NH ₃ , hydrazine		

Figura 6. Ilustração dos ligantes com base na Teoria ácido base duro-mole (HSAB: Hard-Soft Acid Base). Fonte: Lemire; Harrison; Turner (2013).

2.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os estudos das propriedades biológicas, entre elas a atividade antimicrobiana das AuNP vem crescendo com o passar dos anos. Podemos ver claramente o aumento de publicações quando buscamos, nos principais bancos de dados, por “nanopartículas de ouro” + “antimicrobiana” (Figura 7).

Tais estudos testaram AuNP sintetizadas por diferentes métodos, sejam químicos, físicos e biológicos, resultando em partículas de diferentes tamanhos, formas e conseqüentemente diferentes ações: antibacteriana, antifúngica, antiviral, como podemos constatar na tabela 2.

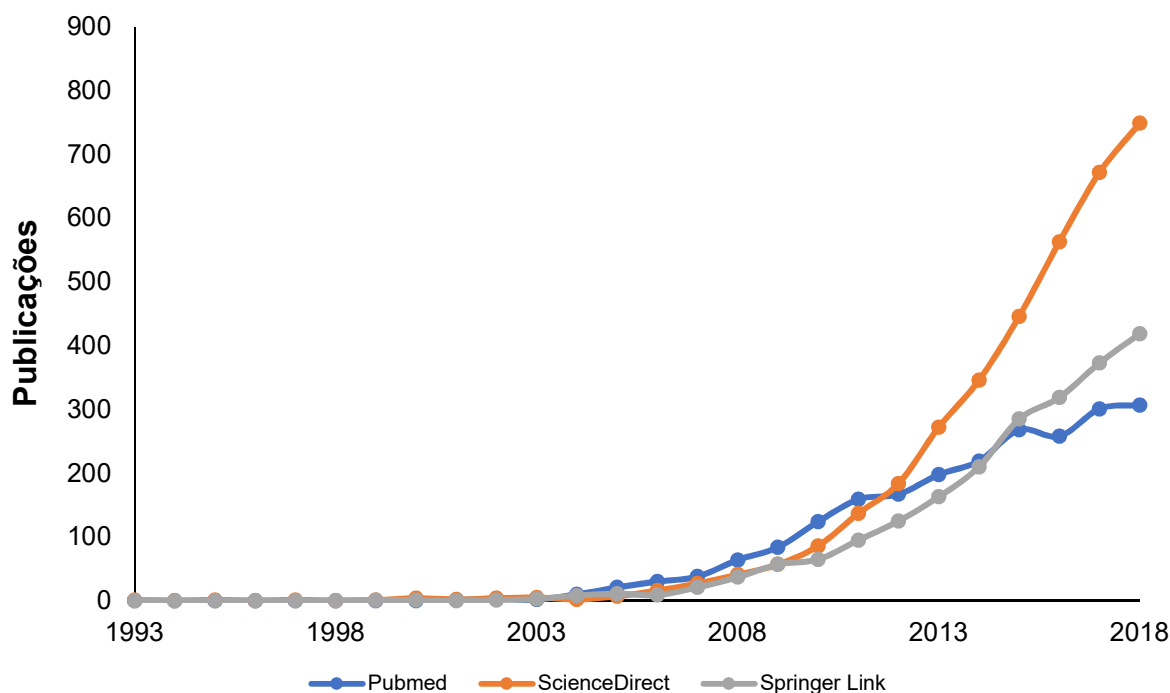


Figura 7. Gráfico de publicações envolvendo “nanopartículas de ouro” + “antimicrobiana” ao longo dos anos de 1993 - 2018. Fonte: Autoria própria.

Um assunto que vem sendo bastante discutido são as alterações na química da superfície e nas propriedades da AuNP, que podem alterar a atividade antimicrobiana. Li e colaboradores (2014) investigaram a relação estrutura-atividade entre uma biblioteca de ligantes usados para funcionalizar AuNP (núcleo de 2 nm). Através deste estudo, ficou evidente que a hidrofobicidade da superfície pode modular o efeito antimicrobiano da AuNP. Especificamente, as funcionalidades mais hidrofóbicas correlacionaram-se com um efeito antimicrobiano aumentado devido à natureza hidrofóbica das bactérias (como o tipo de dissolução). Além disso, houve forte correlação entre as interações bacterianas e as funcionalidades catiônicas. Juntos, demonstraram que as AuNP funcionalizadas catiônicas e hidrofóbicas são capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Alguns trabalhos testaram atividade de AuNPs funcionalizadas com antibióticos convencionais: AuNP + Vancomicina (GU et al., 2003); AuNP + Gentamicina (AHANGARI et al., 2013); AuNP + Amoxicilina (DEMURTAS; PERRY,

2014). No trabalho de Ahangari e colaboradores (2013), a AuNP apresentou um valor de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,19 $\mu\text{g/ml}$ enquanto AuNP + Gentamicina foi de 0,09 $\mu\text{g/ml}$ indicando uma melhoria na atividade.

Outros trabalhos com Hu e colaboradores (2017) avaliaram a atividade de AuNPs ativadas com luz IVP (Infravermelha Próxima). Os autores utilizaram AuNP catiônicas de 14 nm, que se agregam ao biofilme bacteriano (MRSA), e quando sob IVP converte a energia da luz em calor resultando em danos ao biofilme. Os autores também avaliaram a capacidade da nanopartícula em tratar infecções em modelo animal, confirmando a atividade antibacteriana e anti-inflamatória após 7 dias de tratamento.

Tabela 2. Relação de trabalhos envolvendo atividade antimicrobiana de nanopartículas de ouro dos últimos 5 anos.

Síntese	Tamanho (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI	Abs (nm)	Forma	Microrganismo	Halo de inibição (mm)	CIM (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	Observações	Referência
Biológicas											
<i>Aspergillus terreus</i>	10 - 50	--	--	535	Esféricas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA, MRSA), <i>Candida albicans</i>	S.A.	--	--	--	Balakumaran et al., 2016
<i>Hovenia dulcis</i>	15 - 20	--	--	536	Esféricas, hexagonais	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	18 - 19	--	--	--	Basavegowda; Idhayadhulla; Lee, 2014
<i>Dolichos biflorus</i>	6,93	--	--	530	Esféricas	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B.A.	--	--	--	Basu; Maji; Ganguly, 2016
<i>Nepenthes khasiana</i>	50 - 200	--	--	599	Esféricas, triangulares	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i>	8 - 16	--	--	--	Bhau et al., 2015
<i>Solanum lycopersicum</i>	14	--	--	546	Esféricas, triangulares	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	B.A.	--	--	--	Bindhu; Umadevi, 2014
<i>Embelia ribes</i>	10 - 30	--	--	560	Esféricas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>	22 - 34	--	100 (MCF-7); 64,3 (MCF7); 76,7 (HEPG-2); 433,2 (não tumoral?)	--	Dhayalan et al., 2016
<i>Streptomyces cyaneus</i>	6,5 - 20.0	--	--	550	Esféricas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>	26 - 39	1,25 - 6,25	--	--	El-Batal; Tamie, 2015
<i>Justicia glauca</i>	32,5	--	--	542	Hexagonais, esféricas,	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ,	9 - 17	6,25 - 25	--	--	Emmanuel et al., 2017

					prisma	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida albicans</i> <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacter aeruginosa</i> , <i>Trichoderma sp.</i>						
<i>Bipolaris tetramera</i>	58,4 - 261,73	--	--	570	Esféricas, triangulares, hexagonais	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Trichoderma sp.</i>	5 - 11	--	> 150 (J774, THP1)	--		Fatima et al., 2015
<i>Gloriosa superba</i>	20 - 50	--	--	538	Esféricas, triangulares	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	S.A.	--	--	--		Gopinath et al., 2016
<i>Panax ginseng</i>	5 - 10	--	--	540	Esféricas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	S.A.	--	> 100 (HDF, B16BL6)	--		Jiménez et al., 2017
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	30 - 60	--	--	540	Poligonais	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aspergillus niger</i>	9,5 - 12	--	--	Antioxidante		Joshi et al., 2017
<i>Punica granatum</i>	5 - 20	--	--	585	Esféricas, triangulares	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigates</i> , <i>A. brasiliensis</i>	--	0,31 - 0,41	62,5 (HeLa)	--		Lokina et al. 2014
<i>Nocardiosis sp.</i>	7 - 15	--	--	530	Esféricas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigates</i> , <i>A. brasiliensis</i>	15 - 21	--	300 (HeLa)	Antioxidante		Manivasagan et al., 2015
<i>Angelica pubescens</i>	10 - 30			540	Esféricas,	<i>Escherichia coli</i> ,	11,5 -		~ 100	Antioxidante		Markus et al.,

					icosaédricas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enterica</i>	15,6		(RAW264.7)		2017
<i>Trichoderma viride</i> , <i>Hypocrea lixii</i>	20 - 30	--	0,3 - 0,5	500 - 600	Esféricas	<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella sonnei</i>	--	25 %	--	Bacteriostático	Mishra et al., 2014
<i>Sargassum incisifolium</i>	5,35 - 66,13	-39,3 / - 56,3	0,16 - 0,55	530	Esféricas, triangulares, hexagonais	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Candida albicans</i>	0 - 5	--	> 5,39 mM (MCF-12a)	--	Mmola et al., 2016
<i>Lonicera japonica</i>	8,02	--	--	550	Esféricas, triangulares, hexagonais	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7 - 9	--	--	--	Nagajyothi; Lee; Sreekanth, 2014
<i>Catharanthus roseus</i>	46	-15,8	0,81	546	Esféricas, bastões, triangulares, hexagonais	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. utilis</i>	SA	SA	--	--	Nagaonkar; Rai, 2015
<i>Coleus forskoshlii</i>	15 - 40	-44,8	--	539	Esféricas, triangulares	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	11 - 21	--	--	--	Naraginti; Sivakumar, 2014
<i>Citrullus lanatus</i>	20 - 140	--	--	560	Esféricas	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	9,23 - 11,58	50	--	--	Patra; Baek, 2015
<i>Brassica oleracea</i>	12 - 22	--	--	560	Poligonais	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Candida albicans</i>	5 - 25	--	--	--	Piruthiviraj et al., 2016
<i>Abelmoschus esculentus</i>	13,6	--	--	538	Esféricas, triangulares,	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> ,	15 - 35	--	8,17 (Jurkat), 68,18 (LSP)	--	Rahaman Mollick et al.,

					hexagonais	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					2014
<i>Lansium domesticum</i>	140	--	--	538	Triangulares, hexagonais	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ,	--	S.A.	> 50 (C2C12)	--	Shankar et al., 2014
<i>Panax ginseng</i>	10 - 40	--	--	534	Esféricas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ,	S.A.	--	--	--	Singh et al., 2015
<i>Sporosarcina koreensis</i>	30 - 100	--	0,245	531		<i>Salmonella enterica</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	--	S.A.	--	--	Singh et al., 2016
<i>Spirulina platensis</i>	2 - 8	--	--	524	Esféricas	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	--	200	--	Bacteriostático	Suganya et al., 2015
<i>Plumbago zeylanica</i>	10 - 25	--	--	542	Esféricas	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Listeria spp.</i>	8 - 12	--	68,53 (DLA)	Antioxidante	Velammal; Devi; Amaladhas, 2016
<i>Zingiber officinale</i>	5 - 20	--	--	531	Esféricas, triangulares, hexagonais	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. bestiarum</i>	S.A.	S.A.	--	--	Velmurugan et al., 2014a
<i>Anacardium occidentale</i>	5 - 20	--	--	546	Esféricas, triangulares, poligonais	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>bacillus pumilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. niger</i>	11,2 - 12,6	294 - 386	--	--	Velmurugan et al., 2014b
<i>Indigofera tinctoria</i>	6 - 29	--	--	545	Esféricas, triangulares, hexagonais	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Salmonella enterica</i> ,	10 - 20	40 - 70	56,62 (A549)	Antioxidante	Vijayan; Joseph; Mathew, 2017
<i>Microbacterium resistens</i>	10 - 20	--	--	568	Esféricas		S.A.	--	--	--	Wang et al., 2016

<i>Malus domestica</i>	10 - 20	-20	--	535 - 555	--	<i>Staphylococcus aureus,</i> <i>Bacillus anthracis,</i> <i>Bacillus cereus,</i> <i>Escherichia coli, Candida albicans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans</i>	--	68 - >160 ppm	--	Antibiofilme	Yu et al., 2016
Químicas											
NaBH ₄ , TPPMS	10 - 17	--	--	520	Esféricas	<i>Staphylococcus aureus,</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12 - 15	25 µM	140 - 250 µM (?)	Bacteriostático	Boda et al., 2015
NaBH ₄ , pMBA	2	--	--	510	--	<i>Escherichia coli</i>	--	0,25 - 0,5 µM	50 µM (Hemácia)	Bactericida	Bresee et al., 2014
Citrato de sódio, PEG, Esc(1-21)	14	--	--	519	Esféricas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	5 nM	60 nM (HaCaT)	--	Casciaro et al., 2016
THPC, DT, STF	2 - 3	--	--	400	Esféricas	<i>Escherichia coli, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus</i> (MSSA, MRSA), <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	1 - 26	0,003 - 1 nM	> 1000 µM (Hemácia)	--	Chen et al., 2015
Citrato de sódio, pMBA, MTB	14	--	--	520 - 630	--	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	--	0,56 mM	--	Antibiofilme, ativação por IVP	Hu et al., 2017
DMF, PAA	5 - 50	--	--	510 - 535	Esféricas	<i>Escherichia coli, Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli, Enterobacter cloacae,</i>	S.A.	--	--	--	Kariuki et al., 2015
NaBH ₄ , Tolueno, Pentanetiol	2 - 6	--	--	532 - 545	Esféricas	<i>Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i>	--	8 - 64 nM	400 nM (Hemácia)	--	Li et al., 2014
Citrato de sódio, Ubiquidina/SDS	3 - 16	63 - 113,9	--	--	Esféricas	<i>Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa</i>	--	> 182*	--	--	Morales-Avila et al., 2017
Quitosana	14 - 38	--	--	525	Esféricas	<i>Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa</i>	--	--	250 - 714,3 (HaCaT, A549)	Bactericida	Regiel-Futyrta et al., 2014
NaBH ₄	15 - 30	--	--	521 - 524	Esféricas	<i>Escherichia coli, Staphylococcus aureus</i>	10 - 35	2,93 - 3,98	--	--	Shamaila et al., 2016

NaBH ₄ , Celulose, queratina	5,5	--	--	--	--	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA, MRSA), <i>Enterococcus</i> (VRE), <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	> 705 μmol	> 705 μmol (Fibroblastos)	Leve redução (0,5 - 1,5 log)	Tran; Proscenc, 2018
Citrato de sódio	10 - 20	-20	--	535 - 555	--	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>	--	75 - >160 ppm	--	Antibiofilme	Yu et al., 2016
MHA	2 - 6	-29,5 / -30,6	--	520 - 670	Esféricas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	2,5 - 82,5 μM (IC ₅₀)	> 0,5 mM (NCM460, HMVEC)	Leve redução (2 - 8%)	Zheng et al., 2017
Físicas											
Microondas, quitosana	13 - 15	--	--	530	Esféricas	<i>Escherichia coli</i>	--	--	--	--	Ehmann et al., 2015

?: Não informado; Abs: Absorbância; A549: Células de câncer de fígado; B.A. - Baixa atividade; C2C12: Mioblasto de rato; CC₅₀: Concentração citotóxica que inibe 50% das células; CIM: Concentração inibitória mínima; DLA: Linfoma de ascite de Dalton; DMF: dimetilformamida; DT: 1 Dodecanetiol; HaCaT: queranócitos humanos; HEPG-2: Carcinoma de fígado humano; IVP: Infravermelho próximo; J774: Macrófago de rato; LSP: Linfócitos de Sangue Periférico; MCF7: Carcinoma de mama humano; MHA: 6-mercaptopentanoico ácido; MTB: mercaptodecil trimetilamonio brometo; PAA: Ácido poli-amico; PDI: Índice de polidispersidade; PEG: polietilenoglicol; PEG: Polietilenoglicol; PEI: Polietilinoimina; pMBA: p-mercaptopbenzoico ácido; RAW: Macrófagos; S.A. - Sem atividade; SDS: Dodecil Sulfato de Sódio; SFT: Surfactina; THP1: Macrófago humano; THPC: Cloreto de tetra-hidroximetil-fosfônio; TPPMS: Monosulfonato de Tifenilfosfano;

2.11 ATIVIDADE ANTITUMORAL

Tumores sólidos são angiogênicos e requerem vascularização para o crescimento. A angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir dos existentes, desempenha um papel importante no crescimento e disseminação do câncer. Novos vasos sanguíneos “alimentam” as células cancerígenas com oxigênio e nutrientes, permitindo que essas células cresçam, invadam tecidos próximos, se espalhem para outras partes do corpo e formem tumores sólidos (BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2019).

As AuNP são ideais para explorar atividade anti-tumoral devido a vários fatores: (i) biocompatibilidade de AuNP foi confirmada por vários experimentos *in vitro* e *in vivo* e uso ao longo da história da civilização; (ii) é fácil sintetizar e caracterizar devido à presença da banda de ressonância plasmônica de superfície; e mais importante, (iii) o ouro sendo um ácido mole, é conhecido por se ligar fortemente a bases moles como tióis. O ouro também se liga moderadamente com as funcionalidades da amina (TENGDÉLIUS et al., 2015; TIWARI et al., 2011).

Wang e colaboradores (2011) testaram nanobastões de ouro (GNR - *gold nanorod*) funcionalizadas com Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e proteínas séricas, contra células de carcinoma (A549) e células de epitélio bronquial (16HBE) e células-tronco primárias (MSC). Em todas as células as GNRs foram absorvidas por endocitose, e entraram em endossomos e lisossomos (Figura 8).

Nas células A549, as GNRs passaram dos endossomos/lisossomos para o citoplasma e posteriormente para mitocôndrias à medida que a internalização prosseguia. Sugere-se que a saída das GNRs dos lisossomos em A549 foi devido à destruição da integridade da membrana lisossomal. O acúmulo mitocondrial de GNRs gradualmente prejudica as membranas mitocondriais e impede sua exclusão das células. O dano mitocondrial induzido pela GNR aumentou o nível de EROs em células A549, resultando em apoptose celular (WANG et al., 2011).

Em contraste, o tráfego intracelular nas células 16HBE e MSC foi bastante diferente das células A549. Depois que os GNRs entraram nas células, a maioria das GNRs permaneceu em endossomos / lisossomos dentro de 72 h de incubação. Nas células MSC, a maioria das GNRs foi excretada das células após 72 h. Os autores descreveram que as células cancerígenas e a membrana lisossomal destas, são mais sensíveis (cerca de 20x) ao CTAB presente nas GNRs, comparado às células normais. Esses achados esclarecem o desenho de nanomateriais direcionados a organelas na terapia do câncer (WANG et al., 2011).

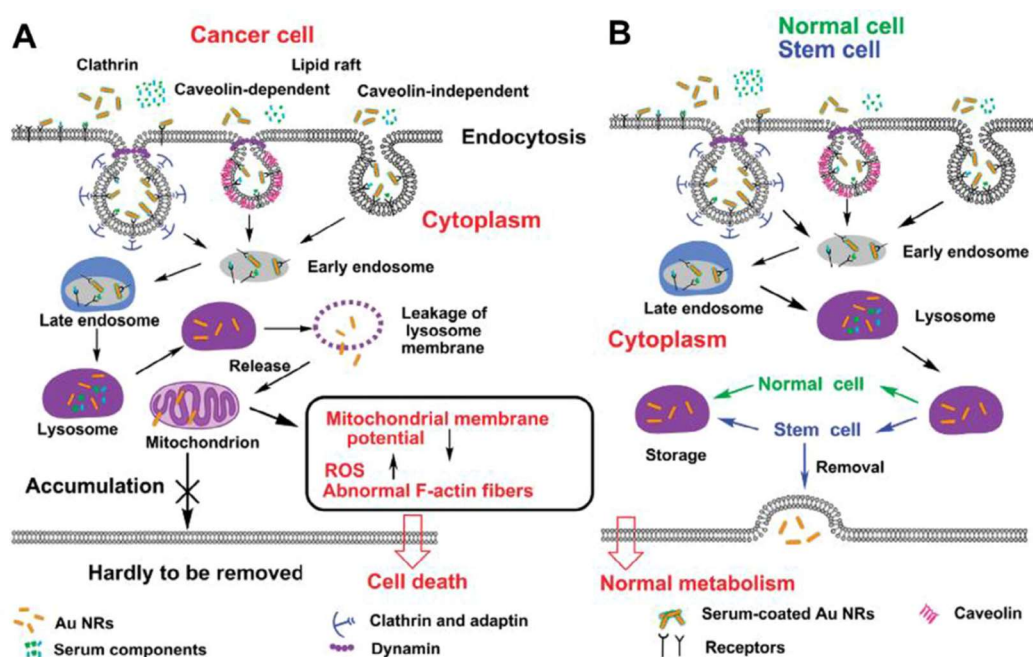


Figura 8. Representação das nanopartículas de ouro em células tumorais e não tumorais. A- Destino das AuNP em células tumorais; B- Destino das AuNP em células não tumorais. Fonte: Zhou et al. (2017).

2.12 OUTRAS APLICAÇÕES

Nanopartículas fluorescentes ou baseadas em AuNP têm boa biocompatibilidade para imagens moleculares de muitas enzimas e metabólitos (GUPTA; XIE, 2018; KHAN et al., 2014). Uma técnica inovadora denominado 'nariz químico' foi desenvolvida usando conjugados de AuNP e fluoróforos, que fornece detecção de alta sensibilidade de alvos biomoleculares. Este método

foi utilizado para diferenciação rápida e precisa entre células normais, cancerígenas e metastáticas (Figura 9) (MIRANDA; CRERAN; ROTELLO, 2010).

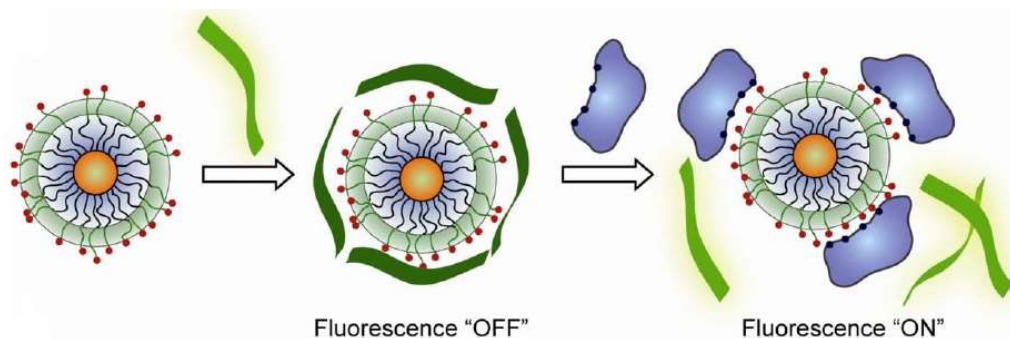


Figura 9. AuNP conjugada com polímeros fluorescentes para sensor. Fonte: Miranda; Creran; Rotello (2010).

A eficiência como sensor das AuNP depende da sua LSPR, com comprimentos de onda em torno de 510 - 530 nm para nano ouro formulações de em torno de 4 - 40 nm, que pode ser usado como bio-sensores. A ligação de moléculas na superfície da partícula muda o LSPR, que é refletido pela luz difusa microscopia de campo escuro. Além disso, a LSPR é drasticamente alterada quando a distância média entre as partículas de ouro altera durante a formação de agregados coloides de ouro. Este atributo dos AuNP tem sido utilizado, por exemplo, para a detecção de DNA, aproveitando a ligação afinidade de ds-DNA em sua superfície. AuNP conjugadas com oligonucleotídeos que são complementares a sequência alvo aparece como uma solução vermelha na ausência de a sequência alvo, enquanto na presença do alvo a hibridação ocorre e a solução muda para violeta / azul. Esta abordagem foi implementada com sucesso para a detecção de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), dímeros de DNA induzidos por UV e na detecção do RNA do vírus da hepatite C de isolados clínicos (AZHARUDDIN et al., 2019).

As AuNPs têm atraído a atenção como agente de contraste de raios-x, pois representa um alto coeficiente de absorção de raios X, facilidade de manipulação sintética, não toxicidade e funcionalização de superfície para estabilidade coloidal. Agentes de contraste vascular comuns tais como

moléculas iodadas apresentam alta solubilidade em água e baixa toxicidade. No entanto, o tempo de circulação sanguínea é curto e é rapidamente eliminado pelos rins. Portanto, uma janela de imagem curta pode exigir injeções múltiplas com risco de desenvolver disfunção tireoidiana. O desenvolvimento de uma janela de imagem devido ao maior tempo de retenção vascular comparado com agentes comuns é a consequência de propriedades significativas das AuNPs (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018).

As aplicações das AuNP são tantas que existem empresas como a BBI, que comercializa soluções de AuNP de diferentes tamanhos e volumes, com diferentes aplicações (Tabela 3).

Tabela 3. Nanopartículas de ouro comercializadas com área de aplicação e função por faixa de tamanho.

Faixa de tamanho	Área de aplicação	Função
Pequeno (2 nm - 15 nm)	Imuno-histoquímica; Microscopia óptica; Microscopia eletrônica de transmissão (MET); Biomarcador;	Detecção Anticorpo/Antígeno; Biomarcadores para imagem e sensor;
Médio (20 nm - 60 nm)	Ensaio de fluxo lateral Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e MET; Biomarcador; Espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS); Detecção de DNA;	Detecção de patógenos alimentares; Bactéria no sangue Narcóticos; Biomarcadores clínicos e veterinários;
Grande (80 nm - 250 nm)	Citometria de fluxo; SERS; Ciência forense;	Detecção de células CD4 (Citometria de fluxo); Biomarcadores clínicos (espectroscopia Raman).

Fonte: BBI, 2019.

3 REFERÊNCIAS

AHANGARI, A. et al. Development of gentamicin-gold nanospheres for antimicrobial drug delivery to Staphylococcal infected foci. **Drug Delivery**, v. 20, n. 1, p. 34–39, 2013.

ALKILANY, A. M.; MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 7, p. 2313–2333, 2010.

ARYA, S. S. et al. Vanillin mediated green synthesis and application of gold nanoparticles for reversal of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Heliyon**, v. 5, n. 7, p. e02021, 2019.

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

AURANOFIN. DrugBank. 2019. Disponível em:
<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00995>>. Acesso em: 01 set. 2019.

AZHARUDDIN, M. et al. A repertoire of biomedical applications of noble metal nanoparticles. **Chemical Communications**, v. 55, n. 49, p. 6964–6996, 2019.

BALAKUMARAN, M. D. et al. Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. **Microbiological Research**, v. 182, p. 8–20, 2016.

BASAVEGOWDA, N.; IDHAYADHULLA, A.; LEE, Y. R. Phyto-synthesis of gold nanoparticles using fruit extract of *Hovenia dulcis* and their biological activities. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 745–751, 2014.

BASU, S.; MAJI, P.; GANGULY, J. Biosynthesis, characterisation and antimicrobial activity of silver and gold nanoparticles by *Dolichos biflorus* Linn seed extract. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 11, n. 8, p. 660–668, 2016.

BBI, Solutions. **Gold nanoparticle applications**. Disponível em:
<<https://www.bbisolutions.com/technical-support/gold/applications.html>> Acesso em: 31/08/2019.

BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1289–1306, 2008.

BHAU, B. S. et al. Green synthesis of gold nanoparticles from the leaf extract of *Nepenthes khasiana* and antimicrobial assay. **Advanced Materials Letters**, v. 6, n. 1, p. 55–58, 2015.

BIASI-GARBIN, R. et al. Effect of eugenol against *Streptococcus agalactiae* and synergistic interaction with biologically produced silver nanoparticles. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

- BINDHU, M. R.; UMADEVI, M. Silver and gold nanoparticles for sensor and antibacterial applications. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 37–45, 2014.
- BLACKMAN, J.A.; BINNS, C. **Introduction**. In: Metallic nanoparticles. Hungary: Elsevier, 2008.
- BODA, S. K. et al. Cytotoxicity of Ultrasmall Gold Nanoparticles on Planktonic and Biofilm Encapsulated Gram-Positive Staphylococci. **Small**, v. 11, n. 26, p. 3183–3193, 2015.
- BRESEE, J. et al. Nanoscale structure-activity relationships, mode of action, and biocompatibility of gold nanoparticle antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 14, p. 5295–5300, 2014.
- CARDOZO, V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2013.
- CASCIARO, B. et al. Gold-nanoparticles coated with the antimicrobial peptide esculentin-1a(1-21)NH₂ as a reliable strategy for antipseudomonal drugs. **Acta Biomaterialia**, v. 47, p. 170–181, 2017.
- CHEN, W. Y. et al. Self-Assembly of Antimicrobial Peptides on Gold Nanodots: Against Multidrug-Resistant Bacteria and Wound-Healing Application. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 46, p. 7189–7199, 2015. DAVID, I. W. F.;
- DEMURTAS, M.; PERRY, C. C. Facile one-pot synthesis of amoxicillin-coated gold nanoparticles and their antimicrobial activity. **Gold Bulletin**, v. 47, n. 1–2, p. 103–107, 2014.
- DHAYALAN, M. et al. In vitro antioxidant, antimicrobial, cytotoxic potential of gold and silver nanoparticles prepared using *Embelia ribes*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 4, p. 465–468, 2017.
- DUIJKEREN, E. et al. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, 2018.
- EHMANN, H. M. A. et al. Gold nanoparticles in the engineering of antibacterial and anticoagulant surfaces. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 34–42, 2015.
- ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537–556, 2018.
- EL-BATAL, A. I.; TAMIE, M. S. S. A. Research Article Biosynthesis of gold nanoparticles using Marine *Streptomyces cyaneus* and their antimicrobial, antioxidant and antitumor (*in vitro*) activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 7, p. 1020–1036, 2015.

EMMANUEL, R. et al. Antimicrobial efficacy of drug blended biosynthesized colloidal gold nanoparticles from *Justicia glauca* against oral pathogens: A nanoantibiotic approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 295–302, 2017.

FAA, G. et al. Gold - Old Drug with New Potentials. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 75–84, 2017.

FATIMA, F. et al. Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera*. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2015.

FIGUEIREDO et al. New approach for simvastatin as antibacterial: synergistic effect with bio-synthesized silver nanoparticles against multidrug resistant bacteria. **International Journal of Nanomedicine**, 2019. (*in press*)

FONG, I.W. Introduction: Coordinated global action is needed to combat antimicrobial resistance. In: FONG, I.W.; SHLAES, D.; KARL, D. **Antimicrobial Resistance in the 21st**. 2 ed. Switzerland: Springer, p. 1-775.

GELBAND, H. et al. The state of the world's antibiotics 2015. **Wound Healing Southern Africa**, v. 8, n. 2, p. 30-34, 2015.

GOLD, K. et al. Antimicrobial Activity of Metal and Metal-Oxide Based Nanoparticles. **Advanced Therapeutics**, v. 1, n. 3, p. 1700033, 2018.

GOPINATH, K. et al. Green synthesis of silver, gold and silver/gold bimetallic nanoparticles using the *Gloriosa superba* leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 1–11, 2016.

GOYAL, D. et al. Green synthesis of anisotropic gold nanoparticles using cinnamon with superior antibacterial activity. **Materials Research Express**, v. 6, n. 7, 2019.

GU, H. et al. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. **Nano Letters**, v. 3, n. 9, p. 1261–1263, 2003.

GUPTA, A.; LANDIS, R. F.; ROTELLO, V. M. Nanoparticle-based antimicrobials: surface functionality is critical. **F1000Research**, v. 5, 2016.

GUPTA, R.; XIE, H. Nanoparticles in daily life: applications, toxicity and regulations. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 37, n. 3, 2018

HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**, v. 16, n. 7–8, p. 262–271, 2013.

HERIZCHI, R. et al. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 596–602, 2016.

HIGBY, G. J. Gold in medicine - A review of its use in the west before 1900. **Gold Bulletin**, v. 15, n. 4, p. 130–140, 1982.

HU, D. et al. Surface-Adaptive Gold Nanoparticles with Effective Adherence and Enhanced Photothermal Ablation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm. **ACS Nano**, v. 11, n. 9, p. 9330–9339, 2017.

HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M. A. Gold nanorods: From synthesis and properties to biological and biomedical applications. **Advanced Materials**, v. 21, n. 48, p. 4880–4910, 2009.

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

HUTCHINGS, G. J.; BRUST, M.; SCHMIDBAUR, H. Gold-an introductory perspective. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 1759–1765, 2008.

JIMÉNEZ PÉREZ, Z. E. et al. Ginseng-berry-mediated gold and silver nanoparticle synthesis and evaluation of their in vitro antioxidant, antimicrobial, and cytotoxicity effects on human dermal fibroblast and murine melanoma skin cell lines. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 709–723, 2017.

JOSHI, C. G. et al. Biogenic synthesis of gold nanoparticles by marine endophytic fungus-*Cladosporium cladosporioides* isolated from seaweed and evaluation of their antioxidant and antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, v. 63, p. 137–144, 2017.

KANCHI, S.; AHMED, S. **Green metal nanoparticles**. USA: Wiley. 2018. p. 1-694

KARIUKI, V. M. et al. Synthesis and catalytic, antimicrobial and cytotoxicity evaluation of gold and silver nanoparticles using biodegradable, π -conjugated polyamic acid. **Environmental Science: Nano**, v. 2, n. 5, p. 518–527, 2015.

KHAN, A. K. et al. Gold nanoparticles: Synthesis and applications in drug delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 7, p. 1169–1177, 2014.

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, 2013.

LI, X. et al. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. **ACS Nano**, v. 8, n. 10, p. 10682–10686, 2014.

LOKINA, S. et al. Spectroscopic investigations, antimicrobial, and cytotoxic activity of green synthesized gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 129, p. 484–490, 2014.

LOPES, T. S. et al. Advances and potential application of gold nanoparticles in nanomedicine. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. March, p. 1–9, 2019.

LOUIS, C; PLUCHERY, O. **Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology**. London: Imperial College Press, 2012.

MANIVASAGAN, P. et al. Extracellular synthesis of gold bionanoparticles by *Nocardiosis* sp. and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 6, p. 1167–1177, 2015.

MARKUS, J. et al. Biosynthesis, Characterization, and Bioactivities Evaluation of Silver and Gold Nanoparticles Mediated by the Roots of Chinese Herbal *Angelica pubescens* Maxim. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, n. 1, 2017.

MENON, S.; S., R.; S., V. K. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, n. 4, p. 516–527, 2017.

MIRANDA, O. R.; CRERAN, B.; ROTELLO, V. M. Array-based sensing with nanoparticles: “Chemical noses” for sensing biomolecules and cell surfaces. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 6, p. 728–736, 2010.

MIRKIN, C. A. The beginning of a small revolution. **Small**, v. 1, n. 1, p. 14–16, 2005.

MISHRA, A. et al. Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 235–242, 2014.

MMOLA, M. et al. Enhanced antimicrobial and anticancer activity of silver and gold nanoparticles synthesised using *Sargassum incisifolium* aqueous extracts. **Molecules**, v. 21, n. 12, 2016.

MODY, Vicky V. et al. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282, 2010.

MORALES-AVILA, E. et al. Antibacterial Efficacy of Gold and Silver Nanoparticles Functionalized with the Ubiquicidin (29-41) Antimicrobial Peptide. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, 2017.

MOREHEAD, M. S.; SCARBROUGH, C. Emergence of Global Antibiotic Resistance. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 45, n. 3, p. 467–484, 2018.

NAGAJYOTHI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Biogenic synthesis of gold nanoparticles (quasi-spherical, triangle, and hexagonal) using *Lonicera japonica* flower extract and its antimicrobial activity. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1011–1018, 2014.

NAGAONKAR, D.; RAI, M. Sequentially reduced biogenic silver-gold nanoparticles with enhanced antimicrobial potential over silver and gold monometallic nanoparticles. **Advanced Materials Letters**, v. 6, n. 4, p. 334–341, 2015.

NARAGINTI, S.; SIVAKUMAR, A. Eco-friendly synthesis of silver and gold nanoparticles with enhanced bactericidal activity and study of silver catalyzed reduction of 4-nitrophenol. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, p. 357–362, 2014.

NASROLLAHZADEH, M. et al. **An Introduction to Nanotechnology**. In: HUBBARD, A.T. Advanced low-cost separation techniques in interface science. 2 ed. London: Elsevier, 2019.

NAUSHAD, M.; RAJENDRAN, S.; GRACIA, F. **Advanced Nanostructured Materials for Environmental Remediation**. Switzerland: Springer, 2019. v. 28. p. 1-391

NHAT, P. V. et al. Another look at structure of gold clusters Au_n from perspective of phenomenological shell model. **Chemical Physics**, v. 493, p. 140–148, 2017.

NSTC (NATIONAL SCIENCE & TECHNOLOGY COUNCIL). **National Nanotechnology Initiative: Leading To the Next Industrial Revolution**. A Report by the Interagency Working Group on Nanoscience, Engineering and Technology, Committee on Technology, National Science and Technology Council. n. February, p. 205–212, 2000.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, n. December, p. 1–16, 2016.

PATRA, J. K.; BAEK, K. H. Novel green synthesis of gold nanoparticles using *Citrullus lanatus* rind and investigation of proteasome inhibitory activity, antibacterial, and antioxidant potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7253–7264, 2015.

PHAN, H. T.; HAES, A. J. What Does Nanoparticle Stability Mean? **Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, p. 16495–16507, 2019.

PIRUTHIVIRAJ, P.; MARGRET, A.; KRISHNAMURTHY, P. P. Gold nanoparticles synthesized by *Brassica oleracea* (Broccoli) acting as antimicrobial agents against human pathogenic bacteria and fungi. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 6, n. 4, p. 467–473, 2016.

PRIYA VELAMMAL, S.; DEVI, T. A.; AMALADHAS, T. P. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of silver and gold nanoparticles synthesized using *Plumbago zeylanica* bark. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 247–260, 2016.

RAD, A. G.; ABBASI, H.; AFZALI, M. H. Gold nanoparticles: Synthesising, characterizing and reviewing novel application in recent years. **Physics Procedia**, v. 22, p. 203–208, 2011.

RAHAMAN MOLLICK, M. M. et al. Anticancer (in vitro) and antimicrobial effect of gold nanoparticles synthesized using *Abelmoschus esculentus* (L.) pulp extract via a green route. **RSC Advances**, v. 4, n. 71, p. 37838–37848, 2014.

REGIEL-FUTYRA, A. et al. Development of noncytotoxic chitosan-gold nanocomposites as efficient antibacterial materials. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 2, p. 1087–1099, 2015.

ROCO, M. C. The long view of nanotechnology development: The National Nanotechnology Initiative at 10 years. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 2, p. 427–445, 2011.

RODER, C.; THOMSON, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. **Drugs in R and D**, v. 15, n. 1, p. 13–20, 2015.

ROTIMI, L. et al. Synthesis, characterization, antimalarial, antitrypanocidal and antimicrobial properties of gold nanoparticle. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 12, n. 1, p. 61–68, 2019.

SANTHAKUMAR, M.; KOPERUNCHOLAN, M. Gold nano drug design for antimicrobial activity. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences**. v. 5, n. 720, p. 720–731, 2019.

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.

SCARAMUZZA, S.; ZERBETTO, M.; AMENDOLA, V. Synthesis of gold nanoparticles in liquid environment by laser ablation with geometrically confined configurations: Insights to improve size control and productivity. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 17, p. 9453–9463, 2016.

SHAH, M. et al. Gold nanoparticles: Various methods of synthesis and antibacterial applications. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 19, n. 8, p. 1320–1344, 2014.

SHAIKH, S. et al. Mechanistic Insights into the Antimicrobial Actions of Metallic Nanoparticles and Their Implications for Multidrug Resistance. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 1–15, 2019.

SHAMAILA, S. et al. Gold nanoparticles: An efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. **Nanomaterials**, v. 6, n. 4, p. 1–10, 2016.

SHANKAR, S. et al. Synthesis, characterization, in vitro biocompatibility, and antimicrobial activity of gold, silver and gold silver alloy nanoparticles prepared from *Lansium domesticum* fruit peel extract. **Materials Letters**, v. 137, p. 75–78, 2014.

SINGH, P. et al. Extracellular synthesis of silver and gold nanoparticles by *Sporosarcina koreensis* DC4 and their biological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 86, p. 75–83, 2016.

SINGH, P. et al. The development of a green approach for the biosynthesis of silver and gold nanoparticles by using *Panax ginseng* root extract, and their biological applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 1150–1157, 2016.

SUGANYA, K. S. et al. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. **Materials Science and Engineering C**, v. 47, p. 351–356, 2015.

TANIGUCHI, Norio. On the basic concept of “nano-technology”. In: **Proceedings of the International Conference on Production Engineering, 1974-8**. Japan Society of Precision Engineering, 1974. p. 18-23.

TENGDELIUS, M. et al. Synthesis and anticancer properties of fucoidan-mimetic glycopolymer coated gold nanoparticles. **Chemical Communications**, v. 51, n. 40, p. 8532–8535, 2015.

TIWARI, P. et al. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 1, n. 1, p. 31–63, 2011.

TRAN, C. D.; PROSENC, F.; FRANKO, M. Facile synthesis, structure, biocompatibility and antimicrobial property of gold nanoparticle composites from cellulose and keratin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 510, p. 237–245, 2018.

TRI, P. N. et al. Methods for synthesis of hybrid nanoparticles. In: **Noble Metal-Metal Oxide Hybrid Nanoparticles**. Woodhead Publishing, 2019. p. 51-63.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. c, p. 55–75, 1951.

USMAN, A. I.; AZIZ, A. A.; SODIPO, B. K. Application of central composite design for optimization of biosynthesized gold nanoparticles via sonochemical method. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 5, p. 1–9, 2019.

VELAMMAL, S. P.; DEVI, T. A.; AMALADHAS, T. P. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of silver and gold nanoparticles synthesized using *Plumbago zeylanica* bark. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 247-260, 2016.

VELMURUGAN, P. et al. Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Zingiber officinale* root extract and antibacterial activity of silver nanoparticles against food pathogens. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 10, p. 1935–1943, 2014.

VELMURUGAN, P. et al. Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using Cashew Nut Shell Liquid and Its Antibacterial Activity Against Fish Pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 196–202, 2014.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: causes and threats. **P & T journal**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.

VIJAYAN, R.; JOSEPH, S.; MATHEW, B. *Indigofera tinctoria* leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles and assessment of their anticancer, antimicrobial, antioxidant and catalytic properties. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 861–871, 2018.

WANG, C. et al. Characterization and antimicrobial application of biosynthesized gold and silver nanoparticles by using *Microbacterium resistens*. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 1714–1721, 2016.

WANG, L. et al. Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: Implications for cancer therapy. **Nano Letters**, v. 11, n. 2, p. 772–780, 2011.

YU, Q. et al. Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells. **Scientific reports**, v. 6, n. March, p. 26667, 2016.

ZHENG, K. et al. Antimicrobial gold nanoclusters. **ACS nano**, v. 11, n. 7, p. 6904–6910, 2017.

ZHOU, J. et al. Functionalized gold nanorods for nanomedicine: Past, present and future. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 352, p. 15-66, 2017.

4 ARTIGO

Gold nanoparticle: antibacterial, cytotoxicity and mechanism of action

Erick Kenji Nishio¹, Neusmar Junior Artico Cordeiro², Sidney Alves Lourenço³, Celso Vataru Nakamura⁴, Renata Katsuko Takayama Kobayashi¹, Gerson Nakazato^{1*}.

¹Department of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná - Brazil.

²Department of Physics, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná - Brazil.

³Department of Physics, Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Londrina, Londrina, Paraná - Brazil.

⁴Departament of Basic Helth Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná - Brazil.

***Corresponding author:** Gerson Nakazato, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86055-990, Londrina, PR, Brazil, Phone: +55(43) 3371-4396, Fax: +55 (43) 3371-4788, e-mail: gnakazato@uel.br.

Abstract

Despite the clear evidence of the emergence and rapid spread of multidrug resistant (MDR) bacteria, the development of new antibiotics has not followed this rhythm. In this scenario, nanotechnology has been growing, due to applications as antimicrobial. We synthesized gold nanoparticle chemically and tested their antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria showing low minimal inhibitory concentration (MIC) values 0.05 and 2.17 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively, rapid decrease in bacterial population (2 h), low cytotoxicity selectivity index of 32 to 1019 and success in protection against infection in *Galleria mellonella* model. Gold nanoparticles showed action at various points in bacteria (outer and internal membrane, proteins, genetic material), including interference in expression and *quorum-sensing*. This fact makes the nanoparticles possible candidates for clinical use against MDR. In addition, it helps to better clarify the mechanisms involved in the action against bacteria.

Keywords: Multidrug resistant bacteria; Nanotechnology; Gold nanoparticle; Antibacterial; Mechanism.

BACKGROUND

Currently around 700,000 people die each year from multiresistant bacterial infections, by 2050 this number will outweigh the deaths from cancer, reaching a 10 million deaths a year, causing a \$ 100 billion loss to the economy [1]. Among the multiresistant bacteria that are listed as priorities for the research and development of new antibiotics are *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, among others [2].

Despite the clear evidence of the emergence and rapid spread of multiresistant bacteria, the development of new antibiotics has not followed this rhythm [3]. In the midst of this scenario, nanotechnology has been growing, and among the areas of nanotechnology, nanobiotechnology is considered one of the most promising due to applications in diagnostics, materials, bioengineering and as an antimicrobial [4,5].

It is known that there are innumerable ways of synthesizing nanoparticles, metallic, metal oxides, with different physicochemical properties such as shape, size and curvature. Such properties influence how the particles will be internalized by the cells and their biological properties [4].

Several studies have reported different antimicrobial activity and suggestions of mechanisms of action of these nanoparticles, either by releasing ions that have high affinity with N, O, S atoms of biomolecules and generation of ROS that causes damage to membrane lipids, proteins and genetic material [6-9].

However, variations in properties, missing or inaccurate information lead to divergent results [10]. Therefore, we performed and emphasize in our work the

importance of a complete study since characterization, activity, toxicity, mechanism of action for synthesized gold nanoparticles.

METHODS

Bacterial strains

In this study were used 14 reference bacterial strains from American Type Culture Collection (ATCC), *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Clostridium perfringens* ATCC 3624, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076, *S. enterica* Typhimurium ATCC 13311, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *S. mutans* ATCC 25175, *S. pyogenes* ATCC 19615. In addition, three clinical isolates were used *E. coli* ESBL 169, *K. pneumoniae* KPC01 (both provide by Dr. Eliana Carolina Vespero, Hospital Universitário de Londrina, Londrina - PR, Brazil) *S. aureus* MRSA BEC 9393 (provided by Dr. Agnes Marie Sá Figueiredo Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, Brazil). All strains were kept in BHI broth (Brain Heart Infusion) (BD Difco, USA) with 20% glycerol (Sigma-Aldrich, USA) at -80 °C.

Gold nanoparticle (AuNP) synthesis

For the synthesis, 0.01M HAuCl₄ (Sigma-Aldrich, USA) solution, 0.1M CTAB (Sigma-Aldrich, USA) and 0.01M NaBH₄ (Sigma-Aldrich, USA) were used under stirring for 10 min, then allowed to stand at 27 ° C for 2 hours, following the methodology described by Jana and colleagues [11] modified. After the synthesis, the material was washed three times in an ultracentrifuge (Himac CP-MX, Hitachi) at the Agricultural Research Support Laboratory (LAPA - UEL),

at a rotation of 30,000 g for 1 h. The standardization of gold nanoparticle synthesis was carried out in partnership with the Laboratory of Optics and Optoelectronics - CCE, UEL (Londrina, PR) and orientation of Dr. Sidney Alves Lourenço - DAFIS, UTFPR (Campus - Londrina, PR).

To confirm the synthesis absorption measurements were taken at 300-800 nm wavelengths using UV-Vis spectrophotometer (Multiskan Go Thermo Scientific). The nanoparticles synthesized were characterized by size, by Dynamic Light Scattering (DLS), ZetaSizer NanoZS (Malvern, UK), in the laboratory of Dr. Amedea Barozzi Seabra - Federal University of ABC, Santo André - SP, Brazil and Transmission Electron Microscopy (TEM) (JEOL JEM-1400 Electron Microscope) in laboratory of Dr. Celso Vataru Nakamura - Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR, Brazil.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

Bacterial strains MIC determination was performed according to the methodology recommended by CLSI [12]. Bacteria previously cultured on Mueller-Hinton (MH) agar (BD Difco, USA) were diluted in MH broth to obtain 5×10^5 CFU ml⁻¹ (Colony Forming Units) in 96-well plates. The AuNP was placed in the first row of the plate, from which the serial microdilution process was then performed in order to obtain concentrations ranging from 0.012 to 100 µg ml⁻¹. The plate was incubated at 37 °C for 24 h and the optical density values were determined at 600 nm on spectrophotometer.

Time kill curve

Time kill curve was performed according to the methodology proposed by NCCLS [13]. The bacteria (*E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923) previously cultured on MH agar were diluted in MH broth to obtain 5×10^5 CFU ml^{-1} . The AuNP was added at MIC concentration and incubated at 37 °C. Aliquots were taken and plated on MH agar to determine the CFU mL^{-1} at different incubation times (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 h).

Cytotoxicity assay in lineage cells

HEp-2 lineage cells were cultivated in 96-well plates in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA) at a cell density of approximately 2.5×10^5 cells well^{-1} and incubated for 24 h until reaching 90 - 100% confluency. Non-adherent cells were removed by washing with phosphate buffered saline (PBS). DMEM medium containing different concentrations of AuNP (1.562 to $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) was then added and incubated for 24 h at 37 °C under 5% CO_2 atmosphere. Cell viability was analyzed using the MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, USA) following the manufacturer's recommendations. The 50% inhibitory concentration of viable cells (CC_{50}) was determined by linear regression [14].

Cytotoxicity assay in primary cells

The hemolytic activity of the AuNP was determined following the methodology of Scandorieiro and colleagues [15]. Blood was collected in tubes containing

heparin (Vacutainer) from healthy human donor (approved by human ethics committee - CAAE 47661115.0.0000.5231, No. 1.268.019 - UEL). Red blood cells (RBC) were separated by centrifugation at 5000 g for 5 min at 4 °C and diluted in PBS buffer at a concentration of 6% (v v⁻¹). The diluted RBC were plated in 96-well plates with different concentrations of the AuNP and incubated for 3 h at 37 °C under an atmosphere containing 5% CO₂. The supernatant was then transferred and read at 550 nm in a spectrophotometer. As control of hemolysis, 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) was used.

***Galleria mellonella* larvae assay**

Bacterial infection of *G. mellonella* was performed according to Yang and colleagues [16] with modifications. The overnight (24 h) bacterial culture (*E. coli* ATCC 25922) in MHB (10⁹ CFU ml⁻¹) was washed three times with PBS by centrifugation at 7,000 g for 5 min, and then diluted to an appropriate cell density. We inoculated PBS only as negative control, PBS + bacteria as positive control, PBS + AuNP as toxicity control, bacteria + AuNP as treatment, 5 µl aliquots were injected to each larva via last proleg with 10 µl Hamilton syringe. After injection, larvae were incubated in dark at 37 °C for 5 days, and the number of dead larvae was scored daily.

Membrane integrity assay (MIA)

The alteration in membrane permeability was evaluated by dye assay using Bengal rose, according to Halder and colleagues [17] with some modifications. The overnight (24 h) bacterial culture (*E. coli* ATCC 25922) in MHB (10⁹ CFU

ml⁻¹) was washed twice with PBS by centrifugation at 7000 g for 5 min. The bacteria pellet was resuspended with saline 0.85 % (Control) and saline containing AuNP 1x MIC (Treatment), after 1 h of incubation at 37 °C. After incubation samples were centrifuged at 9,300 g for 5 min, then 0.001% Bengal rose in PBS was added to bacterial pellet and incubated at 37 °C for 10 min. After incubation, samples were centrifuged at 13,400 g for 15 min and supernatant was transferred and absorbance measured at 590 nm.

Extracellular ATP determination assay

The measurement of extracellular ATP concentrations was performed using ATP determination kit according manufacturer's protocol (Invitrogen, USA). *E. coli* (ATCC 25922) suspension (Control and Treatment) prepared as same as used in MIA and was plated in 96-well plate with ATP standard reaction solution (dH₂O, reaction buffer, dithiothreitol - DTT, D-luciferin, luciferase). The fluorescence emission was measured by fluorescence spectroscopy (Perkin Elmer VICTOR³) for 1 h.

Cellular leakage measurement

The evaluation of cellular leakage content was performed according to Imelda and colleagues [18] with modifications. *E. coli* (ATCC 25922) suspension (Control and Treatment) prepared as same as used in MIA after 1 h of incubation at 37 °C was centrifuged at 7,000 g for 5 min and supernatant was collected to absorbance measurement at 260 and 280 nm using NanoDrop LITE (Thermo Scientific).

Detection of reactive oxygen species (ROS)

The total production of ROS by *E. coli* (ATCC 25922), with and without AuNP treatment was evaluated using total reactive oxygen species assay kit according manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific, USA). The overnight (24 h) bacterial culture (10^9 CFU ml⁻¹) was washed two times with PBS by centrifugation at 7,000 g for 5 min. The bacteria pellet was resuspended in ROS assay buffer containing 1x ROS Assay Stain, incubated at 37 °C during 1 h, washed two times with PBS, and resuspended in PBS. The resuspended bacteria was plated on 96-well plate with saline 0.85 % (Control) and saline containing AuNP 1x MIC (Treatment). The fluorescence emission was measured by fluorescence spectroscopy (Perkin Elmer VICTOR³) with excitation / emission at 490 nm / 520 nm, for 1 h every 15 min.

Lipid peroxidation assay

The production of MDA was measured using lipid peroxidation (MDA) assay kit according to manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, USA). *E. coli* (ATCC 25922) suspension (Control and Treatment) was prepared as same as used in MIA and incubated at 37 °C for 1 h. Cultures were pelleted, and homogenized with MDA lysis buffer containing butylated hydroxytoluene (BHT), centrifuged at 7000 g, 5 min, supernatant was incubated at 95 °C for 1 h with thiobarbituric acid (TBA). The samples were cooled to room temperature in an ice bath for 10 min and plated in 96-well plate and analyzed by spectrophotometry (Thermo Scientific Multiskan GO) at 532 nm.

Preparation of cell extracts

Initially, *E. coli* (ATCC 25922) suspension (Control and Treatment), was prepared as same as used in MIA, it was pelleted, resuspended in lysis buffer (Tris-HCl pH 8.0, containing 1% SDS) and boiled at 100 °C during 5 min to lysis cells. The crude extracts were centrifuged at 4°C 13,000 g for 10 min, supernatant was separated and added equal volume of ice-cold acetone and incubated at -20 °C for 1 h to precipitate protein. The extract was centrifuged (4°C 13,000 g, 10 min), discarded supernatant and let dry at room temperature. The pellet was resuspended in Tris pH 8.0 containing Triton X-100 0.1%. To quantify protein content of cell extract, Bradford reagent was used according manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, USA).

Protein carbonyl assay

The protein carbonyl amount was measured using protein carbonyl content assay kit according manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, USA). The cell extract was treated with streptozocin to cleavage nucleic acids, and incubated at room temperature for 15 min, then centrifuged (13,000 g, 5 min). Supernatant was transferred and added 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) then, incubated at room temperature for 10 min. Added TCA (Trichloroacetic acid) solution vortex and incubated on ice for 5 min, then centrifuged (13,000 g, 2 min), removed supernatant, added ice-cold acetone and sonicated for 30 s. Incubated at -20 °C for 5 min, and centrifuged (13,000 g, 2 min). Supernatant was discarded and added 6 M guanidine and sonicated briefly, the samples was

transferred to 96-well plate and analyzed by spectrophotometry (Thermo Scientific Multiskan GO) at 375 nm.

DNA degradation assay

The evaluation of *E. coli* (ATCC 25922) DNA integrity was performed according to Chatterjee and colleagues [19] with modifications. Bacterial suspension (control and treatment), was prepared as same as used in MIA and was pelleted by centrifugation (7,000 g, 5 min), the total DNA content was extracted using PureLink Genomic DNA kits (Thermo Fisher Scientific, USA), according to manufacturer's Gram-negative bacterial cell lysate protocol (Invitrogen, USA). From each treatment (control and treatment), DNA was isolated and submitted to electrophoresis for 2 h, in 0.8 % (w v⁻¹) agarose gel, using Tris-borate-EDTA buffer.

SDS PAGE

E. coli (ATCC 25922) suspension (control and treatment), was prepared as same as used in MIA and was pelleted by centrifugation (7,000 g, 5 min). The supernatant and pellet were separated. Supernatant protein was precipitated using ice-cold acetone, similar to described in cell extract preparation. Thus, loading buffer (5% β -mercaptoethanol 5% SDS in Tris pH 6.8) (Sigma-Aldrich, USA), was added to both pellet and supernatant protein and the mixture was heated at 100 °C for 5 min. These extracts were subjected to SDS-PAGE electrophoresis on vertical slabs gel. Polyacrylamide (Sigma-Aldrich, USA) gels were consisted of resolving gel 10% and stacking gel 5%. The gels were

stained in 0.15% Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich, USA) in methanol:acetic acid:distilled water (1:7:14) for 1 h with gentle shaking, and excess stain was destained in methanol:acetic acid:distilled water (1:4:5) [20].

Scanning Electron Microscopy (SEM)

In order to observe external cell morphology, Scanning Electron Microscopy was performed. *E. coli* (ATCC 25922) suspension (Control and Treatment), was prepared as same as used in MIA, and it was pelleted by centrifugation (7,000 g, 5 min), resuspended in PBS and spotted onto poly-lysine-coated (Sigma-Aldrich, USA) glass slides. The samples were dried and fixed with 2% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA) and 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA) in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 20h. After first fixation, samples were fixed in 1% OsO₄ (Sigma-Aldrich, USA) for 1h. Fixed samples were then dehydrated in ethanol gradient (70, 80, 90 and 100 °CL), and critical point dried in CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). Lastly, samples were coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed under scanning electron microscope (FEI Quanta 200) [21].

Transmission Electron Microscopy (TEM)

In order to observe internal cell morphology, Transmission Electron Microscopy was performed. *E. coli* (ATCC 25922) suspension (Control and Treatment), was prepared as same as used in MIA, and it was pelleted by centrifugation (7,000 g, 5 min), The samples pellets were fixed with 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 20h. After first

fixation, samples were fixed in 1% OsO₄ for 2h. Fixed samples were then dehydrated in ethanol gradient (70, 80, 90 and 100 °CL), then samples were embedded in propylene oxide twice for 30 min, then gradually replaced by resin (Araldite) and polymerized at 60 °C for 48h. Samples blocks were cut into ultrathin slices (60 nm) using ultramicrotome (Leica Ultracut UCT) and placed the slices on Formvar-coated grids. These slices were stained in 2% uranyl acetate and 0.2% lead citrate observed under transmission electron microscope (JEOL JEM-1400 Electron Microscope) [22].

Statistical analysis

All data represent mean values from triplicates. The assumptions of normality and / or homogeneity of variances were initially tested for subsequent parametric analyzes (t-test, one-way ANOVA, linear regression) and non-parametric analysis (log-rank test).

RESULTS

Gold nanoparticle (AuNP)

Nanoparticles synthesis was confirmed by the plasmonic band surface, with absorption peak at 520 nm (Supplementary material 1). DLS analysis shows particles between 1 ± 0.16 nm, zeta potential of $55.12, \pm 1.86$ mV. By the MET images (Supplementary material 2), we observed the morphology of the spherical particles.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC values for Gram-positive bacteria range from 0.01 to $0.19 \mu\text{g ml}^{-1}$, while for Gram-negative it ranges from 0.39 to $6.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Table 1). Gram-negative bacteria showed less susceptible to AuNP ($p < 0.05$).

Table 1. Minimal inhibitory concentration of gold nanoparticle against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Bacterial strains	MIC \pm SD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Gram-negative	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	1.562 ± 0.127
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1.562 ± 0.127
<i>E. coli</i> ESBL 169	1.562 ± 0.127
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	0.391 ± 0.159
<i>K. pneumoniae</i> KPC01	6.250 ± 1.276
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	3.125 ± 1.276
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis ATCC 13076	3.125 ± 1.276
<i>S. enterica</i> Typhimurium ATCC 13311	1.562 ± 0.127
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	0.391 ± 0.159
Gram-positive	

<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3624	0.195 ± 0.009
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	0.048 ± 0.019
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.048 ± 0.019
<i>S. aureus</i> BEC 9393	0.048 ± 0.019
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.024 ± 0.009
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	0.012 ± 0.002
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	0.048 ± 0.019
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	0.012 ± 0.002

ATCC: American Type Culture Collection;

ESBL: Extended-spectrum beta-lactamase;

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase;

MIC: Minimal Inhibitory Concentration;

MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*;

SD: Standard deviation;

Time-kill curve

The time-curve graphs showed bactericidal effect for both bacteria tested (Figure 1). For *S. aureus*, we observed a significant reduction ($p < 0.05$) after 6 hours of incubation with AuNP, and total elimination of the population after 10h (Figure 1A). In the case of *E. coli*, despite MIC being higher compared to *S. aureus*, after 2 h of contact with AuNP there was total bacterial elimination of the bacterial population (Figure 1B).

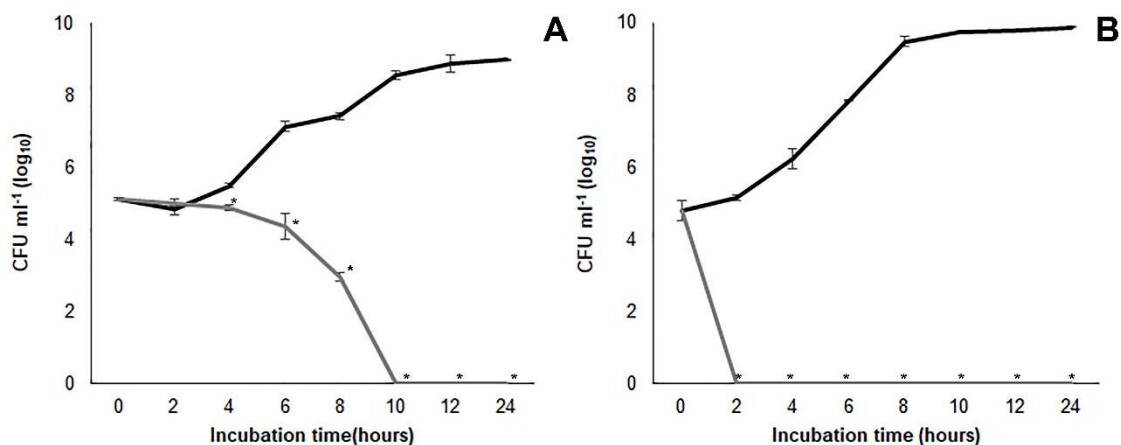


Figure 1. Time kill assay. A: *Staphylococcus aureus*; B: *Escherichia coli*.

*Significant difference compared to control ($p < 0.05$).

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay data (Table 2) showed a CC_{50} value of $2.12 \pm 0.11 \mu\text{g ml}^{-1}$, lower than HC_{50} value which was $50.97 \pm 2.55 \mu\text{g ml}^{-1}$. This may indicate an antitumor potential of AuNP, since the tested cell line is a tumor cell, and when tested against red blood cells the hemolytic concentration was significantly higher ($p < 0.05$). The selectivity index (SI) calculated by HC_{50}/MIC_{50} was 32.67 and 1019.4 for Gram-negative and Gram-positive, respectively.

Table 2. Cytotoxicity of gold nanoparticle in HEP-2 and red blood cells.

	Concentration \pm SD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	R ²
CC₅₀	2.12 \pm 0.11	0.720
HC₅₀	50.97 \pm 2.55 *	0.949

CC₅₀: Cytotoxicity concentration that inhibit 50% of Hep-2 cells;

HC₅₀: Hemolytic concentration 50% of red blood cells;

R²: Coefficient of determination;

SD: Standard deviation;

* Statistically significant ($p < 0.05$).

***Galleria mellonella* larvae assay**

We observed that the inoculated larvae with PBS remained viable during all the follow-up days (Figure 2). The same occurred with the larvae that received AuNP (1.56 μg per larva), indicating that this concentration shows no toxicity. The larvae inoculated with bacteria alone (10^8) all died within 1 day after inoculation. The larvae that were infected and received AuNP soon afterwards had a survival rate of 80% ($p < 0.05$).

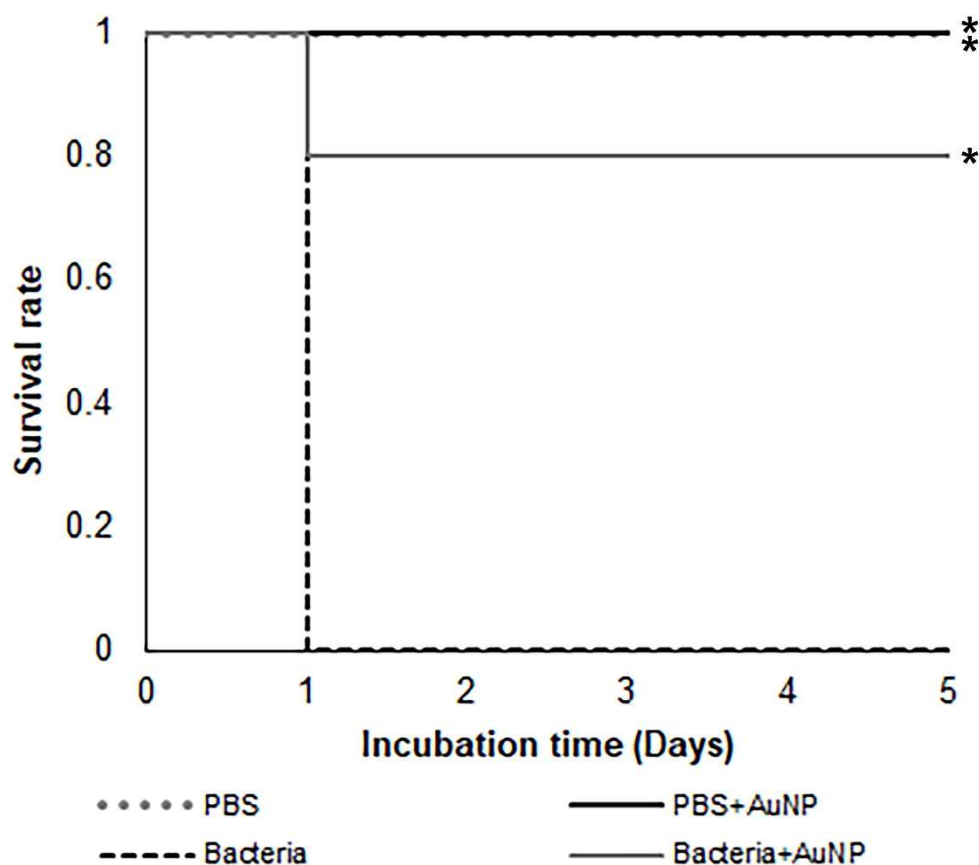


Figure 2. *Galleria mellonella* in vivo assay. *Significant difference compared to Bacteria ($p < 0.05$).

Membrane integrity assay (MIA)

The uptake rate of Bengal rose by *E. coli* are shown on Figure 3A. Control, absence of AuNP show uptake rate of 20.45%, meanwhile treatment, in the presence of AuNP after only 1h of exposure shows 88.56% uptake rate ($p < 0.05$).

Extracellular ATP determination assay

Extracellular ATP concentration of *E. coli* are shown on Figure 3B. Control showed 0.44 nM of released ATP in the time 0 min and increased to 1.05 nM after 1 h of incubation. In the meanwhile, treatment shows 5.72 nM immediately in contact with AuNP and increased to 6.70 after 1 h of incubation. In both incubation time, treatment was higher statistically ($p < 0.05$) than control.

Cellular leakage measurement

The measurement of supernatant of UV-absorbing materials is an indicatory of intracellular leakage. Figure 3C showed extracellular protein content, control shows 0.169 mg ml^{-1} while treatment shows 10x higher, 1.645 mg ml^{-1} ($p < 0.05$). We detected DNA content on *E. coli* extracellular material, control showed $13.7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ of dsDNA and $2.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ of ssDNA, in the meanwhile, treatment showed $74.3 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ of dsDNA and $50.1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ of ssDNA after 1 h in contact with AuNP (Figure 3D). In both dsDNA and ssDNA, Treatment has higher concentration statistically ($p < 0.05$) than control.

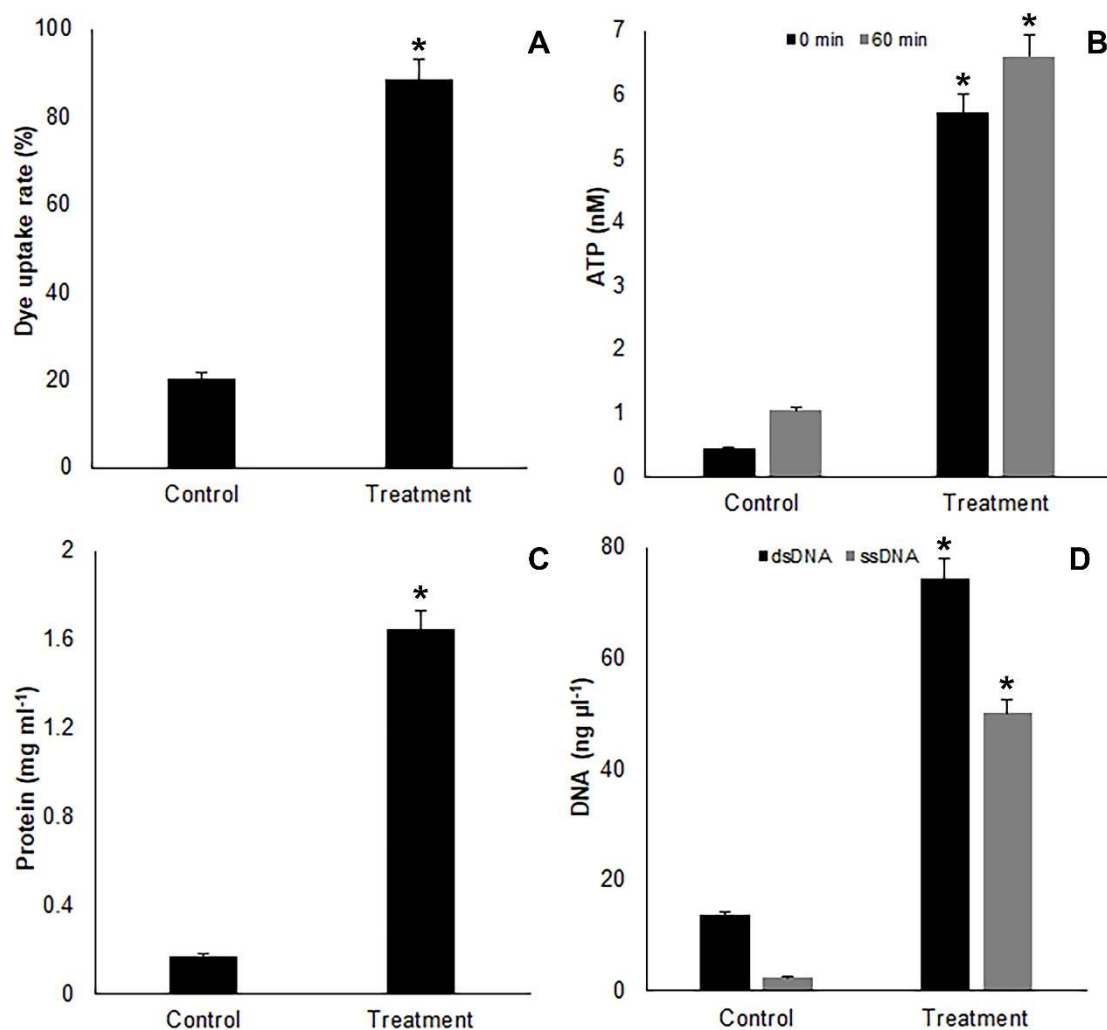


Figure 3. Membrane damage. A: Bengal rose uptake rate; B: Extracellular ATP content; C: Extracellular protein content; D: Extracellular DNA content. *Significant difference compared to respective control (p < 0.05).

Detection of reactive oxygen species (ROS)

The dosage of ROS production performed via fluorescence intensity (Figure 4A) showed that the control exhibits a fluorescence level between 16,000 to 19,000 in a range of 0 to 1 h. While the treatment it was observed an increase of intensity to 22000 from the initial time in contact with AuNP, up to 28000 at the

end of 1 h. At all measured times, treatment exhibits significantly higher readings than control ($p < 0.05$).

Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acid, caused by ROS produce malondialdehyde (MDA), thus MDA level is used as marker of the level of oxidative stress. Control showed none MDA level (Figure 4B), while treatment showed 0.04 nmole μl^{-1} of MDA after 1 h of incubation with AuNP ($p < 0.05$).

Protein carbonyl assay

The measurement of protein carbonyls, product of protein oxidation, we observed 250 nmole of carbonyl per mg of protein, after 1 h of incubation in control, while treatment showed 341 nmole of carbonyl per mg of protein after 1 h of incubation with AuNP (Figure 4C), significantly higher than control ($p < 0.05$).

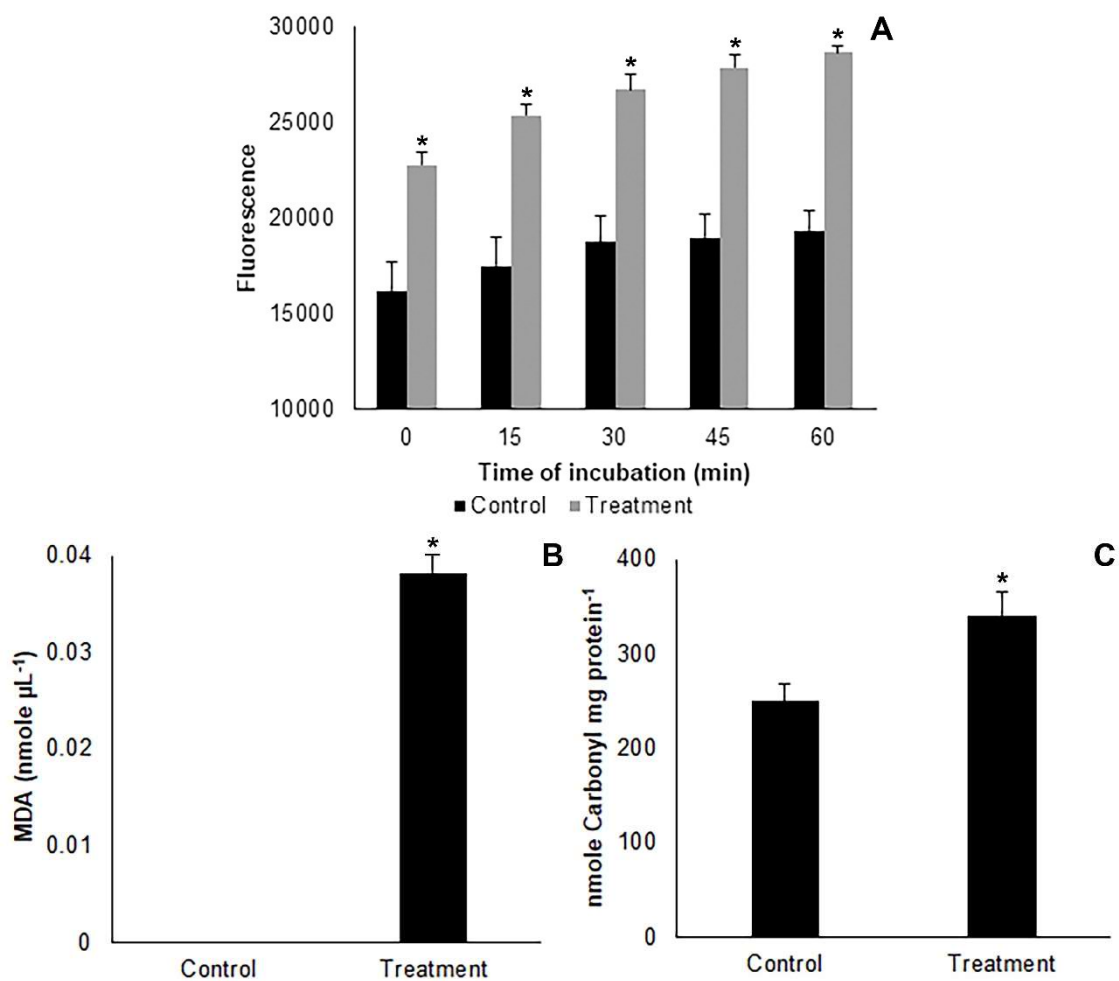


Figure 4. Reactive oxygen species (ROS) produced by *E. coli* and its effect. A: Total reactive oxygen species (ROS) produced by *E. coli*; B: Total malondialdehyde (MDA) content; C: Protein carbonyl per total protein content.

DNA degradation assay

The effect of ROS in *E. coli* DNA can be observed in Figure 5, indicating a high level of DNA degradation.

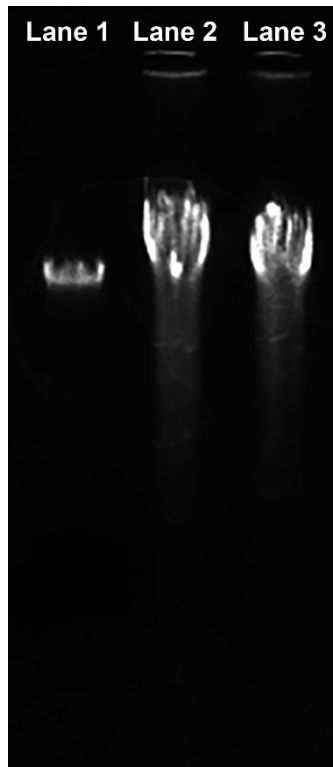


Figure 5. Agarose electrophoresis of total DNA from *E. coli*. Lane 1: Control; Lane 2: Treatment with AuNP for 30 min; Lane 3: Treatment with AuNP for 60 min.

SDS PAGE

In order to analyze some differences in protein expression of the bacteria, SDS-PAGE was performed (Figure 6). In lanes 2 and 4, represents total intracellular protein content (control and treatment respectively), no visual changes were observed in the patterns of bands found. While in lanes 3 and 5 (control and treatment respectively), represents extracellular protein content, it is possible to observe a small amount of extracellular proteins in the control, whereas in the treatment we can observe a larger amount.

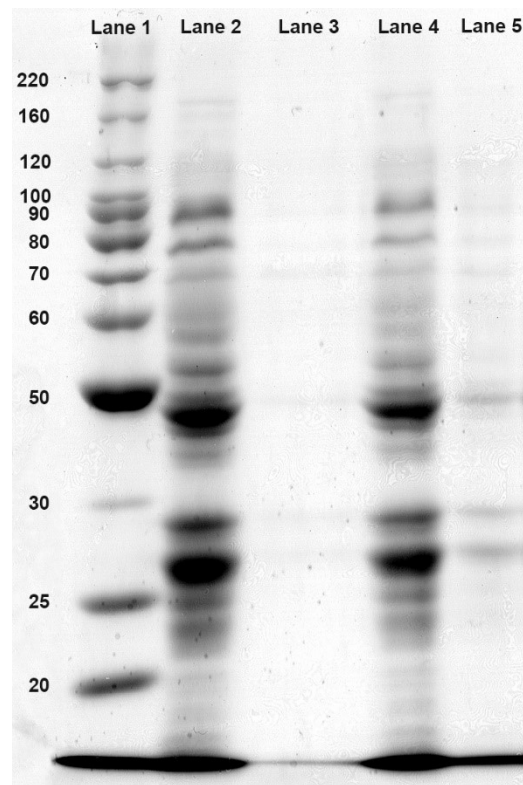


Figure 6. SDS-PAGE electrophoresis. Lane 1: Protein ladder; Lane 2: Control intracellular content; Lane 3: Control extracellular content; Lane 4: Treatment intracellular content; Lane 5: Treatment extracellular content.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Was observed a large number of cells distributed throughout the field, intact cells, with few blebs in some regions (Figure 7A). We observed a great number of cells throughout the field on treated cells, but forming a very dense and aggregated mass (Figure 7B). At higher magnification showed cells with a large amount of bubbles that may be extracellular matrix parts, outer membrane vesicles (OMV) and cytoplasmic extravasation.

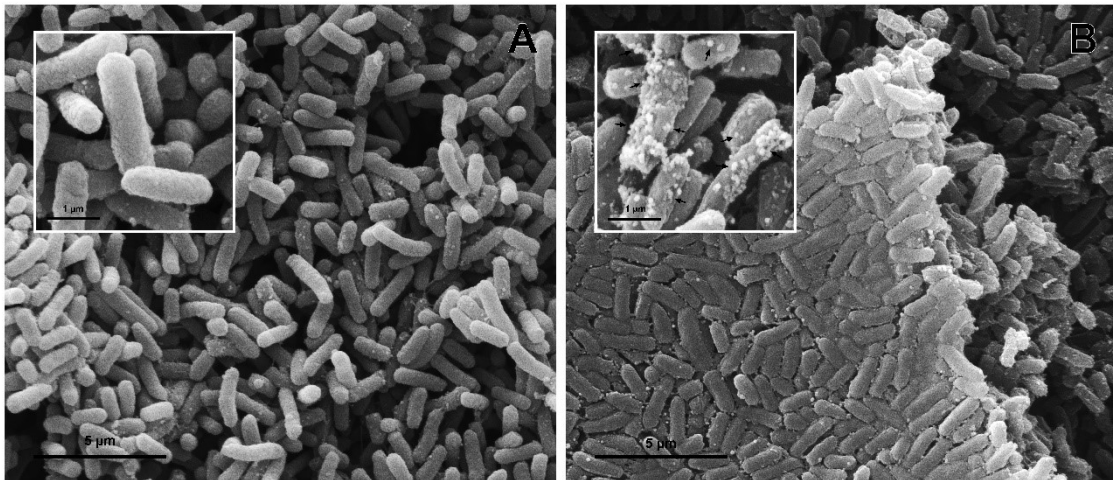


Figure 7. Scanning electron microscopy of *E. coli*. A: Control; B: Treatment.

(→) indicate blebs on treated cells.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

A longitudinal section of a normal cell was observed with integral membranes and walls, cytoplasm containing ribosomes (points of high electronic density) and genetic material (region of low electronic density) (Figure 8A). While in the treatment (Figure 8B), we could observe rupture of the membranes and wall leading to extravasation of the cytoplasmic material. We also observed accumulation of nanoparticles through the cytoplasm, probably linked to ribosomes and DNA. On the surface of the cell, we could see some points where there was formation of outer membrane vesicle (OMV).

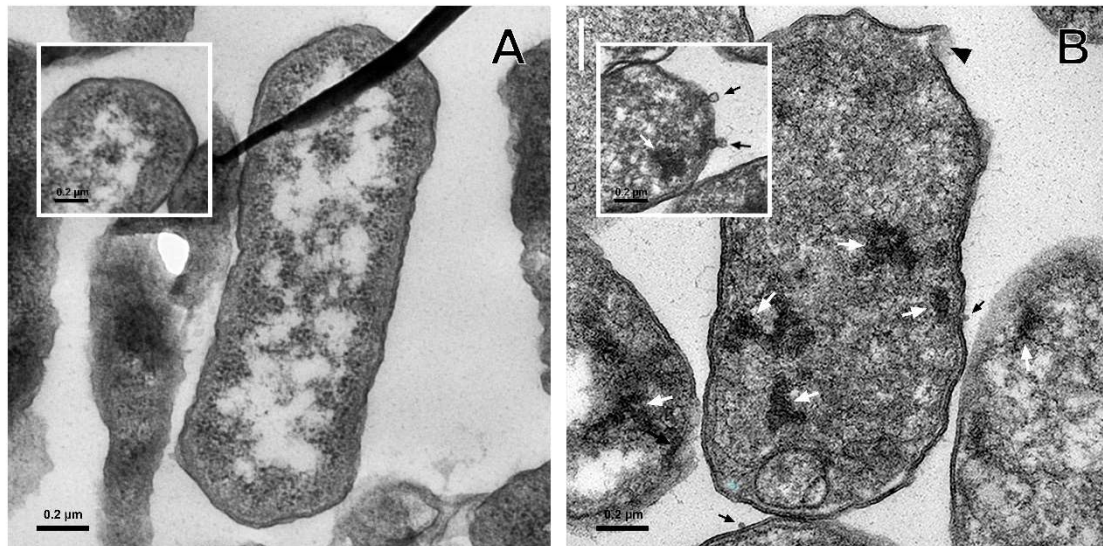


Figure 8. Transmission electron microscopy of *E. coli*. A: Control; B: Treatment. (Black →) indicate outer membrane vesicles; (White →) indicate accumulation of AuNP; (▶) indicate cytoplasmic leakage.

DISCUSSION

In this study gold nanoparticles were synthesized using NaBH_4 and CTAB, where HAuCl_4 is reduced to HAuCl_2 by NaBH_4 . In solution, they form AuCl_2^- ions that bind the cationic part of CTAB, resulting in a cationic nanoparticle [23]. This synthesis is very simple since it consists of 2 steps, and fast because in 2h it is possible to obtain the nanoparticles.

The localized surface plasmon resonance (LSPR) is a unique feature of metallic nanoparticles, due to the light-electron interaction of these particles. Spherical gold nanoparticles have a single absorption peak at 520 nm, due to their symmetrical geometry, whereas rod gold nanoparticles have two peaks due to their anisotropic geometry, a first transversal electronic oscillation, and another peak referring to longitudinal. The rod gold nanoparticles are more complex to synthesize compared to the spherical, since they require an elongation step using Ag. [24].

In our work we observed a single peak LSPR at 520 nm, indicating the synthesis of a spherical gold nanoparticle, which later its geometry was confirmed from the TEM images.

Metallic nanoparticles have been highlighting due to their biological properties, one of them the antimicrobial activity explored in our work [25]. Hernández-Sierra and colleagues [26], synthesized AuNP using NaBH_4 as a reducing agent, and found a MIC value of $197 \mu\text{g ml}^{-1}$ for *S. mutans*, about 4000x greater than that found in our work, such difference may be related to the difference of the stabilizing agent (polyvinylpyrrolidone).

Some studies reported that AuNP have a lower MIC value for Gram-positive compared to Gram-negative, similar to the found in our study, and suggest this differential action due to the complexity of the external Gram-negative structures [27,28,29].

Badwaik and colleagues [30], evaluated the action of AuNP against *E. coli* through a time-kill curve and observed that smaller AuNPs (25 nm) had no bactericidal / bacteriostatic activity, and larger nanoparticles (60 and 120 nm) had bactericidal / bacteriostatic activity. These results diverge from our work, since the nanoparticles have a small size and have bactericidal activity. However, Lima and colleagues [31], evaluated the activity of AuNP against *Salmonella enterica* serovar Typhi and found that smaller particles between 1 - 5 nm presented bactericidal activity with 90% reduction in 2 h, corroborating to our results.

Antimicrobial assays indicate a great potential for the use of AuNP for the treatment of infections, but in order to guarantee the safety of the use of these particles it is necessary to analyze their toxicity. We found a CC_{50} value of 2.12 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and HC_{50} of 50.97 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Similar results were found by Goodman and colleagues [32], where the AuNPs tested had a lower concentration for Cos-1 cell (7.37 μM) and a 10-fold increase for RBC (72 μM). This may be due to the antitumor activity that is described for several AuNP [33,34,35].

Pan and colleagues [36] showed a relationship between toxicity and particle size. In their work the authors conclude that the smaller the particle the more toxic, and the greater the less toxic, and assume that the toxicity is related to kinetics of absorption or specific targets. In addition, Connor and colleagues [37], points out that AuNP synthesized from CTAB are more toxic, but not due

to the nanoparticle itself, but due to the residual CTAB in the solution, and points out that when CTAB is eliminated the nanoparticle does not present cytotoxicity.

After confirming a low cytotoxicity, *in vivo* tests are performed using animals such as *G. mellonella*, which confirm to be a good alternative for the testing of new antimicrobials due to its positive correlation with murine models, low cost, easy handling [38]. Works such as Deacon and colleagues [39], confirmed the applicability of nanoparticles to treat infections, proving the protection of the infected larvae that received the treatment, similar to the found in the present study.

We confirmed the antibacterial activity of the synthesized AuNP, their cytotoxicity and initial *in vivo* challenge, confirming the protective ability of AuNP against infection. However, in addition to *in vitro* and *in vivo* activity tests, it is important to know how the AuNP act on the bacteria in order to understand possible mechanisms of resistance and avoid emergence and dissemination of resistance [40].

In the literature, the main metallic nanoparticles (Ag, Au, Cu, Zn, Ti) mechanism of action is the induction of reactive oxygen species production. Such ROS act on several cellular components as membrane lipids, causing lipid peroxidation, acts on membrane and cytoplasmic proteins, altering the ATP and protein synthesis production, acts on the genetic material, degrading it [41,42,43].

In addition, recent work suggested that gold nanoparticles act on the membrane destabilizing it, leading to the cytoplasmic leakage, confirmed in our work with the detection of extracellular nucleic acids, proteins and ATP molecules and

observed by electron microscopic images points of extravasation throughout the bacterial cell [44].

In the work of Zhao and colleagues [20], the authors reported that AuNP induced the formation of outer membrane vesicles (OMV) in *P. aeruginosa*, probably due to its cationic characteristic similar to gentamicin that produces similar effects. Effect also observed by Badwaik and colleagues [30] in *E. coli*. In our work we observed the formation of these OMV by the TEM images, and the exacerbated production leads to an excessive loss of cytoplasmic material leading to cell death, but we also know that these OMV carry important molecules for bacterial *quorum-sensing* [45], which may explain the formation of perfectly aggregated masses of bacteria observed in SEM images. Therefore, this aggregation may be related to defense mechanism of the bacteria, which communicate via *quorum-sensing* by OMV against the antimicrobial agent.

Goodman and colleagues [32], tested two gold nanoparticles, one with positively charged surface and one negatively charged surface. They found that the positive surface nanoparticles have a higher capacity for cell lysis compared to negatively charged nanoparticles.

The importance of size, shape, charge of nanoparticles for the antimicrobial effect and toxicity is evident. In addition, studies omit details of the tests, or do not bring accurate information about the nanoparticles used (size, shape, surface), which leads to contradictory and erroneous results [10]. Thus we highlight the importance of the study of the antimicrobial activity of AuNP, toxicity studies that we also find that they are influenced due to the characteristics of the nanoparticles and last but not least the mechanism of action that is closely related to these physicochemical properties of

nanoparticles, coming from new syntheses in a standardized and quantitative way.

In conclusion, we emphasize the importance of the complete study of the antimicrobial activity and mechanisms of action of the AuNP, being able to anticipate mechanisms of resistance and to contain the emergence and dissemination of resistance.

Acknowledgements

Acknowledgements to Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise, Laboratório de Espectroscopia, Laboratório de Óptica e Optoeletrônica, Universidade Estadual de Londrina. Ao Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Universidade Estadual de Maringá.

References

1. O'Neill JIM. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resist.* 2014;**20**:1–16.
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;**18**(3):318–27.
3. Gelband H, Miller-Petrie M, Pant S, Gandra S, Levinson J, Barter D. The state of the world's antibiotics: center for disease dynamics. *Economics & Policy (CDDEP).* 2015;
4. Arakha M, Jha S. *Interfacial phenomena on biological membranes.* Springer; 2018.
5. Rice KM, Gijupalli GK, Manne N, Jones CB, Blough ER. A review of the antimicrobial potential of precious metal derived nanoparticle constructs. *Nanotechnology.* 2019;2-51.
6. Cui Y, Zhao Y, Tian Y, Zhang W, Lü X, Jiang X. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials.* 2012;**33**(7):2327–33.
7. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi DJ, de Larramendi IR, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 2012;**30**(10):499–511.
8. Fernando SSN, Gunasekara T, Holton J. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action. *Sri Lankan J Infect Dis.* 2018;**8**(1):2–11.
9. Yuan P, Ding X, Yang YY, Xu Q. Metal Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Bacterial Infection. *Adv Healthc Mater.* 2018;**7**(13):1701392.

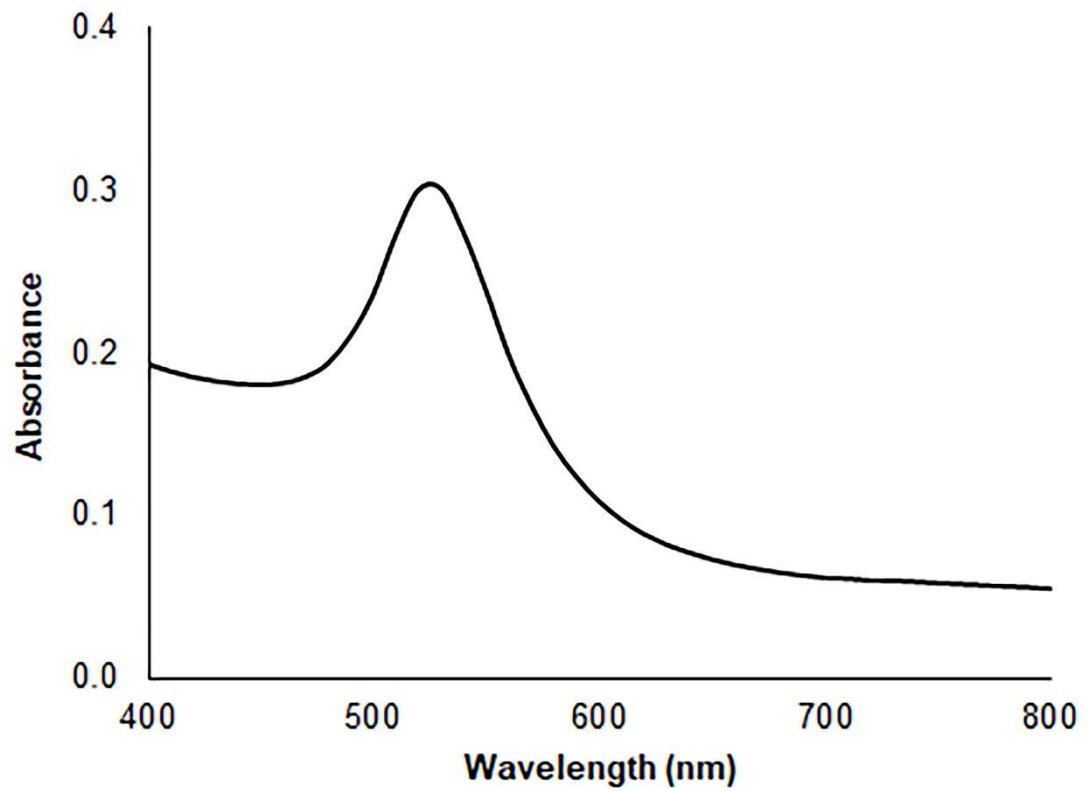
10. Zhang Y, Shareena Dasari TP, Deng H, Yu H. Antimicrobial activity of gold nanoparticles and ionic gold. *J Environ Sci Heal Part C*. 2015;**33**(3):286–327.
11. Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chem Mater*. 2001;**13**(7):2313–22.
12. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. M07, 11th ed. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999.
14. Nishio EK, Bodnar GC, Perugini MRE, Andrei CC, Proni EC, Kobayashi RKT, et al. Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Apic Res*. 2015;**54**(5):452–60.
15. Scandorieiro S, de Camargo LC, Lancheros CAC, Yamada-Ogatta SF, Nakamura C V, de Oliveira AG, et al. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Front Microbiol*. 2016;**7**:760.
16. Yang H-F, Pan A-J, Hu L-F, Liu Y-Y, Cheng J, Ye Y, et al. *Galleria mellonella* as an in vivo model for assessing the efficacy of antimicrobial agents against *Enterobacter cloacae* infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017;**50**(1):55–61.

17. Halder S, Yadav KK, Sarkar R, Mukherjee S, Saha P, Haldar S, et al. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus*. 2015;**4**(1):672.
18. Imelda F, Faridah DN, Kusumaningrum HD. Bacterial inhibition and cell leakage by extract of *Polygonum minus* Huds. leaves. *Int Food Res J*. 2014;**21**(2):553-560.
19. Chatterjee AK, Chakraborty R, Basu T. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology*. 2014;**25**(13):135101.
20. Aksakal A. Analysis of whole cell protein profiles of *Salmonella* serovars isolated from chicken, turkey and sheep faeces by SDS-PAGE. *Vet Med (Praha)*. 2010;**55**(6):259–63.
21. Nishio EK, Ribeiro JM, Oliveira AG, Andrade C, Proni EA, Kobayashi RKT, et al. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Sci Rep*. 2016;**6**:21641.
22. Zhao Y, Tian Y, Cui Y, Liu W, Ma W, Jiang X. Small molecule-capped gold nanoparticles as potent antibacterial agents that target gram-negative bacteria. *J Am Chem Soc*. 2010;**132**(35):12349–56.
23. Li N, Zhao P, Astruc D. Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity. *Angew Chemie Int Ed*. 2014;**53**(7):1756–89.
24. Zhou J, Cao Z, Panwar N, Hu R, Wang X, Qu J, et al. Functionalized gold nanorods for nanomedicine: Past, present and future. *Coord Chem Rev*. 2017;**352**:15–66.

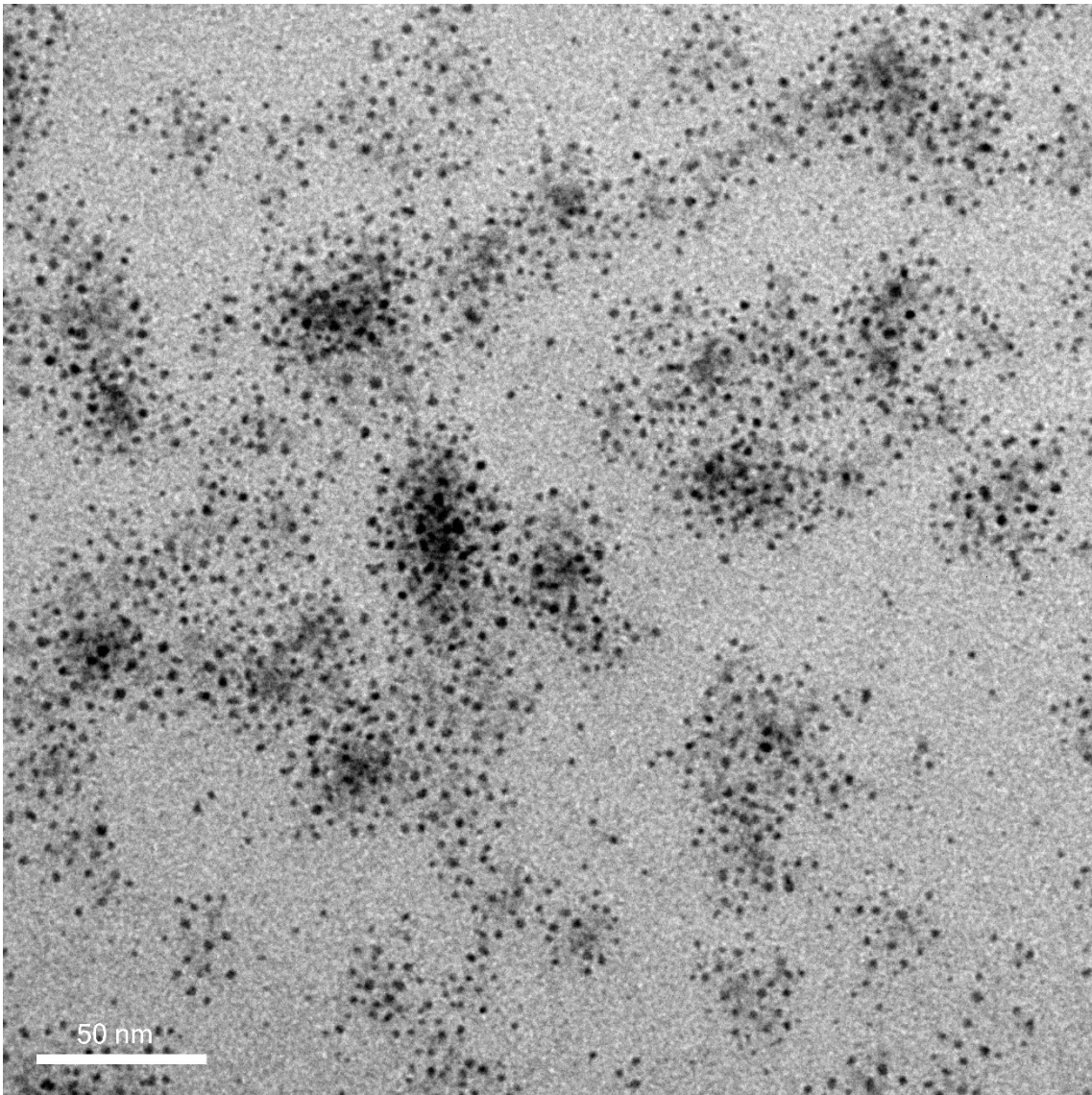
25. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arab J Chem. 2017;1-24.
26. Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DCC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén A de JP, et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2008;4(3):237–40.
27. Geethalakshmi R, Sarada DVL. Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L. Ind Crops Prod. 2013;51:107–15.
28. Kumar KM, Mandal BK, Sinha M, Krishnakumar V. Terminalia chebula mediated green and rapid synthesis of gold nanoparticles. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc. 2012;86:490–4.
29. Zheng K, Setyawati MI, Leong DT, Xie J. Antimicrobial gold nanoclusters. ACS Nano. 2017;11(7):6904–10.
30. Badwaik VD, Vangala LM, Pender DS, Willis CB, Aguilar ZP, Gonzalez MS, et al. Size-dependent antimicrobial properties of sugar-encapsulated gold nanoparticles synthesized by a green method. Nanoscale Res Lett. 2012;7(1):623.
31. Lima E, Guerra R, Lara V, Guzmán A. Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. Chem Cent J. 2013;7(1):11.
32. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. Bioconjug Chem. 2004;15(4):897–900.

33. Arvizo RR, Saha S, Wang E, Robertson JD, Bhattacharya R, Mukherjee P. Inhibition of tumor growth and metastasis by a self-therapeutic nanoparticle. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;**110**(17):6700–5.
34. Tengdelius M, Gurav D, Konradsson P, Pålsson P, Griffith M, Oommen OP. Synthesis and anticancer properties of fucoidan-mimetic glycopolymer coated gold nanoparticles. *Chem Commun*. 2015;**51**(40):8532–5.
35. Ramachandran R, Krishnaraj C, Sivakumar AS, Prasannakumar P, Kumar VKA, Shim KS, et al. Anticancer activity of biologically synthesized silver and gold nanoparticles on mouse myoblast cancer cells and their toxicity against embryonic zebrafish. *Mater Sci Eng C*. 2017;**73**:674–83.
36. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*. 2007;**3**(11):1941–9.
37. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005;**1**(3):325–7.
38. Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;**7**(3):214–29.
39. Deacon J, Abdelghany SM, Quinn DJ, Schmid D, Megaw J, Donnelly RF, et al. Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). *J Control release*. 2015;**198**:55–61.
40. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;**4**(2):1-37.

41. Li Y, Zhang W, Niu J, Chen Y. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. *ACS Nano*. 2012;**6**(6):5164–73.
42. Kumar VV, Anthony SP. Antimicrobial studies of metal and metal oxide nanoparticles. In: *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*. Elsevier; 2016. 265–300.
43. Dayem AA, Hossain M, Lee S, Kim K, Saha S, Yang G-M, et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2017;**18**(1):120.
44. Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Zeng H-Y, You-Sheng O-Y, Chen Y-B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;**85**(4):1115–22.
45. Jan AT. Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Front Microbiol*. 2017;**8**:1053.



Supplementary material 1. Gold nanoparticle localized surface plasmon resonance (LSPR).



Supplementary material 2. Gold nanoparticle scanning electron microscopy image.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as AuNPs, quimicamente sintetizadas apresentam atividade antibacteriana contra todas as cepas de importância clínica testadas, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas incluindo cepas multirresistentes.

Os resultados sugerem que a ação deve-se em grande parte devido a produção de espécies reativas de oxigênio, induzidas pelas nanopartículas, causando danos oxidativos no material genético, membrana e proteínas.

Além disso observa-se nas imagens de MEV e MET extravasamento citoplasmático, que provavelmente se deve à alteração da integridade de membrana, acúmulo de AuNP em membrana, e liberação de vesículas de membrana externa.

Outro achado interessante é o fato de as células bacterianas estarem aglomeradas, provavelmente devido ao *quorum-sensing* via OMV. Isso indica possíveis alterações na comunicação celular em resposta ao contato com as AuNPs, isso pode ser um próximo passo a ser melhor estudado.

A partir dos resultados do presente trabalho pode-se sugerir que AuNPs, apresentam um grande potencial para serem utilizados como uma boa alternativa terapêutica para a antibioticoterapia convencional principalmente para tratamento e prevenção de infecções relacionadas a assistência à saúde causadas por microrganismos multirresistentes.