

**Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy"  
UNIGRANRIO  
Pró Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - PROPEP  
Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - BIOTRANS**

**Mateus Ferreira Conz Eugenio**

**Avaliação do Efeito Antibacteriano, Antifúngico e Antitumoral de  
Nanopartículas de Prata/cloreto de Prata Produzidas por Rota Verde a  
partir de Leveduras**

**Duque de Caxias**

**2017**

**Mateus Ferreira Conz Eugenio**

**Avaliação do Efeito Antibacteriano, Antifúngico e Antitumoral de  
Nanopartículas de Prata/cloreto de Prata Produzidas por Rota Verde a  
partir de Leveduras**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Biotrans, Universidade do Grande Rio - Unigranrio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Inmetro, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - Uezo, como parte dos requisitos parciais para obtenção do grau de Mestre em Biomedicina.

Área de concentração:  
Ciências Biomédicas

Orientador: Dr. Celso Sant'Anna de Barbosa Filho

Orientador: Dr. Wanderley de Souza

**Duque de Caxias**

**2017**

**Mateus Ferreira Conz Eugenio**

**Avaliação do Efeito Antibacteriano, Antifúngico e Antitumoral de Nanopartículas de Prata/cloreto de Prata Produzidas por Rota Verde a partir de Leveduras**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Biotrans, Universidade do Grande Rio - Unigranrio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Inmetro, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - Uezo, como parte dos requisitos parciais para obtenção do grau de Mestre em Biomedicina.

Área de concentração:  
Ciências Biomédicas

Aprovado em 30 de agosto de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Rosa Lopes Pereira Ribeiro  
Unigranrio

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane de Oliveira Ferreira  
UFRJ

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Rocha Gadelha  
Inmetro

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leandra Santos Baptista  
UFRJ

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela sua infinita graça e misericórdia na minha vida.

Aos meus familiares, Mary, Rafael, Lisete, Lucas e Apolo pelo apoio em todos os momentos e amor incondicional.

À minha noiva Tamiris pelo companheirismo, compreensão, fidelidade, confiança e apoio sem medidas.

Aos familiares da minha noiva, Cristina, Marcelo e Lucas pelo carinho que sempre me foi dado.

Ao meu orientador, Celso, pela inestimável contribuição na minha formação acadêmica e por tentar elevar meu nível ao máximo desde que eu entrei no laboratório.

A minha colaboradora Loraine, por executar experimentos com células tumorais e contribuir com valiosas discussões sobre os resultados.

Aos meus colegas de grupo Yuri, Veronica, Nathalia, Chayenne e Renato pelas contribuições técnicas e científicas para esse trabalho.

Às minhas alunas de Iniciação Científica Jr, Maria Paula, Mickaela e Raquel por me ajudarem a amadurecer como pós graduando e pela contribuição técnica em alguns experimentos.

Aos técnicos do LAMAV e LABIO por todo suporte técnico que auxiliou na realização dos experimentos.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite de participar da defesa e enriquecer este trabalho.

A CAPES, FAPERJ e CNPq pelo suporte financeiro.

## **EPÍGRAFE**

*"Viver é enfrentar um problema atrás do outro.  
O modo como você o encara é que faz a diferença"*

*- Benjamin Franklin (1706-1790)*

## RESUMO

A bioprodução de nanopartículas à base de prata, como as de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl-NPs), é descrita como uma metodologia econômica, "verde" e promissora como terapia alternativa contra bactérias e fungos patogênicos, assim como contra o câncer. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar o efeito antibacteriano e antifúngico de Ag/AgCl-NPs produzidas por *Candida intermedia*, assim como, avaliar o efeito antitumoral de Ag/AgCl-NPs produzidas por *Candida lusitanae*. Mudança de cor no meio de cultura e dados de UV-Vis indicaram a biossíntese de nanopartículas (NPs) por *C. intermedia*. Difração de raios-X revelou a presença de picos de difração correspondentes a AgNPs e AgCl-NPs, indicando formação de Ag/AgCl-NPs. Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou que as Ag/AgCl-NPs possuíam diâmetro entre 5-75 nm, no entanto, a maioria (60%) com variação entre 20-30 nm e cerca de 85% apresentaram o formato arredondado. O ensaio antiproliferativo em bactérias mostrou que o tratamento com Ag/AgCl-NPs foi eficiente a partir das concentrações de 100 e 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para *Salmonella typhi* e *Streptococcus pyogenes*, respectivamente. Por outro lado, a estreptomicina foi eficiente em todas as concentrações para ambas bactérias, enquanto a penicilina apenas para *S. pyogenes*. Culturas de *S. typhi* anteriormente tratadas com Ag/AgCl-NPs e penicilina até 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  se reestabeleceram, como evidenciado no teste de recuperação. As culturas de *S. pyogenes* tenderam ao reestabelecimento com tratamentos de 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs e penicilina. Um segundo ciclo de tratamentos indicou que ambas bactérias foram menos sensíveis aos antibióticos, enquanto as Ag/AgCl-NPs foram mais efetivas no segundo tratamento. Nos ensaios antiproliferativos nas leveduras *Candida albicans* e *C. lusitanae*, o tratamento com Ag/AgCl-NPs foi eficiente em ambas a partir de 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto a anfotericina-B apresentou eficiência em todas as concentrações testadas (50-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). As culturas de *C. albicans* e *C. lusitanae* se reestabeleceram após tratamentos com Ag/AgCl-NPs de 300 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Por outro lado, apenas *C. lusitanae* se reestabeleceu após tratamento com anfotericina-B até 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Um segundo ciclo de tratamento mostrou que as Ag/AgCl-NPs melhoraram a eficácia nas duas leveduras enquanto a anfotericina-B piorou significativamente em *C. lusitanae*. Comparamos o efeito de 0,1-5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs produzidas por *C. lusitanae* com o de 9,7-48,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de temozolamida (TMZ, medicamento usado para tratar GBM), sozinhos ou em combinação. Em concentrações mais elevadas, Ag/AgCl-NPs inibiram a proliferação de GBM02 de forma mais eficaz do que TMZ (até 83% e 62% de inibição, respectivamente), enquanto o oposto ocorreu em concentrações mais baixas (até 23% e 53% de inibição para Ag/AgCl-NPs e TMZ, respectivamente). O tratamento combinado (Ag/AgCl-NPs + TMZ) inibiu a proliferação de GBM02 de 54 a 83%. Ag/AgCl-NPs tiveram um efeito reduzido na proliferação de astrócitos em comparação com GBM, e Ag/AgCl-NPs + TMZ inibiram a proliferação de astrócitos de 5 a 42%. Análises da taxa de crescimento e tempo de duplicação da população confirmaram que o tratamento com Ag/AgCl-NPs foi mais eficaz contra as células GBM02 do que TMZ (~67 vezes) e menos agressivo aos astrócitos, enquanto o tratamento Ag/AgCl-NP + TMZ não foi mais eficaz contra as células GBM02 do que a monoterapia com Ag/AgCl-NPs. Os dados obtidos neste trabalho apontam que as Ag/AgCl-NPs bioproduzidas por leveduras foram efetivas contra bactérias e leveduras patogênicas, assim como células tumorais *in vitro*, o que reforça a perspectiva para a aplicação desse nanomaterial na área biomédica.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de prata/cloreto de prata, glioblastoma multiforme, resistência a antibióticos, efeito antiproliferativo, análise de alto conteúdo.

## ABSTRACT

Bioproduction of silver-based nanoparticles, such as silver/silver chloride (Ag/AgCl-NPs), is described as an economical and "green" methodology. Also promising as alternative therapy against pathogenic bacteria and fungi as well as against cancer. The objective of this work was to characterize and evaluate the anti-bacterial and antifungal effect of Ag/AgCl-NPs produced by *Candida intermedia*, as well as to evaluate the antitumor effect of Ag/AgCl-NPs produced by *Candida lusitaniae*. Color change in culture medium and UV-Vis data indicated nanoparticle biosynthesis by *C. intermedia*. X-ray diffraction revealed the presence of diffraction peaks corresponding to AgNPs and AgCl-NPs, indicating Ag/AgCl-NPs formation. Analysis by transmission electron microscopy showed that Ag/AgCl-NPs had a diameter between 5-75 nm, however, most (60%) with a variation between 20-30 nm, and about 85% of these NPs presented a rounded shape. The antiproliferative assay in bacteria showed that the Ag/AgCl-NPs treatment was efficient from the concentrations of 100 and 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *Salmonella typhi* and *Streptococcus pyogenes*, respectively. On the other hand, streptomycin was efficient at all concentrations for both bacteria, whereas penicillin was only for *S. pyogenes*. *S. typhi* cultures previously treated with Ag/AgCl-NPs and penicillin up to 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were reestablished, as evidenced in the recovery test. *S. pyogenes* cultures tended to be reestablished with 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of Ag/AgCl-NPs and penicillin. A second cycle of treatment indicated that both bacteria were less sensitive to antibiotics, while Ag/AgCl-NPs were more effective in the second treatment. In the antiproliferative assays in yeast *Candida albicans* and *C. lusitaniae*, Ag/AgCl-NPs treatment was efficient in both of them from 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , whereas amphotericin-B showed efficiency at all concentrations tested (50- 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Cultures of *C. albicans* and *C. lusitaniae* were reestablished after treatments with Ag/AgCl-NPs of 300 and 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. On the other hand, only *C. lusitaniae* was reestablished after treatment with amphotericin-B up to 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A second cycle of treatment showed that Ag/AgCl-NPs improved the efficacy in the two yeasts while amphotericin-B worsened significantly in *C. lusitaniae*. We compared the effect of 0.1-5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of Ag/AgCl-NPs produced by *C. lusitaniae* with that of 9.7-48.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of temozolomide (TMZ, medicine used to treat GBM), alone or in combination. At higher concentrations, Ag/AgCl-NPs inhibited proliferation of GBM02 more effectively than TMZ (up to 83% and 62% inhibition, respectively), while the opposite occurred at lower concentrations (up to 23% and 53% of inhibition for Ag/AgCl-NPs and TMZ, respectively). Combination treatment (Ag/AgCl-NPs + TMZ) inhibited GBM02 proliferation from 54 to 83%. Ag/AgCl-NPs had a reduced effect on astrocyte proliferation compared to GBM, and Ag/AgCl-NPs + TMZ inhibited astrocyte proliferation of 5 to 42%. Analysis of the growth rate and population doubling time confirmed that Ag/AgCl-NPs treatment was more effective against GBM02 cells than TMZ (~67-fold) and less aggressive to astrocytes, whereas Ag/AgCl-NP + TMZ treatment was no more effective against GBM02 cells than Ag/AgCl-NPs monotherapy. The data obtained in this work indicate that yeast bioproduced Ag/AgCl-NPs were effective against pathogenic bacteria and yeasts, as well as tumor cells *in vitro*, which reinforces the perspective for the application of this nanomaterial in the biomedical area.

**Keywords:** Silver/silver chloride nanoparticles, glioblastoma multiforme, antibiotic resistance, antiproliferative effect, high-content analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Evolução da área superficial com a diminuição das dimensões de um cubo.....	17
Figura 2. Os diferentes fatores que podem influenciar nas propriedades físico-químicas únicas das NPMs.....	18
Figura 3. Desenho esquemático mostrando os dois prováveis tipos de Ag/AgCl-NPs.....	21
Figura 4. Exames de imagem de paciente com GBM .....	30
Figura 5. Implantação de Gliadel ® .....	31
Figura 6. Análise da bioprodução de NPs a base de prata pela levedura <i>C. intermedia</i> , por absorvância no UV-Vis e mudança na cor do meio de cultura .....	43
Figura 7. Análise por DRX.....	44
Figura 8. Diâmetro e análise do fator de forma das Ag/AgCl-NPs por MET .....	45
Figura 9. Ensaio antiproliferativo nas bactérias <i>S. typhi</i> e <i>S. pyogenes</i> .....	48
Figura 10. Ensaio recuperação após tratamentos das bactérias <i>S. typhi</i> e <i>S. pyogenes</i> com Ag/AgCl-NPs ou com os antibióticos estreptomicina e penicilina .....	51
Figura 11. Ensaio antiproliferativo após recuperação das bactérias <i>S. typhi</i> e <i>S. pyogenes</i> .....	56
Figura 12. Ensaio antiproliferativo nas leveduras <i>C. albicans</i> e <i>C. lusitaniae</i> .....	60
Figura 13. Ensaio recuperação após tratamentos leveduras <i>C. albicans</i> e <i>C. lusitaniae</i> com Ag/AgCl-NPs ou anfotericina B.....	62
Figura 14. Ensaio antiproliferativo após recuperação das leveduras <i>C. albicans</i> e <i>C. lusitaniae</i> novamente tratadas com Ag/AgCl-NPs ou anfotericina B.....	66
Figura 15. Imagens representativas do ensaio antiproliferativo de GBM02 e astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs.....	69
Figura 16. Imagens representativas do ensaio antiproliferativo de GBM02 e astrócitos tratados com TMZ.....	70
Figura 17. Imagens representativas do ensaio antiproliferativo de GBM02 e astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs+TMZ.....	71
Figura 18. Ensaio antiproliferativo com GBM02 e astrócitos.....	73
Figura 19. Taxa de crescimento celular de GBM02 e astrócitos tratados por 72 h com Ag/AgCl-NPs, TMZ ou Ag/AgCl-NPs + TMZ.....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média percentual da inibição da proliferação após diferentes tratamentos em <i>S. typhi</i> .....	53
Tabela 2. Média percentual da inibição da proliferação após diferentes tratamentos em <i>S. pyogenes</i> .. ..	55
Tabela 3. Valores de IC <sub>50</sub> de acordo com os vários tratamentos das bactérias Gram-negativa <i>S. typhi</i> e Gram-positiva <i>S. pyogenes</i> em diferentes momentos em que as análises da DO foram feitas. ....	58
Tabela 4. Média percentual da inibição da proliferação após diferentes tratamentos em <i>C. albicans</i> .....	64
Tabela 5. Média percentual da inibição da proliferação após diferentes tratamentos em <i>C. lusitaniae</i> .. ..	65
Tabela 6. A Tabela 6 mostra a evolução dos valores de IC <sub>50</sub> de acordo com os vários tratamentos das leveduras do gênero <i>Cândida</i> em diferentes momentos em que as análises da DO foram feitas .....	67
Tabela 7. Percentual médio de inibição em diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs, TMZ e Ag/AgCl-NPs+TMZ usados como tratamento de GBM e astrócitos em diferentes tempos....	74
Tabela 8. Tempo de duplicação da população (TDDP) de GBM02 e astrócitos em horas. ....	78
Tabela 9. IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) calculado de acordo com cada tratamento em GBM02 e astrócitos.	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs - Nanopartículas de prata metálica

AgCl-NPs - Nanopartículas de cloreto de prata

Ag/AgCl-NPs - Nanopartículas de prata/cloreto de prata

AuNPs - Nanopartículas de ouro

CuNPs - Nanopartículas de cobre

CDC - do inglês, *Center for Disease Control and Prevention*, Centro de Controle e Prevenção de Doenças

DO - Densidade óptica

DRX - Espectroscopia de difração de raios-X

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

GBM - Glioblastoma multiforme

HCA - do inglês, *high-content analysis*, análise de alto conteúdo

IC<sub>50</sub> - do inglês, *inhibitory concentration of 50%*, concentração inibitória de 50%

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

ND - Não determinado

NPs - Nanopartículas

NPMs - Nanopartículas metálicas

OMS - Organização Mundial da Saúde

PLA - Poli-ácido-láctico

PLG - Poli-láctido-co-glicólido

RPLS - Ressonância plasmônica de superfície localizado

TDDP - Tempo de duplicação da população

TMZ - Temozolamida

UV-Vis - Espectroscopia no ultravioleta-visível

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1. Nanotecnologia .....	14
1.1.1. Nanobiotecnologia.....	14
1.2. Nanopartículas .....	15
1.2.1. Nanopartículas não-metálicas.....	15
1.2.2. Nanopartículas metálicas.....	16
1.3. Nanopartículas de prata (AgNPs).....	19
1.3.1 Nanopartículas de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl-NPs).....	20
1.3.1.1. Ag/AgCl-NPs de origem física e química .....	22
1.3.1.2. Ag/AgCl-NPs de origem biológica.....	23
1.4. Aplicações biomédicas de AgNPs e Ag/AgCl-NPs .....	23
1.5. Resistência bacteriana.....	26
1.6. Resistência fúngica .....	26
1.7. Neoplasia .....	28
1.7.1 Glioblastoma multiforme.....	29
1.7.1.1. Diagnóstico e tratamento .....	30
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
3.1. Objetivo geral .....	34
3.2. Objetivos específicos.....	34
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1. Biossíntese de Ag/AgCl-NPs.....	36
4.2. Purificação de Ag/AgCl-NPs.....	36
4.3. Difração de raios-X das nanopartículas produzidas por <i>C. intermedia</i> .....	37
4.4. Morfometria das nanopartículas produzidas por <i>C. intermedia</i> por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	37
4.5. Ensaio antiproliferativo em bactérias e leveduras .....	37
4.6. Ensaio de recuperação e segundo ciclo do ensaio antiproliferativo em bactérias e leveduras .....	38
4.7. Cultivo das células GBM02.....	39
4.8. Cultivo dos astrócitos humanos .....	39

4.9. Ensaio antiproliferativo de GBM02 e astrócitos humanos por análise de alto conteúdo (HCA).....	40
4.10. Determinação da taxa de crescimento e do tempo de duplicação da população de GBM02 e astrócitos.....	41
4.11. Determinação do IC <sub>50</sub> .....	41
4.12. Análise estatística.....	41
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1. Caracterização de Ag/AgCl-NPs bioproduzidas por <i>C. intermedia</i> e o monitoramento da atividade antiproliferativa em bactérias e leveduras.....	42
5.1.1. Análise colorimétrica e por UV-Vis das culturas da levedura <i>C. intermedia</i> incubadas na presença de nitrato de prata.....	42
5.1.2. Caracterização da natureza cristalina das NPs produzidas por <i>C. intermedia</i> através de Difração de Raios-X.....	43
5.1.3. Morfometria das Ag/AgCl-NPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	44
5.1.4. Ensaio antiproliferativo nas bactérias <i>S. typhi</i> e <i>S. pyogenes</i> tratadas com Ag/AgCl-NPs ou com os antibióticos penicilina e estreptomicina.....	45
5.1.5. Ensaio de recuperação das bactérias <i>S. typhi</i> e <i>S. pyogenes</i> após tratamentos por 24 horas com Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomicina.....	48
5.1.6. Segundo ciclo de ensaio antiproliferativo com Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomicina contra <i>S. pyogenes</i> e <i>S. typhi</i> .....	51
5.1.7. Análise da eficácia dos tratamentos com Ag/AgCl-NPs e os antibióticos penicilina e estreptomicina a partir da determinação do IC <sub>50</sub> .....	56
5.1.8. Ensaio antiproliferativo nas leveduras <i>C. albicans</i> e <i>C. lusitaniae</i> com Ag/AgCl-NPs e o antibiótico anfotericina B.....	58
5.1.9. Ensaio de recuperação das leveduras <i>C. albicans</i> e <i>C. lusitaniae</i> após tratamentos por 72 horas com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B.....	61
5.1.10. Segundo ciclo de ensaio antiproliferativo com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B contra <i>C. albicans</i> e <i>C. lusitaniae</i> .....	62
5.1.11. Análise da eficácia dos tratamentos com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B a partir da determinação do IC <sub>50</sub> .....	66
5.2. Avaliação da atividade antitumoral em glioblastoma multiforme (GBM02) de Ag/AgCl-NPs produzidas por <i>C. lusitaniae</i> .....	68
5.2.1. Ensaio antiproliferativo de células tumorais (GBM02) e astrócitos humanos tratados com Ag/AgCl-NPs e o quimioterápico temozolamida (TMZ).....	68

5.2.2. Taxa de crescimento e tempo de duplicação da população de GBM02 e astrócitos humanos tratados com Ag/AgCl-NPs e o quimioterápico TMZ.....	75
5.2.3. Análise da eficácia dos tratamentos com Ag/AgCl-NPs e TMZ a partir da determinação do IC <sub>50</sub> .....	79
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Nanotecnologia

Nanotecnologia é a área do conhecimento que envolve o estudo, produção, manipulação e uso de materiais em escala nanométrica (CRUZ, 2010). Um nanomaterial é atualmente definido como qualquer material natural, acidental ou produzido que contenha partículas, agregadas ou livres, e nas quais 50% ou mais das partículas, em uma ou mais dimensões externas, se encontram no intervalo de tamanhos entre 1 e 100 nm (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

O conceito de nanociência e nanotecnologia foi introduzido no final da década de 1960 pelo físico americano, ganhador do prêmio Nobel, Richard Feynman. Durante a palestra “Há muito espaço lá embaixo”, Feynman afirmou que a manipulação e o controle da matéria em pequena escala seriam o futuro da ciência. Pouco mais de 10 anos depois, em 1970, foi desenvolvido o primeiro microscópio que permitia a visualização de átomos individuais, um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução. A partir de então, a nanotecnologia começou a se desenvolver (CREWE *et al.*, 1970; ALBERNAZ, 2014).

Apesar de ser um campo da ciência ainda considerado jovem, tem atraído a atenção de pesquisadores do mundo inteiro de forma crescente, principalmente devido às propriedades diferenciadas que os materiais em nanoescala apresentam quando comparado aos materiais em macro e microescala. Propriedades físicas, químicas e/ou biológicas podem apresentar diferenças que colocam a nanotecnologia como a ciência do futuro, com uma vasta gama de novas possibilidades dentro da pesquisa científica a serem exploradas nas próximas décadas (BUZEA *et al.*, 2007).

### 1.1.1. Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia é uma área da ciência mais atual que a nanotecnologia, porém estão intimamente relacionadas e são igualmente promissoras. Definido de maneira sucinta, o termo nanobiotecnologia pode ser usado para descrever a interface entre a biologia e a nanotecnologia. Alternativamente, o termo define qualquer aplicação da nanotecnologia na pesquisa biológica, tais como a descoberta de medicamentos e dispositivos de distribuição de drogas, ferramentas de diagnóstico, terapêutica ou novos biomateriais (PAULL *et al.*, 2003).

Uma ramificação da nanobiotecnologia, que surgiu através da necessidade da criação de modelos que caminhassem na direção do desenvolvimento sustentável, é a nanobiotecnologia verde. Segundo o Relatório Brundtland, elaborado pela Comissão Mundial sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (1991), o desenvolvimento sustentável procura satisfazer as necessidades da geração atual, sem comprometer a capacidade das gerações futuras de satisfazerem as suas próprias necessidades, possibilitando que as pessoas, agora e no futuro, atinjam um nível satisfatório de desenvolvimento social e econômico e de realização humana e cultural, fazendo, ao mesmo tempo, um uso razoável dos recursos da terra e preservando as espécies e os habitats naturais. Dentro deste novo contexto global, a nanobiotecnologia verde ganha ainda mais importância, pois tem como base o desenvolvimento de tecnologias ecologicamente corretas, ao mesmo tempo que economicamente viáveis, que são as necessidades do momento na direção do desenvolvimento sustentável. Além disso, a nanobiotecnologia verde visa projetar novos produtos que sejam igualmente úteis tanto para saúde humana quanto do ambiente (ACS *Green Chemistry Institute*® & *Oregon Nanoscience and Microtechnologies Institute*, 2011). Como exemplo de processo que se enquadra aos princípios da nanobiotecnologia verde, pode-se citar a síntese de nanopartículas (NPs) através de métodos biotecnológicos (RAI, 2013).

## **1.2. Nanopartículas**

Segundo a EUROPEAN COMMISSION (2011), nanopartículas são definidas como materiais naturais, acidentais ou produzidos artificialmente que contenham partículas, em que pelo menos 50% da sua população contenha uma ou mais dimensões externas na faixa de tamanho de 1-100 nm, podendo desempenhar um papel de grande importância no desenvolvimento de novas tecnologias. Existem diferentes tipos de nanopartículas, cada uma com uma particularidade em termos de aplicação tecnológica. Além disso, elas podem ser divididas em dois grandes grupos, as não-metálicas e as metálicas.

### **1.2.1. Nanopartículas não-metálicas**

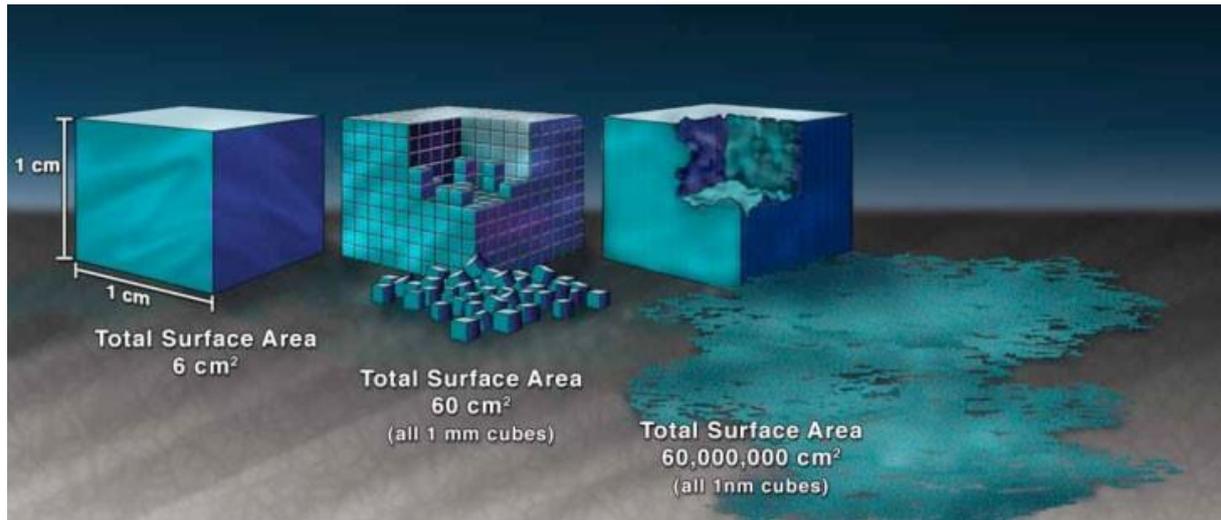
Dentre os tipos de nanopartículas não-metálicas, podemos citar as NPs lipídicas, onde se destacam os lipossomas, que são vesículas de bicamada concêntricas, no qual um volume aquoso é inteiramente fechado por uma bicamada lipídica membranosa (RAWAT *et al.*, 2006). Apresentam uma série de vantagens em termos de caráter anfifílico e

biocompatibilidade, podendo ser um sistema de entrega adequado para medicamentos biotecnológicos. Outro tipo de NPs são as poliméricas formadas por polímeros biodegradáveis. Biocompatibilidade é uma característica essencial para a aplicação em engenharia tecidual (entrega de drogas e genes) além de novas estratégias de vacinação. A maioria dos polímeros biodegradáveis consistem em poliésteres sintéticos, tais como policianoacrilato ou poli-(D, L-láctico) e polímeros relacionados, como poli-ácido-láctico (PLA) ou poli-láctido-co-glicólido (PLG) (KAYSER *et al.*, 2005). Desenvolvimentos mais recentes incluem polímeros naturais como quitosana e alginato de sódio, para superar alguns problemas toxicológicos que acontecem com os polímeros sintéticos. NPs de carbono, como os fulerenos, têm atraído bastante atenção nos últimos anos. Algumas características dessas NPs como o tamanho, geometria e superfície os tornam atraentes para o uso como carreadores de drogas (ABHILASH, 2010).

### 1.2.2. Nanopartículas metálicas

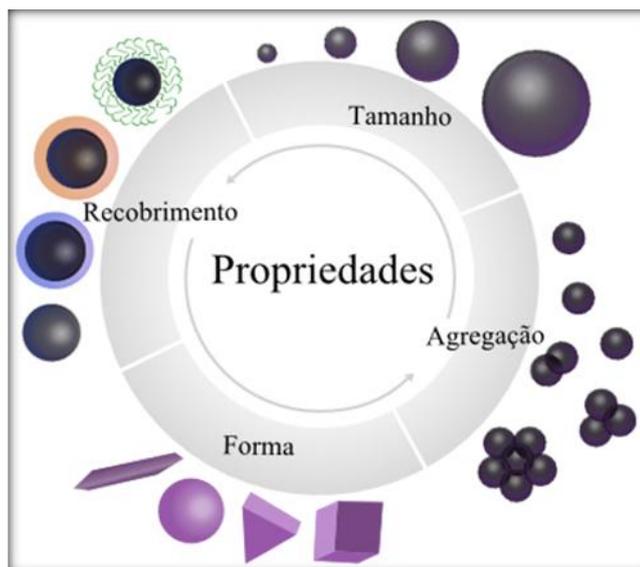
Dentre a grande variedade de NPs disponíveis para estudo, as nanopartículas metálicas (NPMs) possuem um grande destaque. Devido a sua faixa de tamanho (1-100 nm) e reatividade das faces cristalinas, as NPMs apresentam comportamentos diferenciados quando comparadas aos seus equivalentes macroestruturados. Como exemplo, pode-se citar o ouro, que apresenta uma variação da propriedade óptica quando se altera o tamanho. O ouro enquanto sólido micro ou macroestruturado (*bulk gold*), possui a cor amarela, entretanto, NPs de ouro de 100 nm apresentam uma cor púrpura-rosado, enquanto que NPs de 20 nm são vermelhas e as de 1 nm são de cor marrom-amarelada (RAI, 2013; ALBERNAZ, 2014).

Esses comportamentos diferenciados são explicados por duas características fundamentais das NPMs: (1) mudanças em propriedades físico-químicas da matéria, incluindo mudanças ópticas, elétricas e magnéticas que estão relacionadas com o tamanho das NPMs e (2) a razão entre a área de superfície e o volume das NPMs que aumenta significativamente com a diminuição do seu diâmetro, fazendo com que elas se tornem mais reativas (Fig. 1). Portanto, algumas das aplicações das NPMs estão relacionadas às áreas em que a relação de área de superfície/volume é importante, tais como as indústrias catalíticas e microbicidas (BUZEA *et al.*, 2007).



**Figura 1. Evolução da área superficial com a diminuição das dimensões de um cubo.** Um cubo com lados de 1 cm ocupa uma área de  $6 \text{ cm}^2$ , enquanto que, se o mesmo cubo fosse transformado em 1.000 cubos com lados de 1 mm, ocupariam uma área de  $60 \text{ cm}^2$  e, se os lados desses cubos fossem diminuídos ainda mais, para 1 nm, poderiam ocupar uma área de  $60.000.000 \text{ cm}^2$ . Fonte: Site do *National Nanotechnology Initiative* ([www.nano.gov](http://www.nano.gov)).

Algumas dessas propriedades físico-químicas únicas das NPMs são dependentes e podem variar de acordo com fatores importantes, que vão moldar seus comportamentos, tanto microscópicos quanto macroscópicos. A Fig. 2 representa esses fatores de interferência, que incluem (a) o tamanho, (b) o estado de agregação e concentração, que estão relacionados com a reatividade, devido à razão área de superfície/volume, (c) a forma, relacionada com a reatividade e condutividade, (d) a composição química da superfície e (e) a presença de agentes de revestimento, que estão relacionados com a maneira que as NPMs vão interagir com outros sistemas, por exemplo, penetrar em uma célula rompendo a membrana plasmática ou sendo endocitada (GRASSIAN, 2008).



**Figura 2. Alguns fatores que podem influenciar nas propriedades físico-químicas únicas das NPMs.** Fonte: Albernaz, 2014.

Atualmente, são produzidas NPMs de diversos elementos, tais como a prata (JEYARAJ *et al.*, 2013), ouro (MELO JR. *et al.*, 2012), cobre (SOOMRO *et al.*, 2013), zinco (NAGARAJAN & KUPPUSAMY, 2013), titânio (SHI *et al.*, 2013), bimetálicas de prata e ouro (BOOTE *et al.*, 2013), cloreto de prata (VILLANUEVA-IBÁÑES *et al.*, 2015), dentre outras.

Como exemplo de aplicações de alguns tipos de NPMs, podemos citar as de ouro (AuNPs), que são usadas como sondas fluorescentes ultra-sensíveis para detectar biomarcadores de câncer no sangue humano, incluindo câncer de fígado, pulmão e mama (ABHILASH, 2010). Além disso, AuNPs foram usadas para transportar os chamados *killer genes* que podem suprimir o crescimento de tumores de ovário em ratos, podendo se tornar um novo tratamento para o câncer de ovário (ABHILASH, 2010). Nanopartículas de cobre (CuNPs), que são potencialmente aplicadas nos campos de catálise, fluidos de arrefecimento e de tintas condutoras. Devido a ressonância plasmônica de superfície, as CuNPs apresentam propriedades ópticas não-lineares, o que permite larga aplicação em dispositivos e materiais não-lineares, como interruptores ópticos (SOOMRO *et al.*, 2013). CuNPs também têm sido investigadas quanto ao seu efeito antimicrobiano, demonstrando atividade biocida contra bactérias e fungos (RAMYADEVI *et al.*, 2012). Nanopartículas de zinco, que têm sido utilizadas como veículos de fármacos, na indústria dos cosméticos, assim como, também podem ser usadas em processos de tratamento de efluentes para a redução da carga microbiana (NAGARAJAN & KUPPUSAMY, 2013). Nanopartículas de dióxido de titânio,

que devido a sua forte atividade catalítica, têm sido amplamente utilizadas em produtos industriais e de consumo, principalmente produtos de cuidados pessoais, tais como protetores solares tópicos e cosméticos (SHI *et al.*, 2013; WEIR *et al.*, 2012).

Dentre os vários tipos de NPMs, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido majoritariamente escolhidas, tanto para estudo quanto para aplicações em diversas áreas industriais e biomédicas.

### 1.3. Nanopartículas de prata (AgNPs)

Ao longo da história, a prata e os seus compostos têm sido amplamente utilizados em muitas aplicações, como resultado das suas propriedades antimicrobianas bastante úteis. Acredita-se que a prata já era conhecida e usada há muitos séculos, inclusive antes do que a história registra. Os antigos egípcios e persas utilizavam vasos de prata para manter a água limpa e segura, enquanto romanos e gregos já conheciam o seu poderoso efeito bactericida e usavam a prata para curar feridas. Durante o século XIX, além de remédios caseiros, a prata era aplicada na medicina prática, como no tratamento dos olhos e de úlceras de pele. Na Primeira Guerra Mundial, compostos de prata foram usados para prevenir a infecção de feridas antes do surgimento dos antibióticos (VARNER *et al.*, 2010). Atualmente, a prata tem um extenso número de aplicações, incluindo o uso em sistemas de tratamento de água (JAIN & PRADEEP, 2005), na indústria catalítica (PATEL *et al.*, 2007), em dispositivos ópticos (ANDERSON & MOSKOVITS, 2006), tecnologia de sensores (VASEASHTA & DIMOVA-MALINOVSKA, 2005), marcadores biológicos (JAIN & AGGARWAL, 2012), carreadores de drogas (ALIEV *et al.*, 2009), dentre muitos outros. As AgNPs, assim como as demais NPMs, possuem muitas características diferenciadas em comparação com a prata na forma *bulk*, portanto, todas as aplicações já conhecidas e usadas da prata macroscópica puderam ser melhor exploradas, ampliando assim a eficiência e a qualidade da aplicação deste metal (NAGHDI *et al.*, 2015).

A prata é o segundo elemento usado na indústria, ficando atrás apenas do carbono, além disso, as AgNPs são os nanomateriais que mais são incorporados em produtos de consumo. Cerca de um terço de todos os produtos atualmente registrados em bancos de dados de nano-produtos indicam conter AgNPs em sua composição (REIDY *et al.*, 2013). AgNPs têm sido amplamente utilizadas como agentes antibacterianos e/ou antifúngicos em uma variada gama de produtos, incluindo *sprays* desinfetantes, meias, travesseiros, chinelos, cosméticos, lenços umedecidos, detergentes, sabão, shampoo, pasta de dente, filtros de ar,

revestimentos de refrigeradores, aspiradores de pó, máquinas de lavar roupa (o modelo AG plus, da Samsung, por exemplo, libera AgNPs para desinfetar as roupas quando operando no modo *silver sterilization*), embalagens para armazenar alimentos, capas para telefones celulares, tintas, estofados de automóveis e até mesmo em preservativos líquidos (VARNER *et al.*, 2010). A principal razão para essa prevalência é o seu forte efeito antimicrobiano contra uma ampla variedade de organismos (RAI *et al.*, 2014).

Nanopartículas a base de prata que recebem pouco destaque na pesquisa científica e em aplicações industriais são as nanopartículas de prata associadas aos íons de cloreto, chamadas de nanopartículas de cloreto de prata (AgCl-NPs) (VILLANUEVA-IBÁÑES *et al.*, 2015) e nanopartículas de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl-NPs) (DURÁN *et al.*, 2014). Por conter em sua composição prata, esses tipos de NPs compartilham muitas características observadas nas AgNPs, como por exemplo a liberação de íons  $\text{Ag}^+$ .

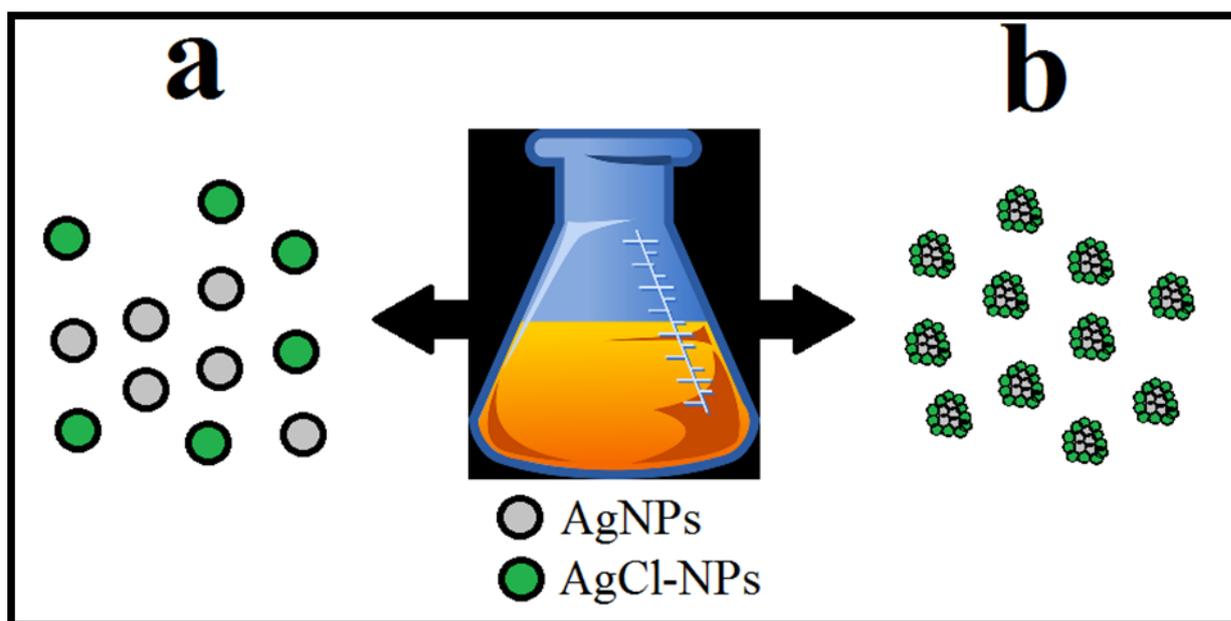
### 1.3.1 Nanopartículas de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl-NPs)

As nanopartículas de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl-NPs) têm sido estudadas como mais uma alternativa para o uso biomédico (DURÁN *et al.*, 2014). As Ag/AgCl-NPs biossintetizadas pelo nosso grupo a partir de culturas da levedura *Candida lusitanae* demonstraram forte efeito antiproliferativo contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (EUGENIO *et al.*, 2016). Portanto, a ação dessas NPs na área biomédica merece ser mais explorada para aperfeiçoar as aplicações já consolidadas das AgNPs.

Os primeiros registros de síntese de Ag/AgCl-NPs foram feitos há menos de uma década (VIGNESHWARAN *et al.*, 2007) e estas surgiram com a proposta de ampliar ou aumentar a eficiência do uso das AgNPs. Como esse tipo de nanopartícula compartilha muitas características físico-químicas das AgNPs, as aplicações delas são bem semelhantes, incluindo aplicações biomédicas e catalíticas (DEVI *et al.*, 2016; EUGENIO *et al.*, 2016). Entretanto, estudos avaliando o potencial biomédico são mais recentes - tendo como pioneiro o trabalho de SATHISHKUMAR *et al.* (2010) - e até o momento se limitando ao efeito antibacteriano e antifúngico, segundo revisão publicada por DURÁN *et al.* (2016).

As Ag/AgCl-NPs podem se apresentar de duas formas diferentes, de acordo com o seu comportamento e estrutura em solução. Uma possibilidade é produzir NPs de prata e de cloreto de prata na mesma solução coloidal, como representado na Fig. 3a. Deste modo, o efeito da solução coloidal contendo as Ag/AgCl-NPs poderá ser devido a ação unicamente de

um tipo de NP ou de ambos os tipos (VIGNESHWARAN *et al.*, 2007; DURÁN *et al.*, 2016). Em uma segunda possibilidade, as Ag/AgCl-NPs podem ser produzidas como um híbrido contendo NPs de prata e de cloreto de prata (Fig. 3b). Nessa conformação, o efeito das NPs será necessariamente a partir de ambas, cloreto de prata e prata (GOPINATH *et al.*, 2013). A caracterização do tipo de Ag/AgCl-NP produzida necessita do uso de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (para a determinação da estrutura cristalina) acoplada ao detector de energia dispersiva de raios-X (para a caracterização elementar). Portanto, ainda há na literatura muitos trabalhos, incluindo estudos recentes, sem a caracterização completa das Ag/AgCl-NPs; em alguns casos podendo levar a interpretações equivocadas dos resultados obtidos, como por exemplo concluir que foram produzidas biologicamente AgNPs quando na verdade foram produzidas Ag/AgCl-NPs (MATHEW *et al.*, 2015; GADE *et al.*, 2011, DURÁN *et al.*, 2016). Entretanto esse não tem sido considerado um fator determinante para utilização destas NPs na área biomédica, industrial ou ambas.



**Figura 3. Desenho esquemático mostrando os dois prováveis tipos de Ag/AgCl-NPs.** (a) Tipo de Ag/AgCl-NP no qual as NPs de prata e cloreto de prata são formadas individualmente na mesma solução coloidal. (b) Tipo de Ag/AgCl-NP em que é formado um híbrido contendo AgNPs e AgCl-NPs. Fonte: Arquivo pessoal.

O método de síntese das Ag/AgCl-NPs é um passo chave para análise do seu custo-benefício, pois as diferentes metodologias terão vantagens e desvantagens com relação ao custo de produção, danos ao meio ambiente e aplicação biomédica (VARNER *et al.*, 2010).

### 1.3.1.1. Ag/AgCl-NPs de origem física e química

De nosso conhecimento, não existem trabalhos que mostram síntese de Ag/AgCl-NPs por métodos físicos. Esses métodos são conhecidos por gerar NPs com distribuição de tamanhos muito estreita e produzir grandes quantidades de amostras de NPs em um único processo. Os custos altamente elevados dos equipamentos usados e a baixa produtividade durante o processo tornam menos vantajoso o uso destes métodos (TRAN *et al.*, 2013).

Os poucos trabalhos de produção de Ag/AgCl-NPs por síntese química (SONG *et al.*, 2013) podem ser reflexo das desvantagens destas metodologias, que incluem a geração de resíduos potencialmente nocivos à saúde e ao meio ambiente e o acúmulo de resíduos químicos na suspensão final dos processos de síntese, prejudicando sua aplicação biomédica (EL-BADAWY *et al.*, 2010), a despeito das vantagens de ser uma produção considerada fácil e de baixo custo (TRAN *et al.*, 2013, ALBERNAZ *et al.*, 2014). Entretanto não podemos descartar a hipótese de que a falta de trabalhos seja devido à negligência na caracterização das NPs produzidas, como ocorre no caso das produzidas biologicamente, como reportado por DURÁN *et al.* (2016). Além disso, a síntese de Ag/AgCl-NPs é relativamente recente (VIGNESHWARAN *et al.*, 2007), por isso muitos grupos podem ainda preferir trabalhar com AgNPs.

Enquanto há muito pouco na literatura sobre produção física e química de Ag/AgCl-NPs, podemos encontrar inúmeros trabalhos que realizaram esses dois tipos de síntese para obter AgNPs, talvez pelo fato dessas NPs serem estudadas há muito mais tempo (ALBERNAZ, 2014; MAFUNÉ *et al.*, 2000; HYNING & ZUKOSKY, 1998).

Grande parte das Ag/AgCl-NPs são produzidas por métodos biológicos, através de microrganismos (DURÁN *et al.*, 2016). Isto ocorre devido a maioria dos meios de cultivo conterem cloreto de sódio na sua composição, liberando íons cloreto para formação das Ag/AgCl-NPs (ATLAS, 2010). O uso de métodos biológicos pode ser muito atraente devido a algumas vantagens com relação às metodologias químicas e físicas.

### 1.3.1.2. Ag/AgCl-NPs de origem biológica

A síntese biológica (também chamada de síntese verde) de Ag/AgCl-NPs, tem muitas semelhanças com a síntese química, entretanto, a síntese biológica tem como objetivo principal a utilização de sistemas biológicos (microrganismos ou extratos de plantas) como substitutos dos reagentes químicos tóxicos nas reações de síntese das Ag/AgCl-NPs. Esses microrganismos atuam como o agente redutor no processo de redução dos íons de prata à prata metálica (formando as Ag/AgCl-NPs), a partir de um precursor, apresentando-se como uma alternativa sustentável e ecologicamente amigável (ALBERNAZ, 2014; GOPINATH *et al.*, 2013). Essa rota de síntese tende a utilizar solventes de toxicidade nula, os quais levam a um impacto ambiental desprezível, quando há. Além disso, o custo de produção é geralmente mais baixo que os métodos físicos de produção e pode-se obter um alto rendimento do produto de interesse (ALBERNAZ, 2014). Quando comparada aos métodos químicos, a relação custo-benefício da síntese biológica de Ag/AgCl-NPs é melhor, por conta de o custo de produção ser semelhante, porém sem os impactos ambientais da produção química (AZEVEDO *et al.*, 2015).

Uma vasta gama de organismos e microrganismos são utilizados para produção de Ag/AgCl-NPs, dentre eles podem ser citados plantas (GOPINATH *et al.*, 2013), microalgas (AZZIZ *et al.*, 2015), bactérias (SINGH *et al.*, 2015), fungos filamentosos (VANAJA *et al.*, 2015) e leveduras (EUGENIO *et al.*, 2016).

Apesar do uso de inúmeros organismos, carecem trabalhos que façam uso da produção de Ag/AgCl-NPs através de leveduras (DURÁN *et al.*, 2016; EUGENIO *et al.*, 2016), a despeito das claras vantagens da utilização deste microrganismo. Há milênios o homem vem utilizando espécies de leveduras para a produção de pão, cerveja, vinho e outros alimentos obtidos a partir da fermentação. As leveduras são um dos microrganismos mais importantes do mundo para a indústria, e suas culturas em escala industrial têm sido usadas há décadas, de forma que esta tecnologia já é muito bem conhecida e estabelecida (FREY, 1930; SCHNEITER, 2004). Desse modo, a transição para a produção de Ag/AgCl-NPs em larga escala no futuro poderia ser menos complexa.

## 1.4. Aplicações biomédicas de AgNPs e Ag/AgCl-NPs

As AgNPs são eficazes contra um largo espectro de bactérias patogênicas gram-negativas e gram-positivas, inclusive cepas resistentes a antibióticos. Dentre as bactérias que

se mostraram sensíveis ao tratamento com AgNPs estão as gram-positivas *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Além disso, são sensíveis também as Gram-negativas *Acinetobacter* spp., *Vibrio* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aueruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris* (JAIN & AGGARWAL, 2012; VARNER *et al.*, 2010; RAI *et al.*, 2014).

Atividade antifúngica de AgNPs é menos estudada, quando comparada à atividade antibacteriana. Isto é claramente ilustrado pelo número de publicações: para cada artigo publicado sobre efeitos antifúngicos, nove são publicados relatando os efeitos antibacterianos (RAI *et al.*, 2014). As AgNPs são fungicidas eficazes e de ação rápida contra um amplo espectro de fungos, incluindo os gêneros *Aspergillus* spp., *Candida* spp. e *Saccharomyces* spp. (VARNER, 2010, KIM *et al.*, 2008). Além destes, outros trabalhos mostraram efeitos sobre *Phoma glomerata*, *P. herbarum*, *Fusarium semitectum*, *Trichoderma* spp. e *Alternaria* spp. (GAJBHIYE *et al.*, 2009, XU *et al.*, 2013).

AgNPs receberam grande atenção da comunidade científica com relação as suas atividades antibacterianas, mas as propriedades antivirais de AgNPs continua sendo uma área pouco desenvolvida e com muito a ser explorado. Dentre os vírus já estudados e que demonstraram sensibilidade ao tratamento com AgNPs estão o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), vírus da herpes simples tipo 1 e tipo 2 (HSV-1 e HSV-2), vírus sincicial respiratório, vírus da hepatite B (HBV), vírus da influenza, vírus da varíola dos macacos, dentre outros (GALDIERO *et al.*, 2011, RAI *et al.*, 2014).

Apesar de muitas das doenças causadas por protozoários serem doenças negligenciadas que afetam milhões de pessoas em todo o mundo (MARR *et al.*, 2012), existem poucos trabalhos avaliando os efeitos tóxicos de AgNPs em protozoários. *Giardia lamblia*, *Leishmania tropica*, *Leishmania amazonensis*, *Cryptosporidium parvum* e *Plasmodium falciparum* estão entre as espécies sensíveis ao tratamento com AgNPs (RAI *et al.*, 2014).

A eficácia de AgNPs como um agente antitumoral foi demonstrada *in vitro* e *in vivo*. A indução de danos celulares após a exposição a AgNPs, tais como perda de integridade da membrana celular, estresse oxidativo e apoptose foram relatados em células de câncer de mama humano (MCF-7) (JEYARAJ *et al.*, 2013). SRIRAM *et al.*, (2010) revelaram uma citotoxicidade dependente da dose em células de linfoma ascítico de Dalton por indução de apoptose. Além disso, os autores demonstraram a ação protetora durante a administração das AgNPs em camundongos portadores do tumor. Em ensaios de citotoxicidade na linhagem Hep2 (células de carcinoma da laringe), ROSARIN *et al.*, (2012) demonstraram a morte

celular, alterações morfológicas apoptóticas, despolarização mitocondrial, danos no DNA e estresse oxidativo. O uso de AgNPs contra o glioblastoma multiforme tem sido relatada em alguns estudos recentes, apontando as AgNPs como uma ferramenta promissora para a terapia deste agressivo câncer (URBANSKA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2014; LOCATELLI *et al.*, 2014). Além desses, outros tipos de câncer foram estudados e apresentaram sensibilidade ao tratamento com AgNPs (RAI *et al.*, 2014).

Segundo DURÁN *et al.* (2016), existem algumas inconsistências e equívocos na literatura com relação à caracterização de Ag/AgCl-NPs, a respeito da diferenciação entre os seus dois tipos (Fig. 3) e também distingui-las das AgNPs e AgCl-NPs. Este equívoco afeta a interpretação adequada dos efeitos antimicrobianos das Ag/AgCl-NPs e prejudica a comparação da eficiência de todas as NPs baseadas em prata. Os autores dessa revisão realizaram uma reinterpretação de dados já publicados de síntese, caracterização e avaliação dos efeitos antimicrobianos de Ag/AgCl-NPs e mostraram que apenas o efeito antibacteriano contra *E. coli* (VANAJA *et al.*, 2015), *S. aureus* (IBRAHIM, 2015; EUGENIO *et al.*, 2016), *K. pneumoniae* (EUGENIO *et al.*, 2016), *P. aeruginosa* (NAMASIVAYAM *et al.*, 2015), *B. subtilis* (MARCATO & DURÁN, 2011), e antifúngico contra *C. albicans* (LONGHI *et al.*, 2016) foi corretamente relatado anteriormente. Ainda assim, o número de trabalhos e espécies microbianas estudadas é bastante distante da quantidade de publicações de efeitos de AgNPs em bactérias e fungos.

Embora o número de trabalhos avaliando os efeitos antibacterianos de Ag/AgCl-NPs tenham crescido nos últimos 5 anos, ainda há uma deficiência no estudo dessa área. Além disso, existem poucos trabalhos avaliando os efeitos antifúngicos; sendo todos concentrados na espécie *C. albicans*, existindo ainda uma grande lacuna a ser estudada na área dos antifúngicos baseados em Ag/AgCl-NPs (DURÁN *et al.* 2016).

A despeito da perspectiva de aumento de trabalhos estudando bactérias e fungos, não há na literatura qualquer trabalho que avalie os efeitos antitumorais de Ag/AgCl-NPs, contrastando com a enorme quantidade de literatura disponível sobre esses efeitos com AgNPs (RAI *et al.*, 2014; JEYARAJ *et al.*, 2013; SRIRAM *et al.* 2010; ROSARIN *et al.*, 2012; URBANSKA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2014; LOCATELLI *et al.*, 2014). Além disso, também não há trabalhos que avaliem o uso de Ag/AgCl-NPs contra protozoários parasitas e vírus, neste caso, apresentando quadro semelhante ao estudo com AgNPs, existindo escassos trabalhos e com poucas espécies avaliadas (RAI *et al.*, 2014; GALDIERO *et al.*, 2011).

### 1.5. Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é uma das ameaças mais graves para a saúde. As infecções causadas por bactérias resistentes atualmente são muito comuns, e alguns patógenos têm se tornado resistentes a vários tipos ou classes de antibióticos (bactérias multirresistentes). A perda de antibióticos eficazes irá prejudicar a capacidade dos hospitais de combater doenças infecciosas e também resolver as complicações infecciosas comuns em pacientes vulneráveis submetidos à quimioterapia para o câncer, diálise por insuficiência renal e cirurgias, especialmente o transplante de órgãos, para o qual a capacidade de tratamento de infecções secundárias é crucial. Pesquisas recentes mostram que pacientes com infecções resistentes muitas vezes são muito mais propensos a morrer, e os sobreviventes têm estadias significativamente mais longas nos hospitais, com lenta recuperação (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (em inglês: *Center for Disease Control and Prevention* - CDC) divulgou um levantamento apontando que todos os anos, nos Estados Unidos, pelo menos 2 milhões de pessoas adquirem infecções graves por bactérias que são resistentes a um ou mais dos antibióticos concebidos para tratar essas infecções. E que pelo menos 23 mil pessoas morrem a cada ano como resultado direto destas infecções por bactérias resistentes. Além disso, esse número aumenta se considerar as pessoas que morrem de outras moléstias decorrentes de complicações por uma infecção resistente aos antibióticos (CDC, 2013).

### 1.6. Resistência fúngica

Os recursos alocados para estudar, monitorar e reduzir a resistência aos medicamentos antifúngicos são bastante limitados, principalmente em comparação aos antibacterianos. Portanto, poucos países exercem essa vigilância, existindo lacunas significativas de informações na Ásia, África, Oriente Médio e América do Sul. A grande consequência dessa falta de recursos é a pouca realização de testes para novos antifúngicos na maioria dos países contidos nesses continentes, além disso, a resistência fúngica nesses locais é desconhecida (OMS, 2014).

A candidíase é uma infecção fúngica causada pela levedura *Candida spp.*, e é a causa mais comum de infecção fúngica em todo o mundo. As infecções por *Candida spp.* invasivas são um problema de saúde pública persistente e cada vez mais importante, especialmente para

as populações vulneráveis, como pacientes com câncer, transplantados, recém-nascidos e/ou em unidades de terapia intensiva (PFALLER & DIEKEMA, 2012). Em algumas partes do mundo, a candidemia é a causa mais comum de todas as infecções da corrente sanguínea relacionadas com catéteres vasculares. A terapêutica antifúngica inadequada está associada com aumento da mortalidade, aumento dos custos, e uma maior carga de espécies de *Candida* spp. insensíveis ao fluconazol, fármaco mais usado para o seu tratamento (OMS, 2014).

Atualmente, existem apenas três classes de agentes antifúngicos disponíveis para tratar infecções graves por *Candida* spp.: os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol), as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) e os polienos (anfotericina B e suas formulações lipossomais, complexo lipídico e dispersão coloidal) (BLYTH *et al.*, 2007). Os triazóis são usados com mais frequência para o tratamento das candidíases, mas algumas espécies são inerentemente menos sensíveis aos triazóis, e algumas espécies desenvolvem resistência durante a terapia prolongada (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2011). As equinocandinas, quando disponíveis, são o tratamento empírico de escolha, pois possuem excelente espectro de ação e potência. As formulações de anfotericina B estão disponíveis em muitos países, mas este agente tem toxicidade mais elevada que os azóis e equinocandinas (PFALLER *et al.*, 2011; OMS, 2014). Algumas espécies de *Candida* spp., como *C. lusitanae*, podem desenvolver resistência durante terapia com anfotericina B. Em alguns países em desenvolvimento, apenas uma única classe de medicamento antifúngico está disponível e, se a resistência se desenvolve, não existem outras opções de tratamento (OMS, 2014; SMITH *et al.*, 2005). Além disso, a OMS (2014) chama atenção para o crescimento da resistência aos azólicos, e o surgimento da resistência às equinocandinas. É provável que a carga global de resistência aumente em todo mundo.

Com o advento da resistência bacteriana e fúngica, e a consequente diminuição da atividade de inúmeros importantes antibióticos, muitos pesquisadores têm como objetivo a busca de novos fármacos para uso terapêutico contra essas infecções resistentes. Nesse contexto, o uso de Ag/AgCl-NPs para tratamentos antibacterianos e antifúngicos pode ser mais uma alternativa para a falta de efetividade de muitos fármacos, visto que as AgNPs já demonstraram efeitos citotóxicos contra bactérias multirresistentes em estudos anteriores (FIOL *et al.*, 2000; VARNER *et al.*, 2010) e contra leveduras também (ASHOUR, 2014). As Ag/AgCl-NPs podem ainda ser usadas em conjunto com antibióticos, para potencializar seus efeitos citotóxicos e alguns estudos anteriores com AgNPs têm avaliado essa hipótese (NAQVI *et al.*, 2013; MUÑOZ *et al.*, 2014, SILVA *et al.*, 2015), entretanto não há relatos de estudos com Ag/AgCl-NPs. Além disso, há um consenso na comunidade científica de que

resistência microbiana à prata elementar é algo extremamente raro, devido a presença de múltiplos mecanismos microbicidas das NPs que atuam em sinergia, ao contrário da maioria dos antibióticos, que atuam direcionados a um único alvo (SILVER, 2003; FRANCI *et al.*, 2015), sendo válido gerar mais dados para fortalecer essa teoria.

## 1.7. Neoplasia

As células neoplásicas ou tumorais são definidas por duas propriedades hereditárias: (1) reproduzem-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular e (2) invadem e colonizam regiões normalmente destinadas à outras células. Uma célula normal que cresce e se prolifera fora de controle dará origem a um tumor. Entretanto se as células tumorais não forem invasivas, ou seja, se não tiverem a capacidade de se desprender do tecido original, penetrar na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos para formar tumores secundários (metástases), o tumor é considerado benigno. Nesse caso, pode haver remissão completa pela destruição ou remoção cirúrgica da massa tumoral. Um tumor é considerado neoplasia apenas se for maligno, ou seja, se tiver a capacidade de invadir tecidos adjacentes e formar metástases, que quanto mais se dispersar, mais difícil será erradicá-lo. Em geral, são as metástases que levam o paciente à morte (ALBERTS *et al.*, 2010).

Existem mais de 100 tipos diferentes de neoplasias, podendo surgir em qualquer parte do corpo, sendo que alguns órgãos são mais afetados do que outros. Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), órgão do Ministério de Saúde, voltado a ações nacionais integradas para o controle e prevenção de neoplasia, os órgãos mais afetados pelo câncer, no Brasil, são o pulmão, mama, colo do útero, próstata, cólon e reto (intestino grosso), pele, estômago, esôfago, medula óssea (leucemias) e cavidade oral (boca). Cada um desses órgãos, por sua vez, pode ser afetado por tipos diferenciados de tumor, menos ou mais agressivos (INCA, 2015).

As causas das neoplasias são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. De todos os casos, cerca de 90% das neoplasias estão associadas a fatores ambientais (ALBERTS *et al.*, 2010). Os mais conhecidos são o tabagismo, que pode causar câncer de pulmão, boca, faringe, laringe e esôfago, pâncreas, rins, bexiga, dentre outros (FILHO *et al.*, 2010), o consumo de álcool, que pode causar câncer de

mama feminino, boca, faringe, laringe, esôfago, fígado, colorretal e há alguma evidência de associação com o câncer de pâncreas (KUSHI *et al.*, 2012), e a exposição excessiva ao sol, que pode causar câncer de pele (ALBERTS *et al.*, 2010).

### 1.7.1 Glioblastoma multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo de tumor cerebral primário mais comum e mais agressivo em seres humanos, com uma taxa de incidência de 3,2 novos casos diagnosticados a cada 100.000 pessoas, uma mortalidade de 100% e uma sobrevida média de cerca de 12-15 meses (ARVOLD & REARDON, 2014). É uma neoplasia constituída por células da glia, sendo responsável por 50% de todos os tumores cerebrais parenquimatosos, que por sua vez, representam 50% dos tumores cerebrais primários (ALVES *et al.*, 2011). Médicos e cientistas tiveram sucesso muito limitado em prolongar a sobrevivência dos pacientes que sofrem de GBM, desde a introdução da terapia de radiação pós-cirúrgica, no final dos anos 1970 (GOLDLUST *et al.*, 2008).

Os gliomas, tumores primários de potencial maligno do cérebro, são divididos em dois tipos: tumores astrogliais e oligodendrogliais, estes são adicionalmente classificados por grau de agressividade, podendo ser considerados de baixo grau (grau II, segundo a OMS) ou de alto grau (graus III e IV, segundo a OMS) (LOUIS *et al.*, 2007). Os tumores que se originam dos astrócitos, células do cérebro que rodeiam as células nervosas e dão suporte aos neurônios, comumente conhecidos como astrocitomas, são divididos em três tipos: astrocitomas (grau II da OMS), astrocitomas anaplásicos (grau III da OMS), e GBMs (grau IV da OMS) (GOLDLUST *et al.*, 2008).

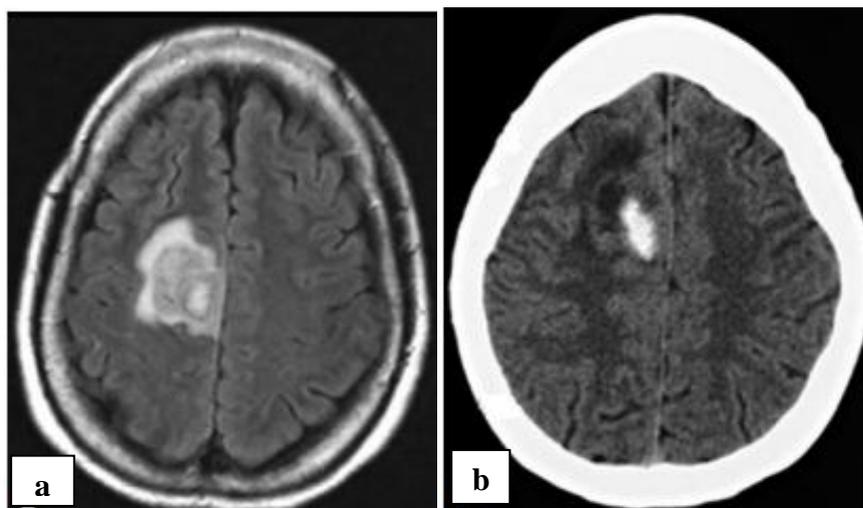
O GBM pode ocorrer como uma neoplasia primária ou secundária: uma neoplasia primária é originada diretamente a partir de mutações em células astrogliais normais, enquanto que uma neoplasia secundária se origina de um tumor com grau de malignidade inferior a IV e evolui até se tornar um GMB com grau IV de agressividade. GBM primário tende a ocorrer em uma população de pacientes mais velhos, com mais de 55 anos, enquanto o GBM secundário tende a ocorrer em adultos mais jovens, abaixo dos 45 anos de idade. Embora fenotipicamente semelhante, estes dois tipos de GBM ocorrem através do acumulo de mutações diferentes (KIM & GLANTZ, 2006).

Do ponto de vista etiológico, fatores ambientais, como tabagismo, dieta e ingestão de álcool não foram ligados ao GBM, embora sugere-se que altas doses de irradiação craniana e exposição ocupacional a algumas toxinas podem estar ligados ao aumento da incidência de

gliomas. Risco de glioma atribuível a herança foi estimado em 4% e é mais comumente associado com neurofibromatose, esclerose tuberosa, síndrome de Turcot, e síndrome de Li-Fraumeni (GOLDLUST *et al.*, 2008).

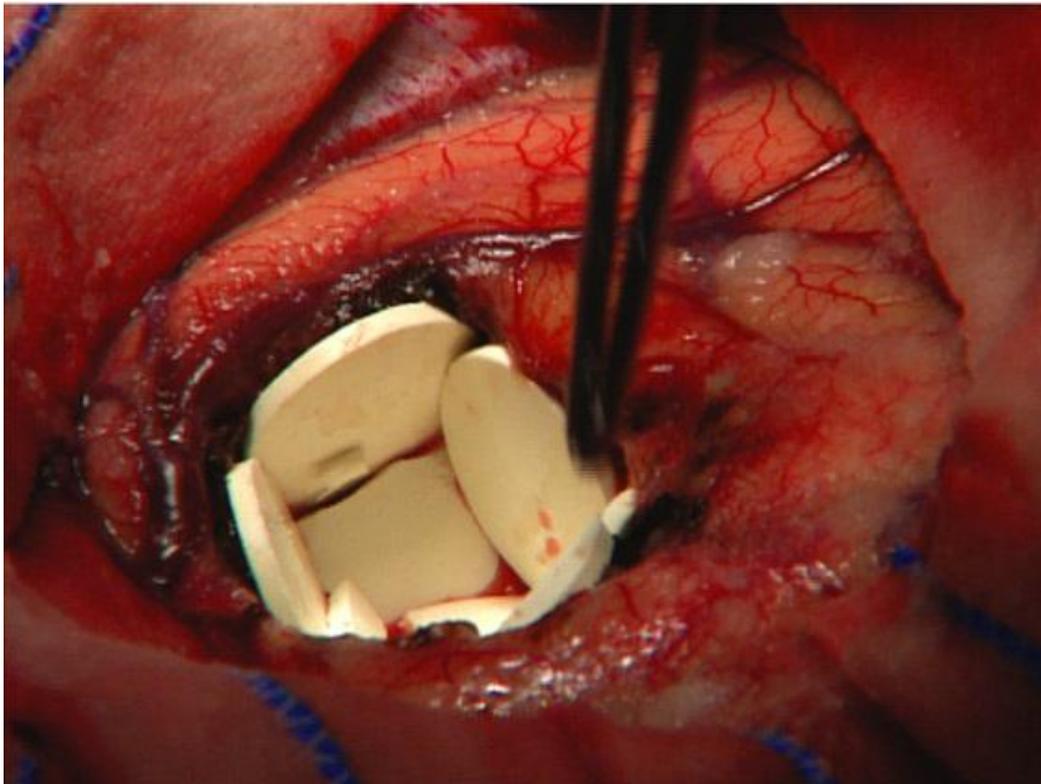
### 1.7.1.1. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico é realizado por exame de imagem (Fig. 4), sendo a ressonância magnética com administração de contraste considerado como padrão ouro (Fig. 4a). Tomografia computadorizada pode não mostrar lesões na fossa posterior, além de perder pequenos tumores que não são reforçados com o agente de contraste (Fig. 4b). A tomografia por emissão de pósitrons e espectroscopia de ressonância magnética podem ser úteis para ajudar a distinguir o tumor do tecido normal e orientar o local da biópsia. O diagnóstico definitivo deve ser obtido por um exame histológico por biópsia ou ressecção cirúrgica (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2007). O padrão atual de tratamento é a ressecção cirúrgica, juntamente com a radioterapia e quimioterapia, usando o fármaco temozolomida (TMZ, Temodar®, Temodal®) (STUPP *et al.*, 2009). Na maioria dos casos, essa abordagem fornece 24 meses de sobrevida para o paciente após o diagnóstico, e apenas 5-15% deles vivem mais de 5 anos (ARVOLD & REARDON, 2014; GALLEGO, 2015; RAIZER *et al.*, 2015; NEUBECK *et al.*, 2015).



**Figura 4. Exames de imagem de paciente com GBM.** (a) Imagem de ressonância magnética com contraste revelando lesão cerebral. (b) Imagem de tomografia computadorizada sem contraste do mesmo paciente.

Apesar da ressecção cirúrgica agressiva, da radioterapia e quimioterapia, quase todos os pacientes com GBM apresentam recorrência do tumor, com o elevado número de 95% dos tumores reaparecendo no local primário (WEN & KESARI, 2008). Isso pode ser parcialmente atribuído à natureza altamente invasiva do tumor, tornando a ressecção completa quase impossível. Além disso, os tumores GBM pode ter extensas regiões de hipoxia. Esta redução de oxigênio pode limitar a eficácia da radioterapia devido a diminuição da geração de radicais livres que danificam o DNA das células tumorais (RAMIREZ *et al.*, 2013). Além disso, a vasculatura tumoral anormal e permeável provoca uma elevada pressão hidrostática no tumor, reduzindo a administração do fármaco para o tumor. Tem sido proposto que colocando discos quimioterápicos solúveis (Gliadel®) no leito tumoral (Fig. 5), estes obstáculos seriam diminuídos ou superados (PANIGRAHI *et al.*, 2011). Porém, mesmo com os tratamentos pós-cirúrgicos com radioterapia, TMZ e Gliadel®, o GBM apresenta uma população de células que sobrevivem aos tratamentos capaz de recidivar a neoplasia posteriormente (RAMIREZ *et al.*, 2013).



**Figura 5. Implantação de Gliadel®.** Os discos são implantados na região onde foi extraído o tumor, os discos são indicados como adjuvante na cirurgia para prolongar a sobrevida em pacientes com GBM. (Fonte: MACIEJ *et al.*, 2004).

## 2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o grande potencial das Ag/AgCl-NPs como agentes biocidas contra microrganismos patogênicos (DURÁN *et al.*, 2016), aliado à necessidade de mudanças para o futuro na direção do desenvolvimento sustentável (RELATÓRIO BRUNDTLAND, 1991), propomos a síntese biológica de Ag/AgCl-NPs (rota "verde"). NPs bioproduzidas possuem duas grandes vantagens com relação aos métodos químicos e físicos de síntese. A primeira é devido ao fato da síntese biológica ser ecologicamente amigável, ao contrário das NPs produzidas quimicamente, que fazem uso de solventes tóxicos. A segunda vantagem é devido ao baixo custo de síntese, ao contrário das NPs produzidas fisicamente, que necessitam de equipamentos caros durante o processo (NAVEEN *et al.*, 2010). Com relação à escolha do organismo produtor, a grande vantagem de se escolher espécies de leveduras como organismo responsável pela produção biológica de Ag/AgCl-NPs é o conhecimento de longo prazo do cultivo em larga escala para a aplicação industrial, o que poderia facilitar o processo de transição para a indústria futuramente (FREY, 1930; SCHNEITER, 2004).

As Ag/AgCl-NPs produzidas por *C. lusitanae*, uma das utilizadas neste trabalho, apresentaram forte efeito antiproliferativo contra as bactérias *S. aureus* e *K. pneumoniae*, demonstrando grande potencial para aplicações biomédicas (EUGENIO *et al.*, 2016). Como diferentes espécies de microrganismos produzem NPs com características diferentes, investigamos neste trabalho a síntese e realizamos a caracterização de Ag/AgCl-NPs produzidas por outra espécie de levedura, a *C. intermedia*. O efeito sobre a proliferação de bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras patogênicas também foi avaliado.

Devido ao crescente número de casos de bactérias e fungos resistentes a múltiplas drogas, tornou-se essencial a busca por agentes alternativos aos atuais antibióticos usados na clínica (OMS, 2014). Só nos Estados Unidos, 2 milhões de pessoas adquirem infecções graves por bactérias que são multirresistentes aos tratamentos para essas infecções. Além disso, pelo menos 23 mil pessoas morrem por ano devido a infecções bacterianas resistentes (CDC, 2013). Portanto, torna-se imprescindível a busca ininterrupta por novos fármacos efetivos contra bactérias, e vários trabalhos apontam para o potencial uso de Ag/AgCl-NPs (DURÁN *et al.*, 2016), tornando válido seu estudo mais aprofundado.

Segundo a OMS (2014), infecções fúngicas são relativamente negligenciadas em algumas regiões do mundo, como partes da América do Sul, Ásia, África e Oriente Médio, gerado pela falta de recursos apropriados. Como consequência, dois dos três grupos de

fármacos usados para tratar candidíase (triazóis e equinocandinas), maior causador de infecções fúngicas no mundo, já apresentam problemas de resistência fúngica (PFALLER & DIEKEMA, 2012; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2005). Além disso, carecem estudos de efeito de Ag/AgCl-NPs em diferentes espécies de leveduras potencialmente patogênicas (DURÁN *et al.*, 2016).

Outra enfermidade que merece destaque são as neoplasias. As neoplasias matam 8,2 milhões de pessoas anualmente em todo mundo, segundo a OMS (2016). Dentre eles, destaca-se o glioblastoma multiforme (GBM). O GBM é um tipo de neoplasia rara (3,2 novos diagnosticados a cada 100.000 indivíduos), porém sua taxa de mortalidade é de 100%, com sobrevida média de 24 meses, após cirurgia, quimio e radioterapia, devido ao tratamento extremamente ineficiente frente a agressividade da neoplasia (GOLDLUST *et al.*, 2008; ARVOLD & REARDON, 2014). Portanto, há uma necessidade urgente da descoberta de novos compostos alternativos para tratar dessa doença. AgNPs já se mostraram eficazes *in vitro* contra GBM (URBANSKA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2014; LOCATELLI *et al.*, 2014), entretanto o potencial de Ag/AgCl-NPs nunca foi avaliado. Além disso, Ag/AgCl-NPs têm se mostrado mais estáveis do que AgNPs em solução, de acordo com outros estudos de caracterização por potencial zeta disponíveis na literatura (SURESH *et al.*, 2010; SATHISHKUMAR *et al.*, 2009; LAVAKUMAR *et al.*, 2015; LONGHI *et al.*, 2016).

Com base no exposto, este trabalho visa a utilização de Ag/AgCl-NPs sintetizadas via uma rota verde, a partir de culturas de leveduras, para a avaliação dos seus efeitos antibacterianos, antifúngicos e antitumorais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito antibacteriano, antifúngico e antitumoral de nanopartículas de prata/cloreto de prata produzidas por rota verde a partir de leveduras.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Investigar a bioprodução de Ag/AgCl-NPs a partir de culturas da levedura *Candida intermedia*.
- Caracterizar as nanopartículas produzidas pelas culturas de *C. intermedia*.
- Avaliar o efeito de Ag/AgCl-NPs na proliferação das bactérias *Streptococcus pyogenes* e *Salmonella enterica serovar Typhi* (*S. typhi*), comparando seus efeitos aos antibióticos penicilina e estreptomicina.
- Verificar o reestabelecimento das culturas de bactérias *S. pyogenes* e *S. typhi* após o tratamento com Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomicina.
- Avaliar o efeito de um segundo ciclo de tratamento com Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomicina sobre a proliferação das bactérias *S. pyogenes* e *S. typhi*.
- Avaliar o efeito de Ag/AgCl-NPs na proliferação das leveduras *Candida albicans* e *Candida lusitaniae*, comparando seus efeitos ao antifúngico anfotericina B.
- Verificar o reestabelecimento das culturas de leveduras *C. albicans* e *C. lusitaniae* após o tratamento com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B.
- Avaliar o efeito de um segundo ciclo de tratamento com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B sobre a proliferação das leveduras *C. albicans* e *C. lusitaniae*.

- Avaliar o efeito antiproliferativo de Ag/AgCl-NPs e do fármaco TMZ sobre a linhagem GBM02 do tumor cerebral primário glioblastoma multiforme.
- Avaliar o efeito antiproliferativo de Ag/AgCl-NPs e de TMZ sobre astrócitos humanos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Biossíntese de Ag/AgCl-NPs

O processo de síntese e caracterização de Ag/AgCl-NPs foi previamente estabelecido pelo grupo (EUGENIO *et al.*, 2016). Resumidamente, leveduras da espécie *C. lusitaniae* e *C. intermedia* foram cultivadas com inóculo inicial de  $10^7$  células/mL em meio rico, segundo DAI *et al.* (2007): 4% de glicose (Merk), 1% de peptona bacteriológica (Himedia) e 1% de extrato de levedura (Himedia), pH 6,5, durante 24 h a 30°C. Posteriormente, uma solução aquosa de nitrato de prata (Merk) a 3,5 mM foi adicionada ao meio e as culturas foram mantidas durante 7 dias a 30°C, no escuro e sob agitação (150 rpm).

As amostras foram retiradas após 7 dias de cultivo, coletadas para um frasco de vidro, e a mudança de cor, que indica a redução de íons  $\text{Ag}^+$  (que gera Ag/AgCl-NPs) foi registrada fotograficamente. Leituras de UV-Vis foram realizadas para confirmação da produção de NPs. A absorvância foi medida nos comprimentos de onda na faixa de 200-700 nm, a uma resolução de 1 nm, em placa de 96 poços (Biofil®) em um espectrofotômetro de UV-Visível Molecular Devices Spectra Max 190 (Sunnyvale, EUA).

### 4.2. Purificação de Ag/AgCl-NPs

Após a indicação da produção de NPs por UV-Vis e mudança na cor do meio de cultura, o sobrenadante do meio de cultura foi separado do *pellet* de células por centrifugação a 2728 x g, durante 15 minutos a temperatura ambiente. As Ag/AgCl-NPs foram purificadas a partir do sobrenadante por centrifugação a 38361 x g, durante 20 minutos a temperatura ambiente. As Ag/AgCl-NPs sedimentadas foram ressuspensas com auxílio de banho de ultrassom, para evitar agregação, usando o equipamento SoniClean 2 (Sanders Medical), por 30 minutos a temperatura ambiente, com uma frequência de 40 kHz. As amostras foram lavadas sequencialmente em solução de 2% de citrato de sódio, pH 8,0, para estabilização eletrostática das NPs através da adsorção de íons citrato, até que o sobrenadante adquirisse aspecto transparente. Posteriormente as Ag/AgCl-NPs foram ressuspensas em citrato de sódio 2% e mantidas a 4° C para caracterização. Para os ensaios antiproliferativos, as Ag/AgCl-NPs foram centrifugadas a 38361 x g por 20 minutos e ressuspensas em meio de cultura de bactérias (Caldo Nutriente), leveduras (Sabouraud) e células de mamífero (DMEM-F12).

### 4.3. Difração de raios-X das nanopartículas produzidas por *C. intermedia*

As Ag/AgCl-NPs purificadas a partir da cultura de *C. intermedia* foram secas a 100°C durante 1 h. Posteriormente, o pó de Ag/AgCl-NPs foi montado em um suporte de nylon (Hampton Research, EUA) e submetido a medições de difração de raios-X usando um difratômetro Agilent SuperNova (Santa Clara, EUA) operando a 40 W (voltagem de 50 kV e corrente de 0,5 mA) com uma radiação de CuK $\alpha$  (1,5416 Å) no intervalo de 20°-80°, em ângulos 2 $\theta$ . A linha de base foi corrigida usando o *software* Fityk. O perfil de difração foi comparado com o padrão publicado pelo Comitê Conjunto sobre Padrões de Difração em Pó para AgNPs (JCPDS: 65-2871) e para AgCl-NPs (JCPDS: 31-1238).

### 4.4. Morfometria das nanopartículas produzidas por *C. intermedia* por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfometria das NPs produzidas a partir da cultura de *C. Intermedia* por MET foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit Biotwin (Eindhoven, Holanda) para confirmar o tamanho e a forma das Ag/AgCl-NPs. As amostras foram aderidas durante 2 h em grades de cobre para MET revestidas com Formvar e posteriormente secas a temperatura ambiente. As imagens foram obtidas com uma voltagem de 120 kV. O *software* ImageJ (SCHNEIDER *et al.*, 2012) foi utilizado para estimar o diâmetro e o fator de forma (circularidade) das NPs (n = 1.000) a partir das imagens obtidas.

### 4.5. Ensaio antiproliferativo em bactérias e leveduras

A atividade antibacteriana e antifúngica das Ag/AgCl-NPs produzidas por *C. intermedia* foi testada contra as bactérias *S. pyogenes* e *S. typhi* e contra as leveduras *C. albicans* e *C. lusitaniae*. Inicialmente a solução contendo as Ag/AgCl-NPs foi sonicada em banho de ultrassom (SoniClean 2, Sanders Medical) por 30 minutos a temperatura ambiente, com uma frequência de 40 kHz. As bactérias foram crescidas em 1,5 mL de meio Caldo Nutriente (Himedia) como condição controle (não tratado) e em meio Caldo Nutriente contendo 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs. Enquanto as leveduras foram crescidas em 1,5 mL de meio Sabouraud (Himedia) como condição controle (não tratado) e em meio Sabouraud contendo 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs. O efeito dos antibióticos penicilina e estreptomicina (para as bactérias),

assim como a anfotericina B (para as leveduras) foi testado sobre a proliferação celular utilizando mesmas concentrações descritas anteriormente para as Ag/AgCl-NPs, com a finalidade de comparação. Os experimentos foram realizados em triplicata em microtubos tipo eppendorf de 2 mL (MCT-200-C, Axygen®) e mantidos por 24 h a 37°C, com inóculo inicial de  $10^5$  unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) para os ensaios com bactérias, e mantidos por 72 h a 37°C, com inóculo inicial de  $10^7$  células/mL para os ensaios com leveduras.

Controles do meio de cultura puro e do meio de cultura com a adição de Ag/AgCl-NPs também foram realizados. O meio de cultura puro foi usado como branco, enquanto os valores obtidos dos microtubos contendo meio com Ag/AgCl-NPs foram subtraídos dos valores obtidos pelos microtubos contendo bactérias, para garantir que a densidade óptica (DO) considerada seria apenas dos microrganismos, sem influência da absorvância das Ag/AgCl-NPs, visto que a presença das NPs no meio de cultura altera a sua cor, portanto, altera a absorvância medida no espectrofotômetro.

Posteriormente, as densidades celulares foram acompanhadas por medição da DO a 600 nm, utilizando um espectrofotômetro de UV-Visível Molecular Devices Spectra Max 190 (Sunnyvale, EUA). Foram obtidos valores de DO por UV-Vis nos tempos de 6, 12 e 24 h (para bactérias) e 24, 48 e 72 h (para leveduras) após o inóculo e adição dos tratamentos, para o acompanhamento da curva de crescimento.

#### **4.6. Ensaio de recuperação e segundo ciclo do ensaio antiproliferativo em bactérias e leveduras**

Após as 24 h de tratamento das bactérias e 72 h de tratamento das leveduras com Ag/AgCl-NPs ou os antibióticos nas concentrações de 0, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (para bactérias) e 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (para leveduras), as culturas foram lavadas em meio de cultura Caldo Nutriente ou Sabouraud fresco, respectivamente, usando centrifugação a 2728 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as culturas foram ressuspensas no mesmo meio livre de Ag/AgCl-NPs ou antibióticos, para avaliação da possível recuperação das culturas bacterianas e fúngicas após os tratamentos.

Após as 24 e 72 h do ensaio de recuperação, foi realizado um segundo ciclo de tratamento das bactérias ( $10^5$  UFC/mL) com 0, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomomicina em meio Caldo Nutriente; e das leveduras ( $10^7$

células/mL) com 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs e anfotericina B em meio Sabouraud. Os experimentos foram realizados em triplicata em microtubos tipo eppendorf de 2 mL (MCT-200-C, Axygen®) e mantidos por mais 24 e 72 h a 37°C. Os controles do meio de cultura puro e com adição de Ag/AgCl-NPs foram novamente realizados.

Em ambos os ensaios as densidades celulares foram acompanhadas por medição da DO a 600 nm, durante 6, 12 e 24 h (para bactérias) e 24, 48 e 72 h (para leveduras), utilizando o espectrofotômetro de UV-Visível Molecular Devices Spectra Max 190 (Sunnyvale, EUA).

#### **4.7. Cultivo das células GBM02**

A linhagem celular de tumor humano GBM02 foi estabelecida no Laboratório de Morfogênese Celular da UFRJ (FARIA *et al.*, 2006). O uso de espécimes cirúrgicos de pacientes para o estabelecimento de linhagens celulares *in vitro* e *in vivo* em pesquisa teve o consentimento informado por escrito dos pacientes e foi aprovado pelo Comitê de Ética do Ministério da Saúde, sob Conselho de Revisão Institucional (CRI - Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho) consentimento CEP-HUCFF n°. 002/01.

As células foram cultivadas em meio de cultivo DMEM-F12 (Invitrogen - Life Technologies), suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em uma incubadora a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, até obtenção da confluência de 80%. Após atingirem a confluência, as células foram descoladas do frasco através de uma solução de 0,05% de tripsina/0,02% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), por 5 minutos a 37°C. Em seguida foram semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade celular de 10<sup>3</sup> células/poço, para realização dos experimentos posteriores.

#### **4.8. Cultivo dos astrócitos humanos**

Astrócitos humanos primários foram isolados a partir de tecido anterior do lobo temporal, cirurgicamente ressecado de pacientes selecionados para o tratamento cirúrgico da epilepsia do lobo temporal associada a esclerose hipocampo. Os pacientes deram seu consentimento para o uso de seus espécimes cirúrgicos para o isolamento de astrócitos neste estudo, e os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Ministério da Saúde, sob CRI - CEP/HUCFF n° 060/05.

As culturas de astrócitos foram estabelecidas a partir de tecido cortical saudável, como descrito por DINIZ *et al.*, 2012. Resumidamente, os tecidos foram lavados em meio DMEM, dissociados mecanicamente, cortados em pedaços pequenos com um bisturi estéril e incubados em 10 mL de solução de tripsina a 0,25% a 37°C durante 10 minutos. Após centrifugação por 10 minutos, o *pellet* celular foi ressuspensão em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, plaqueado e mantidos numa atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 2 h, para obter adesão de células microgliais. Os astrócitos não aderentes foram transferidos para outras placas de cultura revestidas com 0,1% de poli-L-lisina. Astrócitos aderentes foram crescidos por substituição do meio uma vez por semana. Ao obter confluência de 80%, eles foram descolados com 0,05% de tripsina/0,02% de EDTA e em seguida, foram semeados em placas de 96 poços, a uma densidade celular de 10<sup>3</sup> células/poço, para realização dos experimentos posteriores.

#### **4.9. Ensaio antiproliferativo de GBM02 e astrócitos humanos por análise de alto conteúdo (HCA)**

Para a análise de proliferação celular, GBM02 e os astrócitos foram semeados em uma densidade de 10<sup>3</sup> células/poço em placas de 96 poços preta de fundo plano (Corning Incorporated Costar®), em 300 µL/poço de DMEM-F12 suplementado com SFB a 10% contendo 0,5 µg mL<sup>-1</sup> do corante Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Após 24 h, as células foram incubadas na presença de diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs (0,1, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 µg mL<sup>-1</sup>), TMZ (9,7, 19,4, 29,1, 38,5 e 48,5 µg mL<sup>-1</sup>) ou uma combinação de Ag/AgCl-NPs e TMZ (0,1+9,7, 0,5+19,4, 1,0+29,1, 2,5+38,5 e 5,0+48,5 µg mL<sup>-1</sup>) durante 24, 48 e 72 h a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). A concentração máxima utilizada nos experimentos é compatível com a recomendada pelas Diretrizes de Prática Clínica em Oncologia para tratamento de tumores do sistema nervoso central (BALÇA-SILVA *et al.*, 2014). O controle não tratado foi realizado na ausência de nanopartículas ou TMZ.

Imagens foram adquiridas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h de cultivo nas condições controle e tratados utilizando o sistema de imagens InCell Analyzer 2000. Foram escolhidos seis diferentes campos dentro de cada poço para aquisição das imagens de fluorescência, usando o filtro DAPI (região espectral entre 410-480 nm), com objetiva de 10x. A contagem do número de núcleos marcados foi realizada através do *software* InCell Investigation (GE HealthCare Life Sciences). Para o acompanhamento da curva de crescimento, a quantidade de núcleos contados no tempo 0 h (controles não tratados) foi normalizada para 100% e os

núcleos contados nos tempos posteriores foram convertidos em percentual de proliferação com relação ao ponto 0 h.

#### **4.10. Determinação da taxa de crescimento e do tempo de duplicação da população de GBM02 e astrócitos**

A taxa de crescimento e o tempo de duplicação da população de GBM02 e astrócitos foram estimados de acordo com SHERLEY *et al.*, 1995. Em resumo, foi utilizada a fórmula a seguir para o cálculo da taxa de crescimento:

$$N_t = N_0 2^{ft}$$

onde  $N_t$  = número total de células,  $N_0$  = número inicial de células,  $f$  = taxa de crescimento e  $t$  = tempo de cultivo. A partir dos valores da taxa de crescimento, o tempo de duplicação da população foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$TDDP = \frac{\ln(2)}{f}$$

onde TDDP = tempo de duplicação da população,  $f$  = taxa de crescimento

#### **4.11. Determinação do IC<sub>50</sub>**

O IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% da proliferação celular) das culturas tratadas de bactérias, leveduras, GBM02 e astrócitos humanos foi determinado através do *software* Graphpad Prism 5.

#### **4.12. Análise estatística**

Os dados dos ensaios antibacterianos, antifúngicos e antitumorais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA, seguido do teste Tukey, usando o *software* Graphpad Prism 5. A significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização de Ag/AgCl-NPs bioproduzidas por *C. intermedia* e o monitoramento da atividade antiproliferativa em bactérias e leveduras

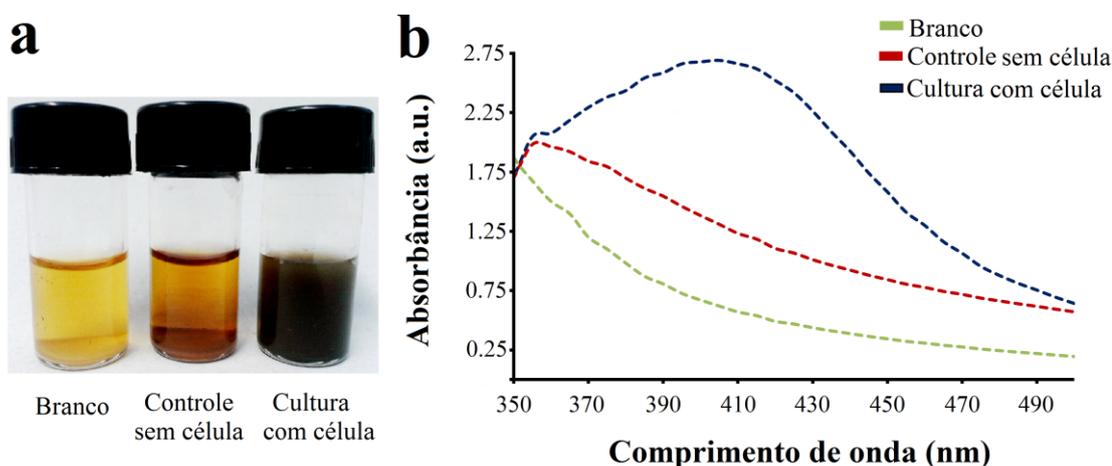
#### 5.1.1. Análise colorimétrica e por UV-Vis das culturas da levedura *C. intermedia* incubadas na presença de nitrato de prata

Em geral, a primeira evidência da redução de íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ), sob a forma de NPs, é a mudança de cor no meio de cultura (de amarelo claro para castanho escuro). A mudança de cor no meio de cultura e os picos observados por análise em UV-Vis são decorrentes do fenômeno denominado Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (RPSL), que consiste na oscilação coletiva dos elétrons livres nas NPs, criando uma densidade de carga na sua superfície. Esse fenômeno, no caso das NPs à base de prata, provoca uma absorção da luz na região visível do espectro, entre 350-450 nm, fazendo com que suspensões coloidais de NPs à base de prata apresentem essa coloração característica (ELUMALAI & DEVIKA, 2014; PEREIRA, 2009).

A Fig. 6 mostra a alteração de cor (Fig. 6a) e o espectro de absorvância (Fig. 6b) dos meios de cultura com e sem a adição de 3,5 mM de  $\text{AgNO}_3$ . O meio de cultura livre de leveduras e de  $\text{AgNO}_3$  não apresentou nenhuma mudança de cor durante o experimento. Após adição de  $\text{AgNO}_3$  no meio de cultura livre de células, foi observado uma ligeira alteração de cor, de amarelo claro para castanho claro, indicando a possível redução de íons  $\text{Ag}^+$  por componentes do meio de cultura, que deram origem as NPs à base de prata. As culturas de leveduras incubadas na presença de  $\text{AgNO}_3$  apresentaram uma alteração de cor de amarelo claro para castanho escuro, indicando a produção de uma quantidade maior de NPs, já que maiores concentrações de NPs no meio o tornam mais escuro, e a altura do pico no UV-Vis fica maior (SINGH *et al.*, 2014).

A produção de NPs foi confirmada pela análise de UV-Vis (Fig. 6b). O espectro obtido a partir das culturas de leveduras incubadas na presença de 3,5mM de  $\text{AgNO}_3$  apresentou uma absorvância máxima em 408 nm, compatível com picos observados em trabalhos prévios com NPs à base de prata (SINGH *et al.*, 2014), com uma variação na faixa de 380-440 nm, indicando a produção de NPs com uma grande variação de diâmetro (ZHANG & NOGUEZ, 2008). Os espectros correspondentes ao meio de cultura puro e ao

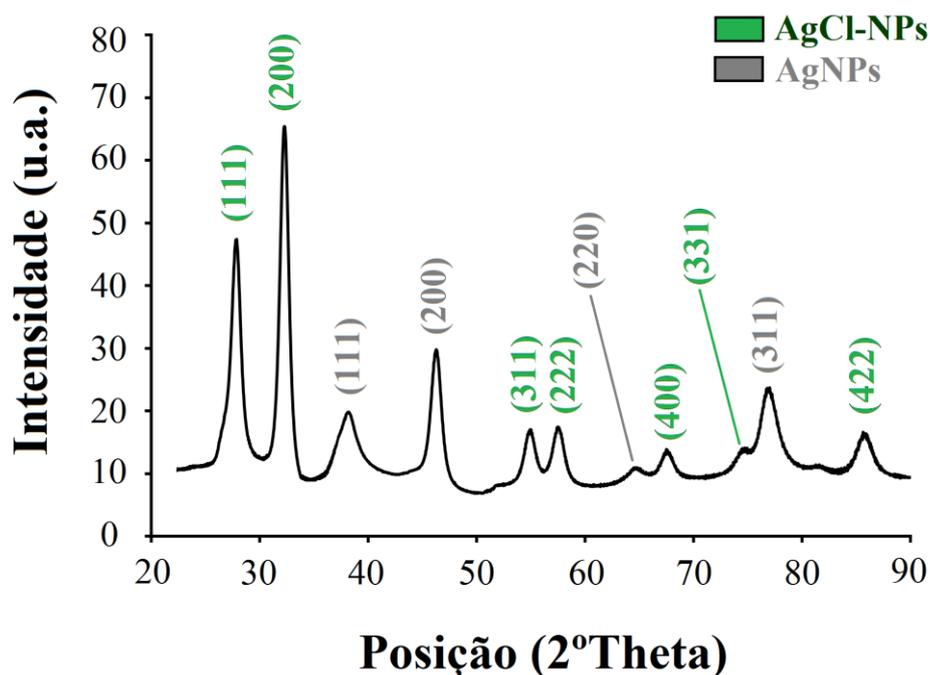
meio apenas com  $\text{AgNO}_3$  não apresentaram picos na faixa de NPs à base de prata, portanto não foi confirmada a produção de NPs nessas condições.



**Figura 6. Análise da bioprodução de NPs à base de prata pela levedura *C. intermedia*, por mudança na cor do meio de cultura e absorvância no UV-Vis.** (a) Frascos contendo o meio de cultura puro, meio de cultura com  $\text{AgNO}_3$  e culturas de leveduras com  $\text{AgNO}_3$ . (b) Espectros de UV-Vis representativos dos frascos com o meio de cultura puro, meio de cultura com  $\text{AgNO}_3$  e culturas de leveduras com  $\text{AgNO}_3$ .

### 5.1.2. Caracterização da natureza cristalina das NPs produzidas por *C. intermedia* através de Difração de Raios-X

A fim de identificar a natureza das NPs produzidas por *C. intermedia* a técnica de DRX foi empregada. A Fig. 7 mostra o padrão de DRX obtido a partir do pó das NPs produzidas pelas leveduras. O espectro das NPs apresentou um padrão de DRX que é compatível com a fase cristalina cúbica de prata metálica, com picos de difração nos valores em  $2\theta$  de  $38^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $64^\circ$  e  $78^\circ$ , que são referidos aos planos (111), (200), (220) e (311), que coexistem com os picos de  $\text{AgCl}$ -NPs em  $27^\circ$ ,  $32^\circ$ ,  $55^\circ$ ,  $57^\circ$ ,  $74^\circ$ ,  $76^\circ$  e  $85^\circ$  e que correspondem aos planos (111), (200), (311), (222), (400), (331) e (422). Este padrão obtido a partir do difratograma mostra que as NPs sintetizadas por *C. intermedia* são NPs cristalinas de prata/cloreto de prata, de acordo com as análises cristalográficas relatadas por GOPINATH *et al.* (2013) e DURÁN *et al.* (2014). A interpretação dos perfis de difração das  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ -NPs é coerente com o parão estabelecido pelo Comitê Conjunto em Padrões de Difração em pó (arquivos JCPDS: 65-2871 para prata e JCPDS: 31-1238 para cloreto de prata).



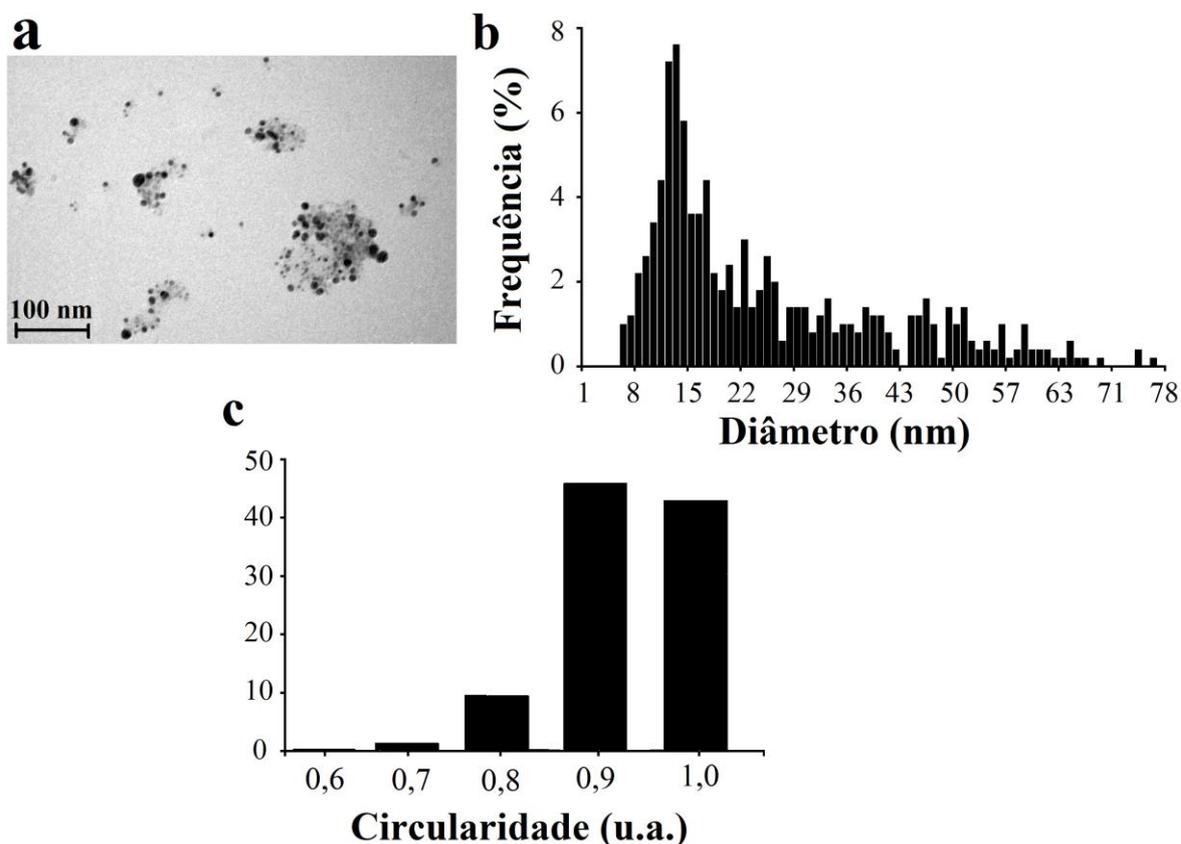
**Figura 7. Análise por DRX.** Padrões das NPs sintetizadas por *C. intermedia*. Os planos cristalinos de prata metálica (111; 200; 220 e 311, em cinza) e cloreto de prata (111; 200; 311; 222; 400; 331 e 422, em verde) coexistem nas NPs isoladas das leveduras.

### 5.1.3. Morfometria das Ag/AgCl-NPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Determinou-se o tamanho e o fator de forma (circularidade) das Ag/AgCl-NPs produzidas por *C. intermedia* através de análise morfométrica por MET, a partir de imagens de Ag/AgCl-NPs purificadas e depositadas em grades de cobre revestidas por Formvar (Fig. 8a). Medidas do diâmetro de Ag/AgCl-NPs ( $n = 1000$ ) a partir de imagens digitais de MET mostrou uma variação de 5 a 75 nm. A maior parte das NPs produzidas estavam na estreita faixa entre 10-20 nm (~50%), enquanto uma proporção menor de partículas (~40%) variou na larga faixa entre 21-75 nm. Cerca de 10% das NPs apresentaram diâmetros menores que 10 nm, sendo 5 nm o menor diâmetro observado (Fig. 8b).

Uma inspeção visual das imagens de Ag/AgCl-NPs por MET indicou que as NPs eram predominantemente esféricas ou quase esféricas (Fig. 8c). Estes resultados foram confirmados através da análise de circularidade, onde um valor de circularidade 1,0 representa a simetria perfeita de um círculo, enquanto que os valores diferentes de 1,0 representam morfologias não perfeitamente esféricas. A avaliação da circularidade das Ag/AgCl-NPs mostrou que ~85% das Ag/AgCl-NPs são perfeitamente esféricas (~40%) ou bem próximo de esférico, com

valores entre 0,9-1,0 (~45%). Apenas ~15% apresentaram valores abaixo de 0,9, indicando morfologias menos esféricas (Fig. 8c).



**Figura 8. Diâmetro e análise do fator de forma das Ag/AgCl-NPs por MET.** (a) Imagem de MET de Ag/AgCl-NPs produzidas por *C. intermedia*. (b) Histograma da análise da distribuição de tamanho das Ag/AgCl-NPs. (c) Análise do fator de forma (circularidade) das Ag/AgCl-NPs, onde o valor 1,0 representa a simetria perfeita de um círculo.

#### 5.1.4. Ensaio antiproliferativo nas bactérias *S. typhi* e *S. pyogenes* tratadas com Ag/AgCl-NPs ou com os antibióticos penicilina e estreptomicina

As Ag/AgCl-NPs biossintetizadas pela levedura *C. intermedia* foram analisadas quanto à sua atividade antiproliferativa contra a bactéria gram-negativa *S. typhi* (Fig. 9a) e a gram-positiva *S. pyogenes* (Fig. 9b). Este teste foi realizado a partir do tratamento das bactérias com 8 diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs (0, 10, 25, 50, 75, 100, 125 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), de acordo com MORONES *et al.* (2005), por 6, 12 e 24 h. Além disso, as bactérias foram tratadas com os antibióticos penicilina e estreptomicina nas mesmas concentrações e tempo de incubação, para comparação.

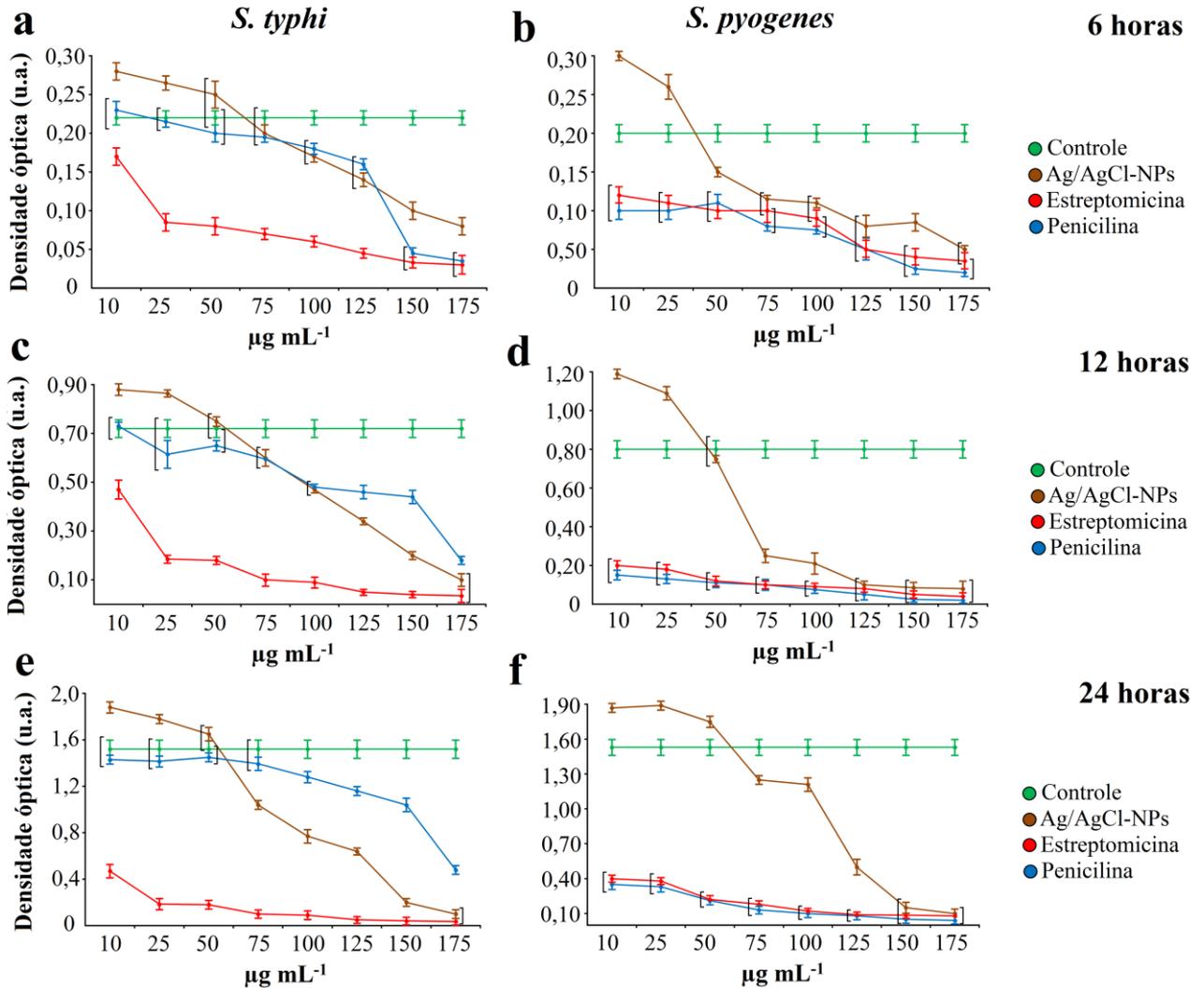
Em 6 h, uma pequena diminuição da proliferação nas culturas de *S. typhi*, em comparação ao controle não tratado, após tratamento com Ag/AgCl-NPs, foi observada apenas nas concentrações a partir de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (~23%), alcançando inibições dose-dependentes, de até ~64% na concentração de  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 9a). O tratamento com  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  apresentou valores similares ao controle, e curiosamente, com concentrações inferiores apresentou valores de DO superiores ao das bactérias não tratadas, atingindo, por exemplo, valores até ~27% maiores de proliferação após tratamento com  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 9a). O efeito antiproliferativo aumentou após 12 h com relação ao controle, com o tratamento entre  $100$  e  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  levando a uma maior inibição da proliferação (~23-64% vs ~30-86%) (Fig. 9c). Enquanto os efeitos estimulatórios parecem se manter ao longo das 24 h de tratamento, apesar de apresentar ligeira diminuição (~27% vs ~23%) (Fig. 9c, e). Em 24 h de tratamento, as culturas tratadas com  $150$  e  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  pararam de proliferar, pois os valores de DO de 12 e 24 h foram os mesmos, com inibição observada de ~87 e 93% (Fig. 9e).

O tratamento das culturas de *S. pyogenes* com baixas concentrações de Ag/AgCl-NPs ( $10$  e  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  até 12h e  $10$  e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  em 24h), levou ao estímulo da proliferação celular quando comparado ao controle, com estímulo da proliferação que variou de ~50%, em 6h, diminuindo para ~24% após 24 h (Fig. 9b, d, f). Em 6 h, inibição dose-dependente foi observada a partir de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (~25%), chegando a fortes inibições em  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  (~75%) (Fig. 9b). Em 12 h de tratamento,  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs passou a promover uma menor inibição, de ~6%, seguido de estímulo da proliferação de ~14% no tempo de 24 h (Fig. 9d, f), enquanto as demais concentrações apresentaram inibições que variaram de ~69%, em  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  até 90%, em  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 9d). Em 24 h, o tratamento com  $75$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  diminuiu significativamente a sua eficácia, indo para apenas ~18 e 21%. No entanto, as concentrações entre  $150$  e  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  mantiveram o efeito constante, em ~90 e 93%, respectivamente (Fig. 9f). A comparação dos dados de inibição da proliferação de *S. pyogenes* durante o experimento indicou a diminuição da eficácia do tratamento com as Ag/AgCl-NPs ao longo do tempo, com excessão das maiores concentrações, que levaram à uma elevada inibição, mesmo após 24 h.

O antibiótico penicilina, após 6 h, não apresentou efeito antiproliferativo em *S. typhi*, entre  $10$ - $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , no entanto, diferente das Ag/AgCl-NPs, não estimulou a proliferação das bactérias. Em  $100$  e  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  a inibição foi estatisticamente igual ao das Ag/AgCl-NPs, aumentando apenas entre  $150$  e  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  (~64 vs 84%) (Fig. 9a). Após 12 h, até  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  não houve inibição pela penicilina em comparação ao controle, e em  $75$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  a inibição foi a mesma observada com Ag/AgCl-NPs, entretanto, a eficácia diminuiu com

relação ao controle nas concentrações entre 125 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (~75% vs 85% de inibição em 6h), levando a uma inibição menor que as Ag/AgCl-NPs (Fig. 9c). Após 24 h, a penicilina seguiu perdendo efeito (até 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não houve diferença para o controle), e entre 100 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$  manteve eficácia inferior as Ag/AgCl-NPs, com inibição máxima de ~68% vs 96% (Fig. 9e). O tratamento com o antibiótico estreptomicina foi o mais eficaz de todos, apresentando inibição mínima com 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em 6 h (~61%), posteriormente aumentando para ~88% em 24 h. É importante ressaltar que foi observada inibição de 98% após 24 h, com 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ou seja, uma diferença de apenas 10% de inibição entre a menor e a maior concentração avaliada (Fig. 9a,c,e).

Para a bactéria *S. pyogenes* os dois antibióticos tiveram efeito inibitório similar, sem diferenças estatísticas, em todos os tempos testados e concentrações avaliadas. As inibições foram de ~50-85% em 6 h, ~81-96% em 12 h e ~74-97% em 24 h (Fig. 9b, d, f). Em comparação ao tratamento com Ag/AgCl-NPs, a partir de 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em 6 h, a inibição da proliferação foi bastante similar aos antibióticos, inclusive não havendo diferenças estatísticas para estreptomicina em 75, 100, 125 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e para penicilina em 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 9b). Já em 12 h, não houve diferenças estatísticas entre as Ag/AgCl-NPs e os antibióticos a partir de 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto em 24 h, a partir de 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 9d, f).



**Figura 9. Ensaio antiproliferativo nas bactérias *S. typhi* e *S. pyogenes*.** (a) *S. typhi* tratada com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 6 h. (b) *S. pyogenes* tratada com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 6 h. (c) *S. typhi* tratada com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 12 h. (d) *S. pyogenes* tratada com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 12 h. (e) *S. typhi* tratada com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 24 h. (f) *S. pyogenes* tratada com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 24 h. Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.5. Ensaio de recuperação das bactérias *S. typhi* e *S. pyogenes* após tratamentos por 24 horas com Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomicina

Para o ensaio de recuperação, após 24 h de tratamento com as Ag/AgCl-NPs ou com os antibióticos nas concentrações de 0, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , as bactérias foram lavadas e ressuspensas em meio de cultura puro, para investigar se após os tratamentos as culturas seriam reestabelecidas.

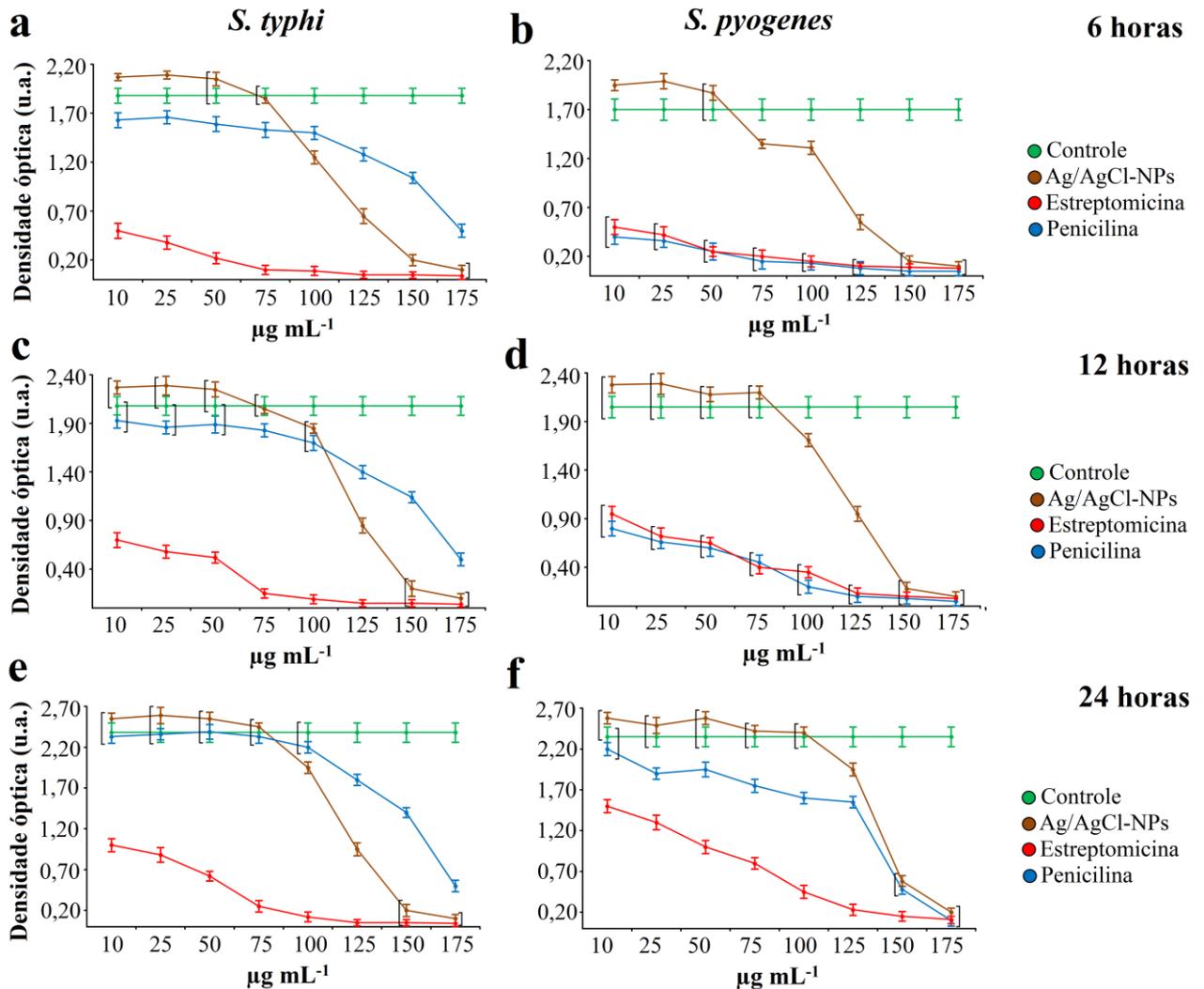
Após 6, 12 e 24 h de recuperação das culturas de *S. typhi* tratadas com Ag/AgCl-NPs, foi observado que, até  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , elas apresentaram um crescimento maior ou igual (sem diferenças estatísticas) ao controle (Fig. 10a, c, e), no entanto, até  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , as culturas já apresentavam densidade celular maior que o controle mesmo na presença do tratamento (Fig. 9e). As culturas tratadas com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  claramente tenderam ao reestabelecimento, atingindo níveis de densidade celular próximos ao controle, apresentando uma diferença entre eles de ~18% na densidade celular, enquanto as culturas tratadas com  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  mantiveram a diferença na densidade celular próxima à observada durante o tratamento com Ag/AgCl-NPs (58% vs 60%) (Fig. 9e; 10e), portanto, não havendo sequer tendência ao reestabelecimento. As culturas previamente tratadas com 150 e  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram um aumento muito pequeno na densidade celular (diferença para o controle aumentou de 93 para 96%) durante o ensaio de recuperação, indicando que as culturas estavam com a viabilidade muito baixa ou não estavam mais viáveis após as 24 h de tratamento com Ag/AgCl-NPs (Fig. 10e).

As bactérias da espécie *S. pyogenes*, previamente tratadas com Ag/AgCl-NPs apresentaram reestabelecimento após 24 h, nas concentrações inferiores a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 10b, d, e) e com  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  houve uma forte tendência ao reestabelecimento, pois a densidade celular foi se aproximando do controle ao longo do tempo, com ~61, 48 e 18% menor que o controle em 6, 12 e 24 h, respectivamente (Fig. 10f). Na concentração de  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ , apesar de ter ocorrido aumento da densidade celular, a diferença para o controle não se alterou com relação ao período de tratamento, permanecendo na faixa de 93-95% (Fig. 10b, d, e), enquanto em  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  as densidades celulares não foram alteradas significativamente, indicando baixa ou nenhuma viabilidade na cultura (Fig. 10 b, d, e).

*S. typhi* tratadas com penicilina até  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  conseguiram se reestabelecer logo nas primeiras 12 h pós tratamento (Fig. 10c), enquanto nas concentrações até  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  as culturas se reestabelecem em 24 h (Fig. 10e). Com 125 e  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ , houve um aumento gradativo da densidade celular, no entanto, a diferença para o controle não foi alterada com relação ao período de tratamento. O mesmo não foi observado em  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pois não houve aumento significativo da densidade celular, devido à baixa viabilidade dessas culturas (Fig. 10a, c, e). Nenhuma das culturas de *S. typhi* tratadas com estreptomicina foram capazes de reverter o efeito antiproliferativo do tratamento em todos os tempos analisados. Após 24 h, as culturas até  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  conseguiram aumentar a densidade celular com relação ao período de tratamento, no entanto, a diferença para a densidade das células controle não foi alterada. As culturas previamente tratadas com 100 até  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$  não alteraram de forma

significativa a densidade celular, indicando que a viabilidade dessas culturas estava comprometida (Fig. 10a, c, e).

Durante os tempos de 6 h pós tratamento, as bactérias *S. pyogenes* anteriormente tratadas com ambos antibióticos se mantiveram igualmente inibidas (Fig. 10b). Após 12 h, houve um pequeno aumento (~20%) na densidade celular das culturas tratadas com até 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para ambos antibióticos (Fig. 10d). Curiosamente, no tempo de 24 h pós tratamentos, as bactérias tratadas com penicilina, que até 12 h apresentavam o mesmo nível de proliferação das tratadas com estreptomicina em todas as concentrações (Fig. 10d), tiveram uma proliferação abrupta, se igualando aos níveis controle nas concentrações de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e com níveis de densidade celular próximos do controle nas concentrações entre 25 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (~19% menor), com as concentrações entre 75 e 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  também se aproximando da densidade celular controle, ~30% menor, tendendo ao reestabelecimento. Por outro lado, as culturas tratadas com 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não apresentaram qualquer aumento na densidade celular (Fig. 10f). Nas culturas de bactérias tratadas com estreptomicina, houve uma pequena proliferação progressiva entre as concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo mais intensa nas menores concentrações, no entanto, nenhuma dessas concentrações foi capaz de atingir níveis de densidade celular semelhantes ao controle. Além disso, nas culturas tratadas de 125 até 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , não houve aumento na proliferação celular (Fig. 10f).



**Figura 10.** Ensaio de recuperação após tratamentos das bactérias *S. typhi* e *S. pyogenes* com Ag/AgCl-NPs ou com os antibióticos estreptomicina e penicilina (a) *S. typhi* após tratamento com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 6 h. (b) *S. pyogenes* após tratamento com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 6 h. (c) *S. typhi* após tratamento com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 12 h. (d) *S. pyogenes* após tratamentos com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 12 h. (e) *S. typhi* após tratamentos com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 24 h. (f) *S. pyogenes* após tratamentos com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 24 h. Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.6. Segundo ciclo de ensaio antiproliferativo com Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomicina contra *S. pyogenes* e *S. typhi*

Devido a recuperação observada nas culturas de *S. typhi* e *S. pyogenes* após os tratamentos com Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomicina, foi feito um segundo ciclo de tratamento com as NPs e os antibióticos após decorridos 24 h de recuperação. Este ensaio teve

como objetivo investigar se as bactérias das cultura reestabelecidas seriam sensíveis a um segundo ciclo de tratamento.

Nos testes com *S. typhi*, nas concentrações até  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  com Ag/AgCl-NPs, em 6 h, foi observado um padrão de inibição similar para ambos os ciclos. No entanto, na concentração de  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$ , as Ag/AgCl-NPs claramente apresentaram maior eficácia quando comparado ao primeiro ciclo (inibições no primeiro ciclo de  $\sim 80\%$  vs.  $\sim 96\%$  no segundo ciclo), atingindo o mesmo nível de inibição dos antibióticos (Fig. 11a), o que não era observado no primeiro ciclo (Fig. 9a). Após 12 h, o tratamento com Ag/AgCl-NPs não alterou a proliferação celular em comparação ao controle nas concentrações até  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mantendo o padrão do primeiro ciclo. Porém, apresentou uma maior inibição a partir de  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , de forma que, nas concentrações de  $150$  e  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$ , não houve diferença estatística na proliferação com relação aos antibióticos (Fig. 11b), como também não foi observado anteriormente (Fig. 9b). Após 24 h, o tratamento com Ag/AgCl-NPs em  $75$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  não apresentou a mesma agressividade de 12 h, apresentando níveis semelhantes aos observados no primeiro ciclo de tratamento ( $29\%$  e  $52\%$  no segundo ciclo vs.  $32\%$  e  $49\%$  no primeiro ciclo). Na concentração de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , o desempenho das Ag/AgCl-NPs manteve a tendência de melhora da eficácia com relação ao primeiro ciclo (Tabela 1). Entretanto, é importante ressaltar que no ensaio de recuperação, as bactérias deixaram de se proliferar nas concentrações de  $150$  e  $175 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e o fato das culturas permanecerem sem proliferação no segundo ciclo de tratamento pode ser um indicativo da falta de viabilidade das bactérias.

Nos testes com *S. pyogenes*, os efeitos do segundo ciclo foram semelhantes ao primeiro ciclo, após 6 h, em todas concentrações, com exceção de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que no segundo ciclo passou a exibir níveis de proliferação iguais ao controle (Tabela 2). Surpreendentemente, no período de 12 e 24 h (Fig. 11 d, f), todas as concentrações até  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  passaram a apresentar melhor efeito antiproliferativo com relação ao primeiro ciclo (Tabela 2). Até  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  as culturas apresentavam proliferação maior ou bem próxima ao controle, enquanto no segundo ciclo o percentual de inibição variou de  $\sim 35\%$  até  $65\%$ . Além disso, as culturas tratadas com  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que anteriormente apresentavam inibição de  $\sim 67\%$ , deixaram de se proliferar de 12 para 24 h, indicando falta de viabilidade, e apresentaram inibições de  $\sim 91\%$  (Tabela 2). Nas concentrações acima de  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  as culturas já apresentavam problemas de viabilidade, de acordo com o ensaio de recuperação (Fig. 10f), o que foi confirmado pela falta de proliferação após o segundo ciclo. Com base nestes dados, as bactérias *S. pyogenes* foram, em geral, significativamente mais sensíveis no segundo ciclo de tratamento com Ag/AgCl-NPs.

**Tabela 1** – Média percentual da inibição da proliferação após diferentes tratamentos em *S. typhi*. A Tabela mostra o percentual médio de inibição em diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomicina usados como tratamento de *S. typhi*.

Tratamento ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Inibição da proliferação celular relativa ao controle (%) no 1º ciclo / 2º ciclo		
	6h	12h	24h
Ag/AgCl-NPs (10)	<u>27</u> ( $\pm 3$ ) / <u>18</u> ( $\pm 4$ )	<u>22</u> ( $\pm 2$ ) / <u>19</u> ( $\pm 3$ )	<u>23</u> ( $\pm 2$ ) / <u>6</u> ( $\pm 4$ )
Ag/AgCl-NPs (25)	<u>20</u> ( $\pm 2$ ) / <u>16</u> ( $\pm 4$ )	<u>20</u> ( $\pm 5$ ) / <u>14</u> ( $\pm 4$ )	<u>17</u> ( $\pm 2$ ) / <u>5</u> ( $\pm 2$ )
Ag/AgCl-NPs (50)	<u>13</u> ( $\pm 4$ ) / <u>7</u> ( $\pm 2$ )	<u>4</u> ( $\pm 5$ ) / <u>9</u> ( $\pm 5$ )	<u>8</u> ( $\pm 2$ ) / <u>8</u> ( $\pm 2$ )
Ag/AgCl-NPs (75)	10 ( $\pm 2$ ) / 22 ( $\pm 4$ )	16 ( $\pm 2$ ) / 50 ( $\pm 5$ )	32 ( $\pm 3$ ) / 29 ( $\pm 3$ )
Ag/AgCl-NPs (100)	23 ( $\pm 2$ ) / 33 ( $\pm 5$ )	35 ( $\pm 2$ ) / 66 ( $\pm 6$ )	49 ( $\pm 3$ ) / 52 ( $\pm 3$ )
Ag/AgCl-NPs (125)	36 ( $\pm 3$ ) / 48 ( $\pm 4$ )	53 ( $\pm 7$ ) / 67 ( $\pm 6$ )	58 ( $\pm 3$ ) / 80 ( $\pm 4$ )
Ag/AgCl-NPs (150)	55 ( $\pm 6$ ) / 63 ( $\pm 6$ )	72 ( $\pm 4$ ) / 83 ( $\pm 5$ )	87 ( $\pm 3$ ) / 93 ( $\pm 1$ )
Ag/AgCl-NPs (175)	64 ( $\pm 5$ ) / 81 ( $\pm 5$ )	86 ( $\pm 4$ ) / 94 ( $\pm 3$ )	93 ( $\pm 2$ ) / 96 ( $\pm 2$ )
Penicilina (10)	<u>5</u> ( $\pm 1$ ) / 15 ( $\pm 4$ )	1 ( $\pm 6$ ) / <u>5</u> ( $\pm 5$ )	6 ( $\pm 3$ ) / 0 ( $\pm 4$ )
Penicilina (25)	2 ( $\pm 1$ ) / 18 ( $\pm 3$ )	15 ( $\pm 2$ ) / 3 ( $\pm 3$ )	7 ( $\pm 1$ ) / 1 ( $\pm 3$ )
Penicilina (50)	9 ( $\pm 2$ ) / 22 ( $\pm 4$ )	10 ( $\pm 4$ ) / 3 ( $\pm 6$ )	5 ( $\pm 1$ ) / 3 ( $\pm 4$ )
Penicilina (75)	11 ( $\pm 3$ ) / 26 ( $\pm 5$ )	17 ( $\pm 7$ ) / 2 ( $\pm 4$ )	9 ( $\pm 2$ ) / 8 ( $\pm 3$ )
Penicilina (100)	18 ( $\pm 3$ ) / 27 ( $\pm 5$ )	33 ( $\pm 8$ ) / 25 ( $\pm 4$ )	16 ( $\pm 2$ ) / 9 ( $\pm 4$ )
Penicilina (125)	27 ( $\pm 3$ ) / 30 ( $\pm 3$ )	36 ( $\pm 4$ ) / 49 ( $\pm 2$ )	24 ( $\pm 2$ ) / 17 ( $\pm 3$ )
Penicilina (150)	80 ( $\pm 6$ ) / 78 ( $\pm 2$ )	39 ( $\pm 2$ ) / 65 ( $\pm 6$ )	32 ( $\pm 3$ ) / 33 ( $\pm 3$ )
Penicilina (175)	84 ( $\pm 7$ ) / 81 ( $\pm 4$ )	75 ( $\pm 2$ ) / 83 ( $\pm 5$ )	68 ( $\pm 4$ ) / 52 ( $\pm 5$ )
Estreptomicina (10)	23 ( $\pm 4$ ) / 33 ( $\pm 2$ )	35 ( $\pm 2$ ) / 32 ( $\pm 3$ )	69 ( $\pm 3$ ) / 31 ( $\pm 3$ )
Estreptomicina (25)	61 ( $\pm 4$ ) / 63 ( $\pm 4$ )	74 ( $\pm 2$ ) / 43 ( $\pm 3$ )	88 ( $\pm 2$ ) / 51 ( $\pm 5$ )
Estreptomicina (50)	64 ( $\pm 5$ ) / 70 ( $\pm 2$ )	75 ( $\pm 2$ ) / 77 ( $\pm 4$ )	88 ( $\pm 2$ ) / 79 ( $\pm 4$ )
Estreptomicina (75)	68 ( $\pm 4$ ) / 72 ( $\pm 3$ )	86 ( $\pm 5$ ) / 88 ( $\pm 3$ )	93 ( $\pm 4$ ) / 89 ( $\pm 3$ )
Estreptomicina (100)	80 ( $\pm 5$ ) / 74 ( $\pm 2$ )	87 ( $\pm 4$ ) / 89 ( $\pm 3$ )	94 ( $\pm 3$ ) / 90 ( $\pm 3$ )
Estreptomicina (125)	85 ( $\pm 5$ ) / 81 ( $\pm 4$ )	93 ( $\pm 2$ ) / 91 ( $\pm 3$ )	96 ( $\pm 2$ ) / 93 ( $\pm 2$ )
Estreptomicina (150)	86 ( $\pm 2$ ) / 83 ( $\pm 2$ )	94 ( $\pm 2$ ) / 93 ( $\pm 3$ )	97 ( $\pm 3$ ) / 94 ( $\pm 2$ )
Estreptomicina (175)	86 ( $\pm 4$ ) / 87 ( $\pm 2$ )	95 ( $\pm 1$ ) / 95 ( $\pm 3$ )	97 ( $\pm 3$ ) / 94 ( $\pm 2$ )

Os pontos sublinhados na tabela indicam que as células proliferaram em um nível superior ao do controle.

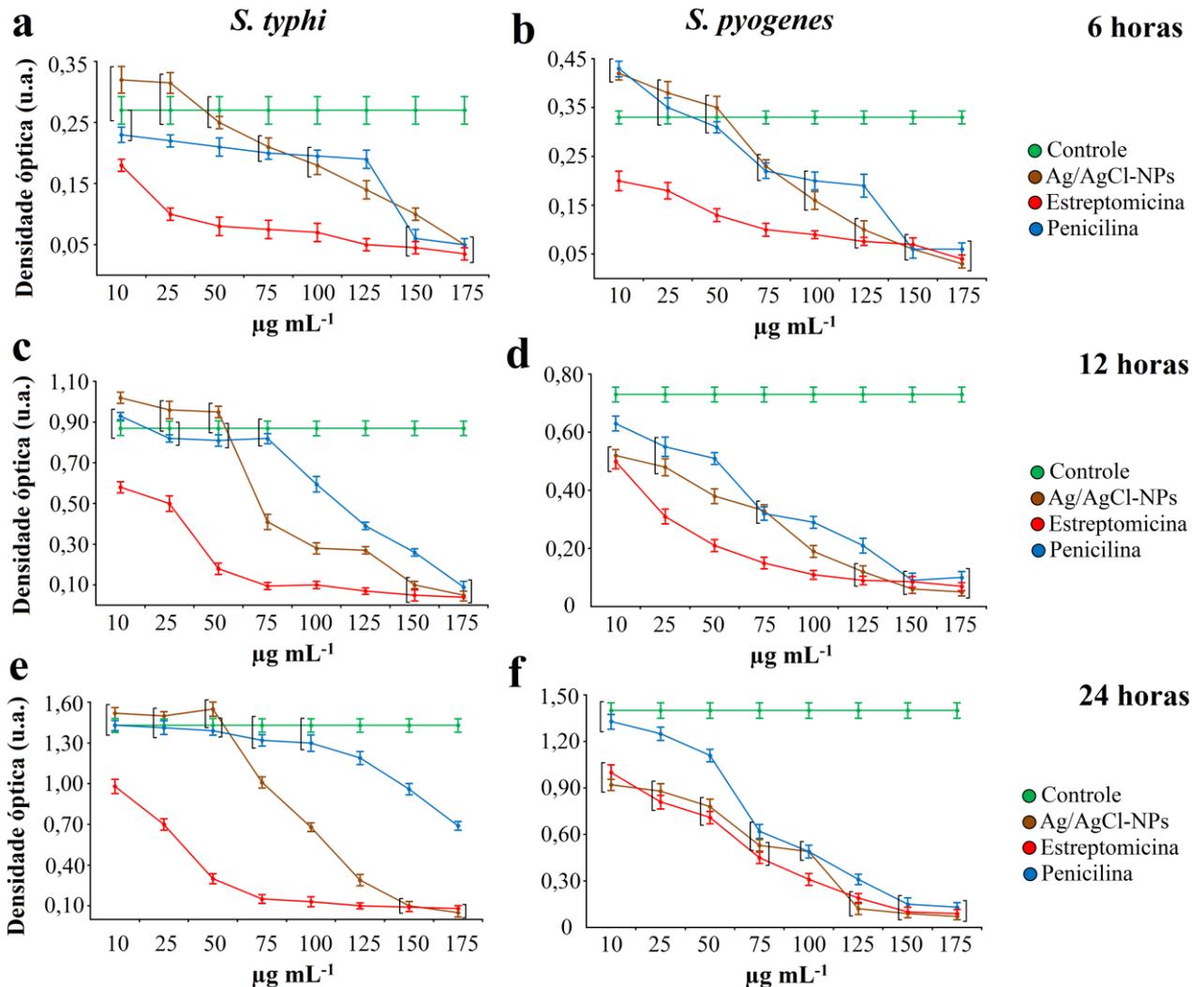
As bactérias *S. typhi* tratadas com penicilina apresentaram praticamente o mesmo desempenho nos dois ciclos em 6 h (Tabela 1), passando a apresentar uma pequena melhora no desempenho após 12 h, nas concentrações entre 125 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 1). Após 24 h, os desempenhos dos dois ciclos praticamente se igualam em todas as concentrações, com exceção de 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que apresentou pequena piora no desempenho (~68% no primeiro ciclo vs ~52% no segundo ciclo). Para o tratamento com estreptomicina, após 6 h, não houve diferença entre os dois ciclos, e em 12 h apenas a concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentou pequena piora no desempenho (Tabela 1). Após 24 h, as concentrações de 10 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram desempenho significativamente pior no segundo ciclo, enquanto 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  passou a apresentar piora na eficácia também (Tabela 1).

As bactérias *S. pyogenes* tratadas com penicilina apresentaram médias de inibição significativamente menores no segundo ciclo de tratamento, em 6 h, até 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , principalmente entre 10 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que apresentou níveis iguais ou maiores ao controle, o que não foi observado anteriormente (Tabela 2). No entanto, em 12 h, apesar nos níveis de proliferação continuarem maiores com relação ao primeiro ciclo, as bactérias tratadas até 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  passaram a apresentar densidade celular inferiores ao controle (Fig. 11d). Após 24 h, todas as concentrações inferiores a 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  permaneceram com a eficácia menor com relação ao primeiro ciclo, sendo mais evidente até 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 2). As únicas concentrações com desempenho igual ao primeiro ciclo foram 150 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , tendo em vista que as culturas não proliferaram no ensaio de recuperação (Fig. 10f), estando portanto, inviáveis. A estreptomicina, em 6 h, apresentou o mesmo desempenho em ambos os ciclos, em todas as concentrações (Tabela 2), no entanto, em 12 h, as bactérias passaram a se proliferar mais no segundo ciclo, nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 11d). Após 24 h, as bactérias ficaram mais resistentes ao tratamento nas concentrações até 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , inclusive apresentando níveis de proliferação muito semelhantes ao tratamento com Ag/AgCl-NPs, o que não era observado nessas condições no primeiro ciclo (Tabela 2). Entre 125 e 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$  as culturas não se proliferaram no ensaio de recuperação, e permaneceram sem apresentar proliferação neste segundo ciclo de tratamento. Os resultados indicaram que os tratamentos com ambos antibióticos em *S. pyogenes* no segundo ciclo apresentaram pior desempenho, já que ocorreu uma menor susceptibilidade ao tratamento.

**Tabela 2** – Média percentual da inibição da proliferação após diferentes tratamentos em *S. pyogenes*. A Tabela mostra o percentual médio de inibição em diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs, penicilina e estreptomicina usados como tratamento de *S. pyogenes*.

Tratamento ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Inibição da proliferação celular relativa ao controle (%) no 1º ciclo / 2º ciclo		
	6h	12h	24h
Ag/AgCl-NPs (10)	<u>50 (<math>\pm 3</math>)</u> / <u>31 (<math>\pm 4</math>)</u>	49 ( $\pm 2$ ) / 23 ( $\pm 3$ )	<u>22 (<math>\pm 2</math>)</u> / 34 ( $\pm 4$ )
Ag/AgCl-NPs (25)	<u>30 (<math>\pm 2</math>)</u> / <u>19 (<math>\pm 4</math>)</u>	<u>36 (<math>\pm 5</math>)</u> / 26 ( $\pm 4$ )	<u>23 (<math>\pm 2</math>)</u> / 37 ( $\pm 2$ )
Ag/AgCl-NPs (50)	25 ( $\pm 4$ ) / <u>12 (<math>\pm 2</math>)</u>	6 ( $\pm 5$ ) / 48 ( $\pm 5$ )	<u>14 (<math>\pm 2</math>)</u> / 44 ( $\pm 2$ )
Ag/AgCl-NPs (75)	42 ( $\pm 2$ ) / 28 ( $\pm 4$ )	69 ( $\pm 2$ ) / 49 ( $\pm 5$ )	18 ( $\pm 3$ ) / 62 ( $\pm 3$ )
Ag/AgCl-NPs (100)	45 ( $\pm 2$ ) / 44 ( $\pm 5$ )	74 ( $\pm 2$ ) / 71 ( $\pm 6$ )	21 ( $\pm 3$ ) / 65 ( $\pm 3$ )
Ag/AgCl-NPs (125)	60 ( $\pm 3$ ) / 59 ( $\pm 2$ )	87 ( $\pm 7$ ) / 77 ( $\pm 6$ )	67 ( $\pm 3$ ) / 91 ( $\pm 4$ )
Ag/AgCl-NPs (150)	58 ( $\pm 4$ ) / 78 ( $\pm 6$ )	89 ( $\pm 4$ ) / 88 ( $\pm 5$ )	90 ( $\pm 3$ ) / 93 ( $\pm 1$ )
Ag/AgCl-NPs (175)	75 ( $\pm 5$ ) / 87 ( $\pm 3$ )	90 ( $\pm 4$ ) / 90 ( $\pm 3$ )	93 ( $\pm 2$ ) / 95 ( $\pm 2$ )
Penicilina (10)	50 ( $\pm 1$ ) / <u>37 (<math>\pm 4</math>)</u>	81 ( $\pm 6$ ) / 15 ( $\pm 5$ )	77 ( $\pm 3$ ) / 5 ( $\pm 4$ )
Penicilina (25)	50 ( $\pm 1$ ) / <u>12 (<math>\pm 3</math>)</u>	83 ( $\pm 2$ ) / 23 ( $\pm 3$ )	78 ( $\pm 1$ ) / 11 ( $\pm 3$ )
Penicilina (50)	45 ( $\pm 2$ ) / 3 ( $\pm 7$ )	86 ( $\pm 4$ ) / 25 ( $\pm 6$ )	86 ( $\pm 1$ ) / 21 ( $\pm 4$ )
Penicilina (75)	60 ( $\pm 4$ ) / 31 ( $\pm 5$ )	87 ( $\pm 7$ ) / 48 ( $\pm 4$ )	91 ( $\pm 2$ ) / 56 ( $\pm 3$ )
Penicilina (100)	62 ( $\pm 2$ ) / 34 ( $\pm 5$ )	90 ( $\pm 8$ ) / 51 ( $\pm 4$ )	93 ( $\pm 2$ ) / 70 ( $\pm 4$ )
Penicilina (125)	75 ( $\pm 3$ ) / 37 ( $\pm 3$ )	94 ( $\pm 4$ ) / 67 ( $\pm 2$ )	95 ( $\pm 2$ ) / 78 ( $\pm 3$ )
Penicilina (150)	87 ( $\pm 6$ ) / 78 ( $\pm 4$ )	97 ( $\pm 2$ ) / 85 ( $\pm 6$ )	97 ( $\pm 3$ ) / 89 ( $\pm 3$ )
Penicilina (175)	90 ( $\pm 5$ ) / 75 ( $\pm 2$ )	97 ( $\pm 2$ ) / 84 ( $\pm 5$ )	97 ( $\pm 2$ ) / 91 ( $\pm 5$ )
Estreptomicina (10)	40 ( $\pm 3$ ) / 37 ( $\pm 2$ )	75 ( $\pm 2$ ) / 31 ( $\pm 3$ )	74 ( $\pm 3$ ) / 28 ( $\pm 3$ )
Estreptomicina (25)	45 ( $\pm 4$ ) / 44 ( $\pm 5$ )	77 ( $\pm 2$ ) / 55 ( $\pm 3$ )	75 ( $\pm 2$ ) / 42 ( $\pm 5$ )
Estreptomicina (50)	50 ( $\pm 3$ ) / 53 ( $\pm 3$ )	85 ( $\pm 2$ ) / 72 ( $\pm 4$ )	85 ( $\pm 2$ ) / 49 ( $\pm 4$ )
Estreptomicina (75)	50 ( $\pm 4$ ) / 59 ( $\pm 2$ )	87 ( $\pm 5$ ) / 75 ( $\pm 3$ )	88 ( $\pm 4$ ) / 68 ( $\pm 3$ )
Estreptomicina (100)	55 ( $\pm 5$ ) / 62 ( $\pm 4$ )	89 ( $\pm 4$ ) / 79 ( $\pm 3$ )	92 ( $\pm 3$ ) / 78 ( $\pm 3$ )
Estreptomicina (125)	75 ( $\pm 2$ ) / 69 ( $\pm 2$ )	90 ( $\pm 2$ ) / 85 ( $\pm 3$ )	94 ( $\pm 2$ ) / 86 ( $\pm 2$ )
Estreptomicina (150)	80 ( $\pm 3$ ) / 72 ( $\pm 2$ )	94 ( $\pm 2$ ) / 86 ( $\pm 3$ )	94 ( $\pm 3$ ) / 93 ( $\pm 2$ )
Estreptomicina (175)	82 ( $\pm 2$ ) / 84 ( $\pm 2$ )	95 ( $\pm 1$ ) / 88 ( $\pm 3$ )	95 ( $\pm 3$ ) / 93 ( $\pm 2$ )

Os pontos sublinhados na tabela indicam que as células proliferaram em um nível superior ao do controle.



**Figura 11. Ensaio antiproliferativo após recuperação das bactérias *S. typhi* e *S. pyogenes*.** (a) *S. typhi* tratada novamente com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 6 h. (b) *S. pyogenes* tratada novamente com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 6 h. (c) *S. typhi* tratada novamente com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 12 h. (d) *S. pyogenes* tratada novamente com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 12 h. (e) *S. typhi* tratada novamente com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 24 h. (f) *S. pyogenes* tratada novamente com Ag/AgCl-NPs e antibióticos por 24 h. Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.7. Análise da eficácia dos tratamentos com Ag/AgCl-NPs e os antibióticos penicilina e estreptomicina a partir da determinação do $IC_{50}$

Os dados  $IC_{50}$  são mostrados na Tabela 3 e são considerados um parâmetro indicativo de eficácia de tratamentos de bactérias com NPs (HOLMES *et al.*, 2015; RAO & BOOMINATHAN, 2016). Como o  $IC_{50}$  representa a concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular, quanto menor for o valor do  $IC_{50}$ , mais sensível é o microrganismo para este tratamento. Os valores classificados como "não determinado" foi devido ao efeito

pronunciado dos tratamentos em todas as oito concentrações na curva dose-resposta ou por apresentar coeficiente de regressão linear ( $r^2$ ) com valores abaixo de 0,8.

O tratamento com Ag/AgCl-NPs contra *S. typhi* claramente melhorou ao longo do tempo e foi melhor que o antibiótico penicilina (109 vs 182  $\mu\text{g mL}^{-1}$  após 24 h), no entanto, teve desempenho pior que a estreptomicina (147 vs 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em 6 h). No segundo ciclo de tratamento, as Ag/AgCl-NPs apresentaram desempenho melhor em todos os tempos, apesar de apresentar valores muito próximos em 24 h (105 vs 109  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em contrapartida, ambos antibióticos apresentaram desempenho pior. A penicilina teve  $\text{IC}_{50}$  aumentando de 182 para 213  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e a estreptomicina no primeiro ciclo não teve  $\text{IC}_{50}$  determinado em 12 e 24 h devido a agressividade do tratamento, no segundo ciclo teve esses valores determinados como 15 e 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, sendo ainda o tratamento mais eficaz dentre os analisados.

O tratamento com Ag/AgCl-NPs em *S. pyogenes* foi muito menos efetivo que a penicilina e a estreptomicina no primeiro ciclo de tratamento (120, 34 e 54  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em 6 h, respectivamente), sendo a penicilina o tratamento mais eficaz. No entanto, no segundo ciclo de tratamento, as Ag/AgCl-NPs melhoraram significativamente sua eficácia, com os valores diminuindo de 115 para 53  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto ambos antibióticos pioraram o seu efeito. Por isso, as Ag/AgCl-NPs passaram a apresentar melhor eficácia que a penicilina (53 vs 84  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e chegaram à níveis bem próximos da estreptomicina (53 vs 45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Tabela 3** – Valores de IC<sub>50</sub> de acordo com os vários tratamentos das bactérias *S. typhi* e *S. pyogenes* em diferentes momentos em que as análises da DO foram feitas.

Tratamento	Tempo (h)	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	
		<i>S. typhi</i> 1º tratamento / 2º tratamento	<i>S. pyogenes</i> 1º tratamento / 2º tratamento
Ag/AgCl-NPs	6	147 (±7) / 125 (±6)	120 (±9) / 116 (±7)
Ag/AgCl-NPs	12	121 (±6) / 102 (±5)	98 (±5,9) / 67 (±3)
Ag/AgCl-NPs	24	109 (±5) / 105 (±5)	115 (±12) / 53 (±3)
Penicilina	6	129 (±6) / 121 (±6)	34 (±2) / 124 (±9)
Penicilina	12	147 (±6) / 129 (±5)	ND / 90 (±7)
Penicilina	24	182 (±12) / 213 (±11)	ND / 84 (±7)
Estreptomicina	6	30 (±1) / 6 (±0,3)	54 (±4) / 48 (±4)
Estreptomicina	12	ND / 15 (±0,7)	ND / 13 (±1)
Estreptomicina	24	ND / 5 (±0,5)	ND / 45 (±3)

ND = não determinado.

### 5.1.8. Ensaio antiproliferativo nas leveduras *C. albicans* e *C. lusitaniae* com Ag/AgCl-NPs e o antibiótico anfotericina B

As Ag/AgCl-NPs biossintetizadas pela levedura *C. intermedia* foram analisadas quanto à sua atividade antiproliferativa contra as leveduras *C. albicans* (Fig. 12a) e *C. lusitaniae* (Fig. 12b). Este teste foi realizado a partir do tratamento das leveduras com 9 diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup>), de acordo com VAZQUEZ-MUÑOS *et al.* (2014), por 24, 48 e 72 h. Além disso, as leveduras foram tratadas com anfotericina B nas mesmas concentrações e tempo de incubação, para comparação.

Após 24 h, os tratamentos até 250 µg mL<sup>-1</sup> não surtiram efeito na levedura *C. albicans*, pois os níveis de proliferação foram semelhantes ao controle. No entanto, a partir de 300 µg

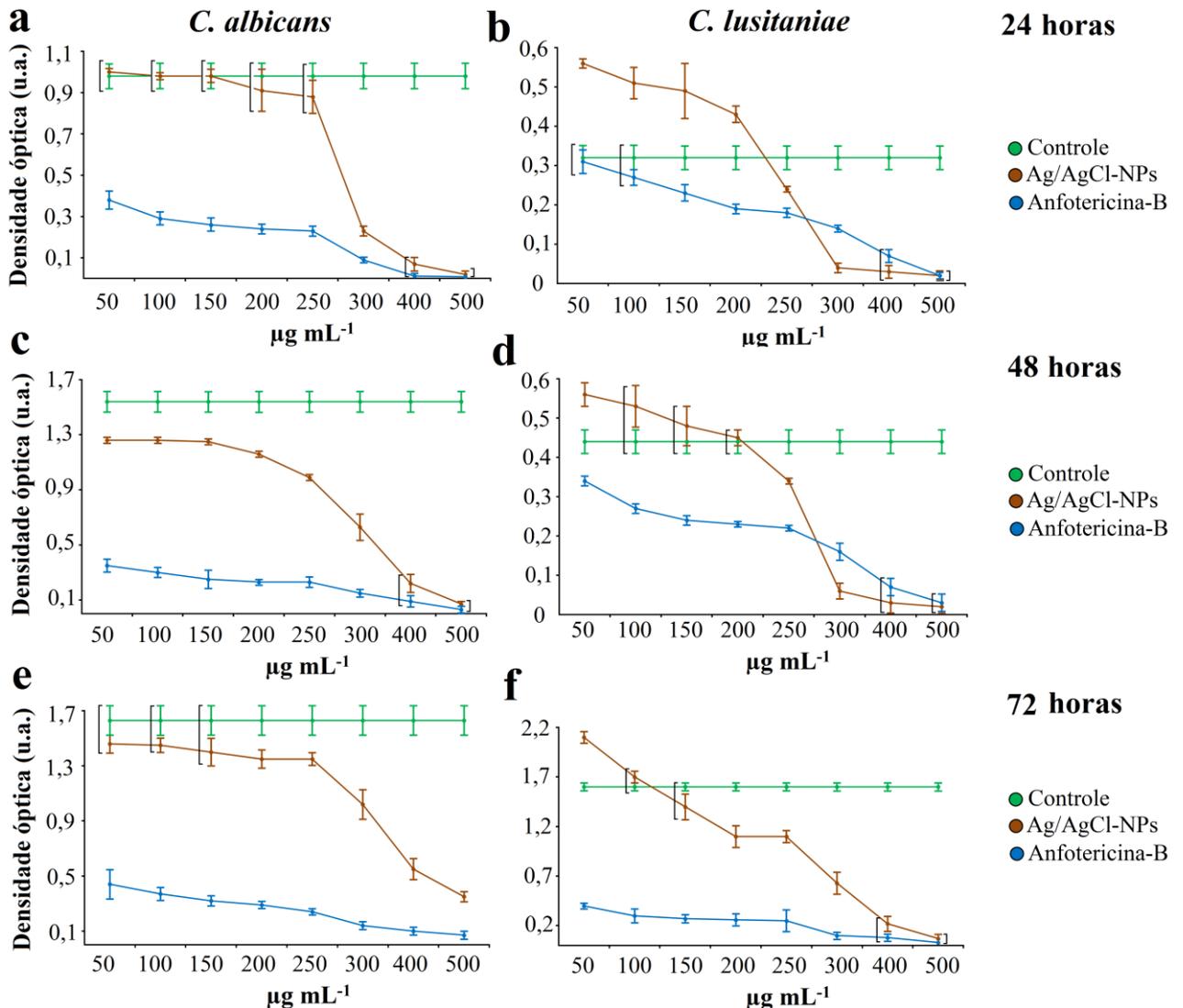
mL<sup>-1</sup> foi observado uma abrupta diminuição da proliferação, com níveis entre ~69% e ~96% (Fig. 12a). Já em 48 h, as concentrações entre 50 e 250 µg mL<sup>-1</sup> passaram a fazer mais efeito, no entanto, com níveis de proliferação relativamente próximos do controle (de 20 a 33% menor), enquanto as concentrações de 300 a 500 µg mL<sup>-1</sup> diminuem o efeito antiproliferativo (níveis entre 58-85%) (Fig. 12c). Após 72 h, os tratamentos entre 50 e 250 µg mL<sup>-1</sup> voltaram a diminuir o efeito antiproliferativo, com nível máximo de inibição de ~15%. Nas concentrações superiores (300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup>) o tratamento seguiu perdendo efeito, com níveis de inibição entre ~35%-75% (Fig. 12e).

O tratamento das culturas de *C. lusitaniae* com concentrações de Ag/AgCl-NPs até 200 µg mL<sup>-1</sup> levou a um grande estímulo da proliferação celular quando comparado ao controle, com estímulo da proliferação que variou de ~75-40%, em 24 h, enquanto na concentração de 250 µg mL<sup>-1</sup> foi observado uma pequena inibição de ~18%. Nas maiores concentrações foram observados grandes inibições, que variaram de ~85-90% (Fig. 12b). Após 48 h, notou-se que apenas 50 µg mL<sup>-1</sup> manteve o estímulo da proliferação, no entanto, as culturas até 200 µg mL<sup>-1</sup> permaneceram com níveis de proliferação iguais ou ligeiramente superiores ao controle. As concentrações superiores a 250 µg mL<sup>-1</sup> mantiveram o efeito antiproliferativo (Fig. 12d). Após 72 h, os tratamentos mantiveram o padrão de efeito antiproliferativo, com exceção da concentração de 200 µg mL<sup>-1</sup>, que melhorou o efeito, e a concentração de 300 µg mL<sup>-1</sup>, que piorou o efeito (Fig. 12f).

*C. albicans* tratada com anfotericina B teve um desempenho muito melhor que as Ag/AgCl-NPs, como observado em 24 h, nas concentrações até 250 µg mL<sup>-1</sup> (diferença de ~70%), mas nas concentrações de 300 a 500 µg mL<sup>-1</sup> teve desempenho similar (Fig.12a). Após 48 h as diferenças se mantiveram na faixa ~70% para o tratamento com Ag/AgCl-NPs até 250 µg mL<sup>-1</sup>, enquanto aumentou na concentração de 300 µg mL<sup>-1</sup> (Fig. 12c). Ao final das 72 h, foi observada uma manutenção da diferença dos efeitos até 300 µg mL<sup>-1</sup>, no entanto em 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup>, as Ag/AgCl-NPs diminuíram o efeito com relação à anfotericina B (Fig. 12e).

Para a espécie *C. lusitaniae*, não houve diferença estatística do tratamento com 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup> para o controle. Entre 150 e 250 µg mL<sup>-1</sup> foi observado inibição de ~28-39%, em todos os casos, mais efetivo que as Ag/AgCl-NPs. Já nas concentrações de 300 a 500 µg mL<sup>-1</sup> o desempenho foi pior ou semelhante ao das Ag/AgCl-NPs (Fig. 12b). Após 48 h, as concentrações até 100 µg mL<sup>-1</sup> melhoraram o efeito, com níveis de inibição entre (~23-38%), e mantiveram o efeito nos mesmo níveis nas demais concentrações (Fig. 12d). Surpreendentemente, após 72 h, o tratamento melhorou seu efeito em todas as concentrações,

variando entre ~75% na menor concentração, e ~95% na maior, sendo mais eficaz que as Ag/AgCl-NPs até 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e igual em 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 12f).



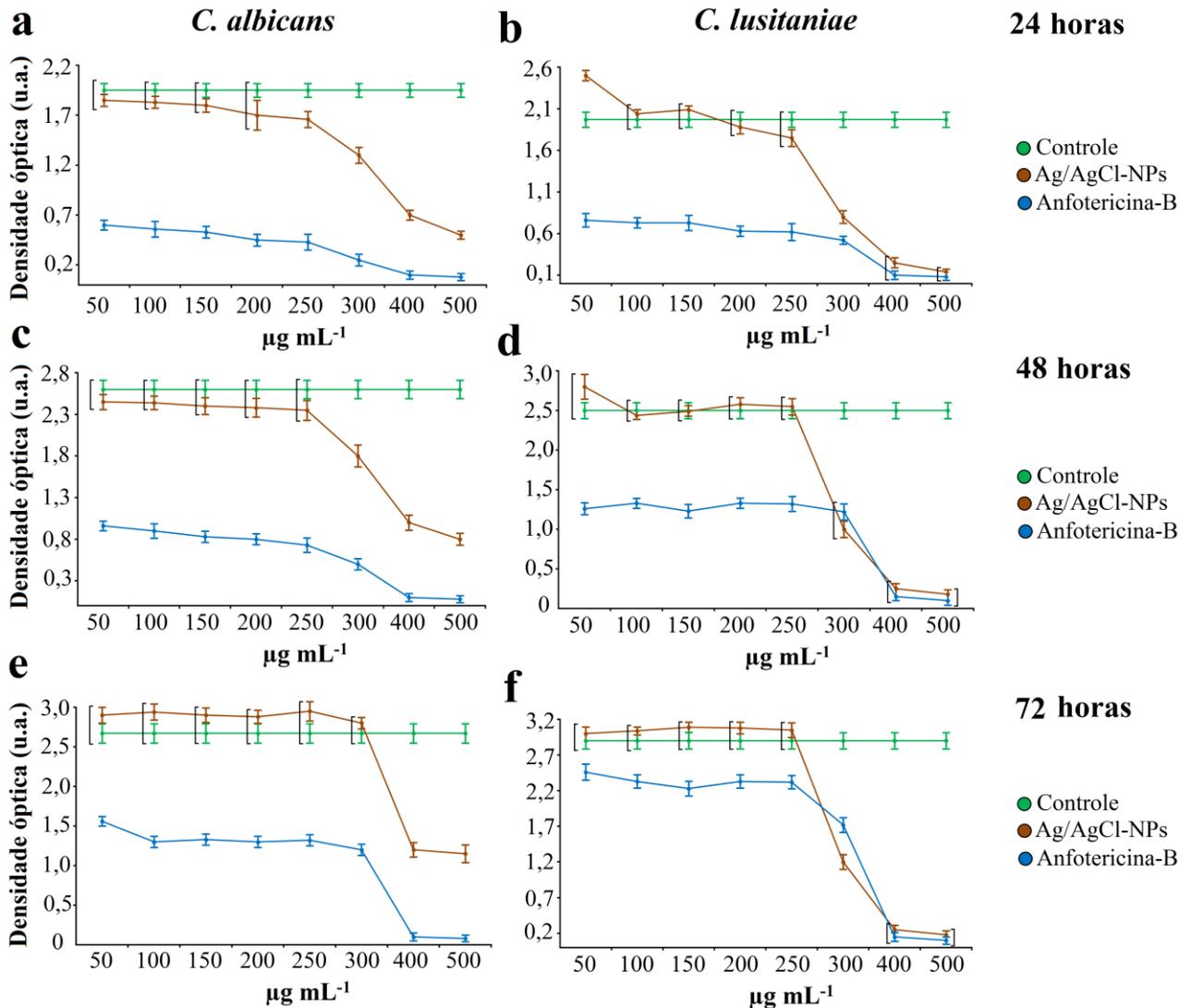
**Figura 12. Ensaio antiproliferativo nas leveduras *C. albicans* e *C. lusitanae*.** (a) *C. albicans* tratada com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 24 h. (b) *C. lusitanae* tratada com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 24 h. (c) *C. albicans* tratada com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 48 h. (d) *C. lusitanae* tratada com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 48 h. (e) *C. albicans* tratada com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 72 h. (f) *C. lusitanae* tratada com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 72 h. Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.9. Ensaio de recuperação das leveduras *C. albicans* e *C. lusitaniae* após tratamentos por 72 horas com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B

Para o ensaio de recuperação, após 72 h de tratamento com as Ag/AgCl-NPs ou com anfotericina B nas concentrações de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , as leveduras foram lavadas e ressuspensas em meio de cultura puro, para investigar se após os tratamentos as culturas seriam reestabelecidas.

Após 72 h de tratamento com Ag/AgCl-NPs, culturas de *C. albicans* previamente tratadas com concentrações até 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  já apresentavam densidade celular igual ao controle (Fig. 12e), e durante o ensaio de recuperação, foi observado que após 24, 48 e 72 h, as culturas com 200, 250 e 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram capazes de se reestabelecer, atingindo densidade celular próximas ao controle. As culturas tratadas com 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não se reestabeleceram, porque apesar de aumentar progressivamente a densidade celular ao longo do tempo, não chegou aos níveis do controle (Fig. 13a, c, e). As culturas previamente tratadas com anfotericina B não foram capazes de se reestabelecer após 72 h de ensaio de recuperação em nenhuma concentração (Fig. 13a, c, e). No entanto, pôde-se observar uma diminuição da diferença entre a densidade celular do controle para os tratados com concentrações até 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , de ~75-90% ao final do tratamento, para ~42-52% ao final da recuperação (Fig. 13e), portanto havendo uma tendência ao reestabelecimento caso as culturas permanecessem mais tempo sem o tratamento. Por outro lado, as culturas com 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não se proliferaram, ao contrário do que foi observado nas culturas anteriormente tratadas com Ag/AgCl-NPs (Fig 13e).

Nas leveduras *C. lusitaniae*, após 24 h, já era observada recuperação das culturas previamente tratadas com 200 e 250 (Fig. 13b), que se mantiveram até 72 h (Fig. 13f). As culturas tratadas com concentrações menores já apresentavam proliferação igual ao controle (Fig. 12f). As culturas previamente tratadas com 300, 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em 72 h deixaram de proliferar, sugerindo perda da viabilidade dessas culturas (Fig. 13b, d, f). Já para o tratamento com anfotericina B, foi observado um aumento progressivo da densidade celular das culturas que haviam sido tratadas com 50 até 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 13b, d, f), chegando à níveis de densidade celular bem próximos do controle (~13-20% menores), claramente tendendo ao reestabelecimento após 72h. Nas concentrações maiores não foi observado qualquer alteração da densidade celular, indicando que as culturas não estavam mais viáveis após 72 h de recuperação (Fig. 13f).



**Figura 13. Ensaio recuperação após tratamentos leveduras *C. albicans* e *C. lusitaniae* com Ag/AgCl-NPs ou anfotericina B** (a) *C. albicans* após tratamento com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 24 h. (b) *C. lusitaniae* após tratamento com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 24 h. (c) *C. albicans* após tratamento com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 48 h. (d) *C. lusitaniae* após tratamentos com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 48 h. (e) *C. albicans* após tratamentos com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 72 h. (f) *C. lusitaniae* após tratamentos com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 72 h. Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.10. Segundo ciclo de ensaio antiproliferativo com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B contra *C. albicans* e *C. lusitaniae*

Devido a recuperação observada nas culturas de *C. albicans* e *C. lusitaniae* após os tratamentos com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B, foi feito um segundo ciclo de tratamento com as NPs e o antibiótico após decorridos 72 h de recuperação. Este ensaio teve como

objetivo investigar se as leveduras das culturas reestabelecidas seriam sensíveis à um segundo ciclo de tratamento.

Após 24 h do segundo ciclo de tratamento com Ag/AgCl-NPs em *C. albicans*, observou-se um estímulo da proliferação nas concentrações até 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que não era visto no primeiro ciclo. No entanto, em 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foi possível observar uma inibição de ~39%, enquanto que, no primeiro ciclo, os níveis de proliferação foram iguais ao controle. Nas demais concentrações, o efeito antiproliferativo não foi alterado em ambos ciclos (Tabela 4). Em 48 h, as concentrações até 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mantiveram o efeito estimulatório, enquanto que no primeiro ciclo foi observado uma inibição em torno de 21%. Além disso, a concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  gerou uma inibição de ~27%, enquanto neste segundo ciclo não diferiu do controle. Por outro lado, as concentrações de 250 e 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram melhor efeito no segundo ciclo (~33-58% vs 63-75%) (Tabela 4). Após 72 h, as concentrações de 50 e 200 apresentaram desempenho pior no segundo ciclo, enquanto em 100 e 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , desempenho similar. Já para as concentrações de 250 até 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  o desempenho no segundo ciclo permaneceu melhor (Tabela 4), inclusive em 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não houve proliferação de 48 para 72 h, indicando forte efeito inibitório (Fig. 14e). Portanto, o segundo tratamento tendeu a ser menos eficaz nas concentrações mais baixas e mais eficaz nas mais altas.

O segundo ciclo de tratamento com anfotericina B não revelou diferenças para o primeiro ciclo (Tabela 4). No entanto, devido à melhora na eficácia das Ag/AgCl-NPs, neste segundo ciclo, o desempenho de ambos tratamentos foi igual a partir de 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e bem próximo em 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 14e).

Nos testes com *C. lusitaniae*, os efeitos do segundo ciclo foram semelhantes ao primeiro ciclo, após 24 h, em todas concentrações, com exceção de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que no segundo ciclo passou a exibir níveis de proliferação iguais ao controle e 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 5). Surpreendentemente, no período de 48 h (Fig. 14d), o segundo ciclo de tratamento com Ag/AgCl-NPs passou a estimular fortemente a proliferação das culturas até 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto no primeiro ciclo houve estímulo apenas em 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Além disso, a concentração de 250 passou a exibir níveis de proliferação iguais ao controle, ao invés da inibição de ~18 do primeiro ciclo. As concentrações superiores não diferiram em ambos os ciclos (Tabela 5). Após 72 h, os níveis de proliferação no segundo ciclo se mantiveram mais altos com relação ao primeiro ciclo, porém, curiosamente, a partir da concentração de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  o segundo ciclo passou a exibir um forte efeito inibitório (de 74% até 96%), que só foi

observado no primeiro ciclo nas concentrações de 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 5), que não se recuperaram, e portanto, estavam inviáveis (Fig. 13f).

**Tabela 4** – Média percentual da inibição da proliferação após diferentes tratamentos em *C. albicans*. A Tabela mostra o percentual médio de inibição em diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs e anfotericina B usados como tratamento de *C. albicans*.

Tratamento ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Inibição da proliferação celular relativa ao controle (%) no 1º ciclo / 2º ciclo		
	24h	48h	72h
Ag/AgCl-NPs (50)	<u>2 (<math>\pm 3</math>) / 33 (<math>\pm 4</math>)</u>	20 ( $\pm 2$ ) / 28 ( $\pm 3$ )	11 ( $\pm 2$ ) / 17 ( $\pm 4$ )
Ag/AgCl-NPs (100)	0 ( $\pm 2$ ) / <u>28 (<math>\pm 4</math>)</u>	20 ( $\pm 5$ ) / <u>27 (<math>\pm 4</math>)</u>	12 ( $\pm 2$ ) / <u>16 (<math>\pm 2</math>)</u>
Ag/AgCl-NPs (150)	0 ( $\pm 4$ ) / <u>33 (<math>\pm 2</math>)</u>	21 ( $\pm 5$ ) / <u>25 (<math>\pm 5</math>)</u>	14 ( $\pm 2$ ) / <u>17 (<math>\pm 2</math>)</u>
Ag/AgCl-NPs (200)	8 ( $\pm 2$ ) / 2 ( $\pm 4$ )	27 ( $\pm 2$ ) / <u>3 (<math>\pm 5</math>)</u>	19 ( $\pm 3$ ) / <u>5 (<math>\pm 3</math>)</u>
Ag/AgCl-NPs (250)	12 ( $\pm 2$ ) / 39 ( $\pm 5$ )	33 ( $\pm 2$ ) / 62 ( $\pm 6$ )	17 ( $\pm 3$ ) / 58 ( $\pm 3$ )
Ag/AgCl-NPs (300)	69 ( $\pm 3$ ) / 63 ( $\pm 2$ )	58 ( $\pm 7$ ) / 75 ( $\pm 6$ )	35 ( $\pm 3$ ) / 84 ( $\pm 4$ )
Ag/AgCl-NPs (400)	90 ( $\pm 4$ ) / 89 ( $\pm 6$ )	81 ( $\pm 4$ ) / 94 ( $\pm 3$ )	64 ( $\pm 3$ ) / 92 ( $\pm 1$ )
Ag/AgCl-NPs (500)	96 ( $\pm 1$ ) / 94 ( $\pm 3$ )	94 ( $\pm 4$ ) / 97 ( $\pm 1$ )	76 ( $\pm 2$ ) / 96 ( $\pm 2$ )
Anfotericina B (50)	61 ( $\pm 1$ ) / 60 ( $\pm 4$ )	74 ( $\pm 6$ ) / 71 ( $\pm 5$ )	76 ( $\pm 3$ ) / 63 ( $\pm 4$ )
Anfotericina B (100)	69 ( $\pm 1$ ) / 63 ( $\pm 3$ )	77 ( $\pm 2$ ) / 73 ( $\pm 3$ )	78 ( $\pm 1$ ) / 65 ( $\pm 3$ )
Anfotericina B (150)	71 ( $\pm 2$ ) / 69 ( $\pm 7$ )	78 ( $\pm 4$ ) / 75 ( $\pm 6$ )	79 ( $\pm 1$ ) / 67 ( $\pm 4$ )
Anfotericina B (200)	72 ( $\pm 1$ ) / 70 ( $\pm 5$ )	79 ( $\pm 7$ ) / 77 ( $\pm 4$ )	80 ( $\pm 2$ ) / 68 ( $\pm 3$ )
Anfotericina B (250)	73 ( $\pm 1$ ) / 71 ( $\pm 5$ )	80 ( $\pm 8$ ) / 78 ( $\pm 4$ )	81 ( $\pm 2$ ) / 70 ( $\pm 4$ )
Anfotericina B (300)	90 ( $\pm 3$ ) / 84 ( $\pm 3$ )	84 ( $\pm 4$ ) / 84 ( $\pm 2$ )	84 ( $\pm 2$ ) / 71 ( $\pm 3$ )
Anfotericina B (400)	97 ( $\pm 1$ ) / 91 ( $\pm 2$ )	90 ( $\pm 2$ ) / 95 ( $\pm 3$ )	90 ( $\pm 3$ ) / 95 ( $\pm 3$ )
Anfotericina B (500)	97 ( $\pm 2$ ) / 95 ( $\pm 2$ )	97 ( $\pm 1$ ) / 97 ( $\pm 1$ )	94 ( $\pm 4$ ) / 96 ( $\pm 3$ )

Os pontos sublinhados na tabela indicam que as células proliferaram em um nível superior ao do controle.

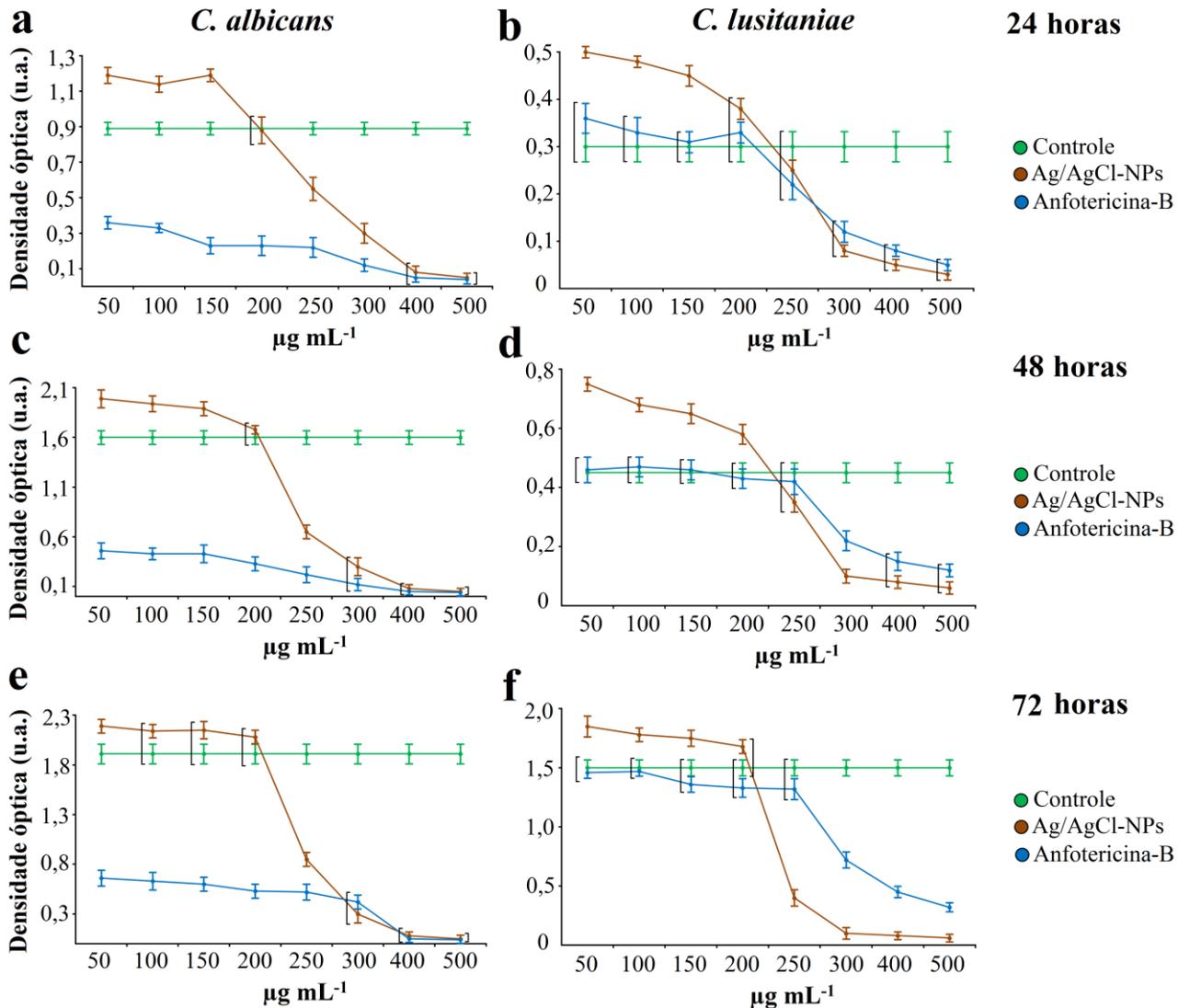
O tratamento com anfotericina B em *C. lusitaniae* passou a apresentar um desempenho inferior no segundo ciclo até a concentração de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , no entanto, estatisticamente significativo apenas a partir de 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nas demais concentrações o desempenho foi similar (Tabela 5). O desempenho pior permaneceu após 48 h, com todas as concentrações até

250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentando níveis de proliferação iguais ao controle, enquanto nas concentrações de 300 até 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentou um desempenho ligeiramente inferior (Tabela 5). Após 72 h, as culturas entre 300 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tiveram piora significativa no desempenho no segundo ciclo (de ~90-94% para ~45-70%) (Tabela 5). Este resultado chamou atenção pois as culturas tratadas no primeiro ciclo com 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não foram capazes de aumentar a densidade celular, portanto o fato do desempenho ter piorado tão significativamente nessas concentrações é surpreendente (Fig. 13f).

**Tabela 5** – Média percentual da inibição da proliferação após diferentes tratamentos em *C. lusitaniae*. A Tabela mostra o percentual médio de inibição em diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs e anfotericina B usados como tratamento de *C. lusitaniae*.

Tratamento ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Inibição da proliferação celular relativo ao controle (%) no 1º ciclo / 2º ciclo		
	24h	48h	72h
Ag/AgCl-NPs (50)	<u>75</u> ( $\pm 3$ ) / <u>66</u> ( $\pm 4$ )	<u>27</u> ( $\pm 2$ ) / <u>81</u> ( $\pm 3$ )	<u>31</u> ( $\pm 2$ ) / <u>27</u> ( $\pm 4$ )
Ag/AgCl-NPs (100)	<u>62</u> ( $\pm 2$ ) / <u>60</u> ( $\pm 4$ )	<u>23</u> ( $\pm 5$ ) / <u>58</u> ( $\pm 4$ )	<u>9</u> ( $\pm 2$ ) / <u>25</u> ( $\pm 2$ )
Ag/AgCl-NPs (150)	<u>52</u> ( $\pm 4$ ) / <u>50</u> ( $\pm 2$ )	<u>9</u> ( $\pm 5$ ) / <u>58</u> ( $\pm 5$ )	<u>9</u> ( $\pm 2$ ) / <u>22</u> ( $\pm 2$ )
Ag/AgCl-NPs (200)	<u>40</u> ( $\pm 2$ ) / <u>26</u> ( $\pm 4$ )	<u>2</u> ( $\pm 2$ ) / <u>35</u> ( $\pm 5$ )	<u>25</u> ( $\pm 3$ ) / <u>13</u> ( $\pm 3$ )
Ag/AgCl-NPs (250)	19 ( $\pm 2$ ) / 13 ( $\pm 5$ )	18 ( $\pm 2$ ) / 19 ( $\pm 6$ )	25 ( $\pm 3$ ) / 73 ( $\pm 3$ )
Ag/AgCl-NPs (300)	84 ( $\pm 3$ ) / 67 ( $\pm 2$ )	82 ( $\pm 7$ ) / 77 ( $\pm 6$ )	56 ( $\pm 3$ ) / 92 ( $\pm 4$ )
Ag/AgCl-NPs (400)	86 ( $\pm 4$ ) / 80 ( $\pm 6$ )	89 ( $\pm 4$ ) / 81 ( $\pm 5$ )	81 ( $\pm 3$ ) / 95 ( $\pm 1$ )
Ag/AgCl-NPs (500)	91 ( $\pm 5$ ) / 90 ( $\pm 3$ )	91 ( $\pm 4$ ) / 93 ( $\pm 3$ )	89 ( $\pm 2$ ) / 97 ( $\pm 1$ )
Anfotericina B (50)	6 ( $\pm 1$ ) / <u>20</u> ( $\pm 4$ )	23 ( $\pm 6$ ) / <u>5</u> ( $\pm 5$ )	75 ( $\pm 3$ ) / 3 ( $\pm 4$ )
Anfotericina B (100)	16 ( $\pm 1$ ) / <u>10</u> ( $\pm 3$ )	39 ( $\pm 2$ ) / <u>7</u> ( $\pm 3$ )	81 ( $\pm 1$ ) / 3 ( $\pm 3$ )
Anfotericina B (150)	28 ( $\pm 2$ ) / <u>3</u> ( $\pm 7$ )	43 ( $\pm 4$ ) / <u>5</u> ( $\pm 6$ )	82 ( $\pm 1$ ) / 10 ( $\pm 4$ )
Anfotericina B (200)	37 ( $\pm 1$ ) / <u>10</u> ( $\pm 5$ )	45 ( $\pm 7$ ) / 7 ( $\pm 4$ )	82 ( $\pm 2$ ) / 11 ( $\pm 3$ )
Anfotericina B (250)	39 ( $\pm 1$ ) / 26 ( $\pm 5$ )	48 ( $\pm 8$ ) / 9 ( $\pm 4$ )	83 ( $\pm 2$ ) / 12 ( $\pm 4$ )
Anfotericina B (300)	47 ( $\pm 3$ ) / 56 ( $\pm 3$ )	57 ( $\pm 4$ ) / 49 ( $\pm 2$ )	90 ( $\pm 2$ ) / 45 ( $\pm 3$ )
Anfotericina B (400)	72 ( $\pm 6$ ) / 63 ( $\pm 2$ )	77 ( $\pm 2$ ) / 65 ( $\pm 6$ )	91 ( $\pm 3$ ) / 66 ( $\pm 3$ )
Anfotericina B (500)	91 ( $\pm 5$ ) / 73 ( $\pm 2$ )	86 ( $\pm 2$ ) / 74 ( $\pm 5$ )	94 ( $\pm 4$ ) / 70 ( $\pm 5$ )

Os pontos sublinhados na tabela indicam que as células proliferaram em um nível superior ao do controle.



**Figura 14.** Ensaio antiproliferativo após recuperação das leveduras *C. albicans* e *C. lusitaniae* novamente tratadas com Ag/AgCl-NPs ou anfotericina B (a) *C. albicans* após tratamento com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 24 h. (b) *C. lusitaniae* após tratamento com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 24 h. (c) *C. albicans* após tratamento com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 48 h. (d) *C. lusitaniae* após tratamentos com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 48 h. (e) *C. albicans* após tratamentos com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 72 h. (f) *C. lusitaniae* após tratamentos com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B por 72 h. Os grupos marcados por colchetes não diferem entre si, dentro da mesma concentração, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.11. Análise da eficácia dos tratamentos com Ag/AgCl-NPs e anfotericina B a partir da determinação do IC<sub>50</sub>

Os dados IC<sub>50</sub> são mostrados na Tabela 6 e são um bom indicativo na eficácia dos tratamentos contra leveduras tratadas com NPs (VAZQUEZ-MUÑOS *et al.*, 2014; LARA *et al.*, 2015). Os valores classificados como "não determinado" foi devido ao efeito pronunciado

dos tratamentos em todas as nove concentrações na curva dose-resposta ou por apresentar coeficiente de regressão linear ( $r^2$ ) com valores abaixo de 0,8.

O tratamento com Ag/AgCl-NPs em *C. albicans* em ambos os ciclos foi inferior ao tratamento com anfotericina B, visto que a impossibilidade da determinação do IC<sub>50</sub> para o antibiótico foi devido, em grande parte, ao efeito pronunciado da droga em todas as concentrações testadas. No entanto, é importante ressaltar que, após o segundo ciclo de tratamento, os valores de IC<sub>50</sub> caíram significativamente para o tratamento com Ag/AgCl-NPs em 72 h (de 358 para 293  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), sugerindo melhora da eficácia do tratamento após duas sessões.

Observou-se o mesmo padrão para *C. lusitaniae*, pois o tratamento com Ag/AgCl-NPs foi pior que a anfotericina B até 48 h (304 vs 215  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), e o tratamento apresentou uma pequena melhora após o seundo ciclo (301 vs 290  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ao contrário da anfotericina B, que apresentou uma abrupta piora no efeito contra a levedura, com um aumento de mais de 70% no valor do IC<sub>50</sub> em 48 h (de 215 para 370  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Tabela 6** – A Tabela 6 mostra a evolução dos valores de IC<sub>50</sub> de acordo com os vários tratamentos das leveduras do gênero *Cândida* spp. em diferentes momentos em que as análises da DO foram feitas.

Tratamento	Tempo (h)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
		<i>C.albicans</i>	<i>C. lusitaniae</i>
		1º tratamento / 2º tratamento	1º tratamento / 2º tratamento
Ag/AgCl-NPs	24	297 ( $\pm 28$ ) / 320 ( $\pm 25$ )	333 ( $\pm 36$ ) / 353 ( $\pm 33$ )
Ag/AgCl-NPs	48	274 ( $\pm 22$ ) / 306 ( $\pm 18$ )	304 ( $\pm 36$ ) / 344 ( $\pm 17$ )
Ag/AgCl-NPs	72	358 ( $\pm 14$ ) / 293 ( $\pm 17$ )	301 ( $\pm 16$ ) / 290 ( $\pm 20$ )
Anfotericina B	24	<b>ND / ND</b>	280 ( $\pm 16$ ) / 369 ( $\pm 28$ )
Anfotericina B	48	<b>ND / ND</b>	215 ( $\pm 12$ ) / 370 ( $\pm 25$ )
Anfotericina B	72	<b>ND / ND</b>	<b>ND / 363 (<math>\pm 21</math>)</b>

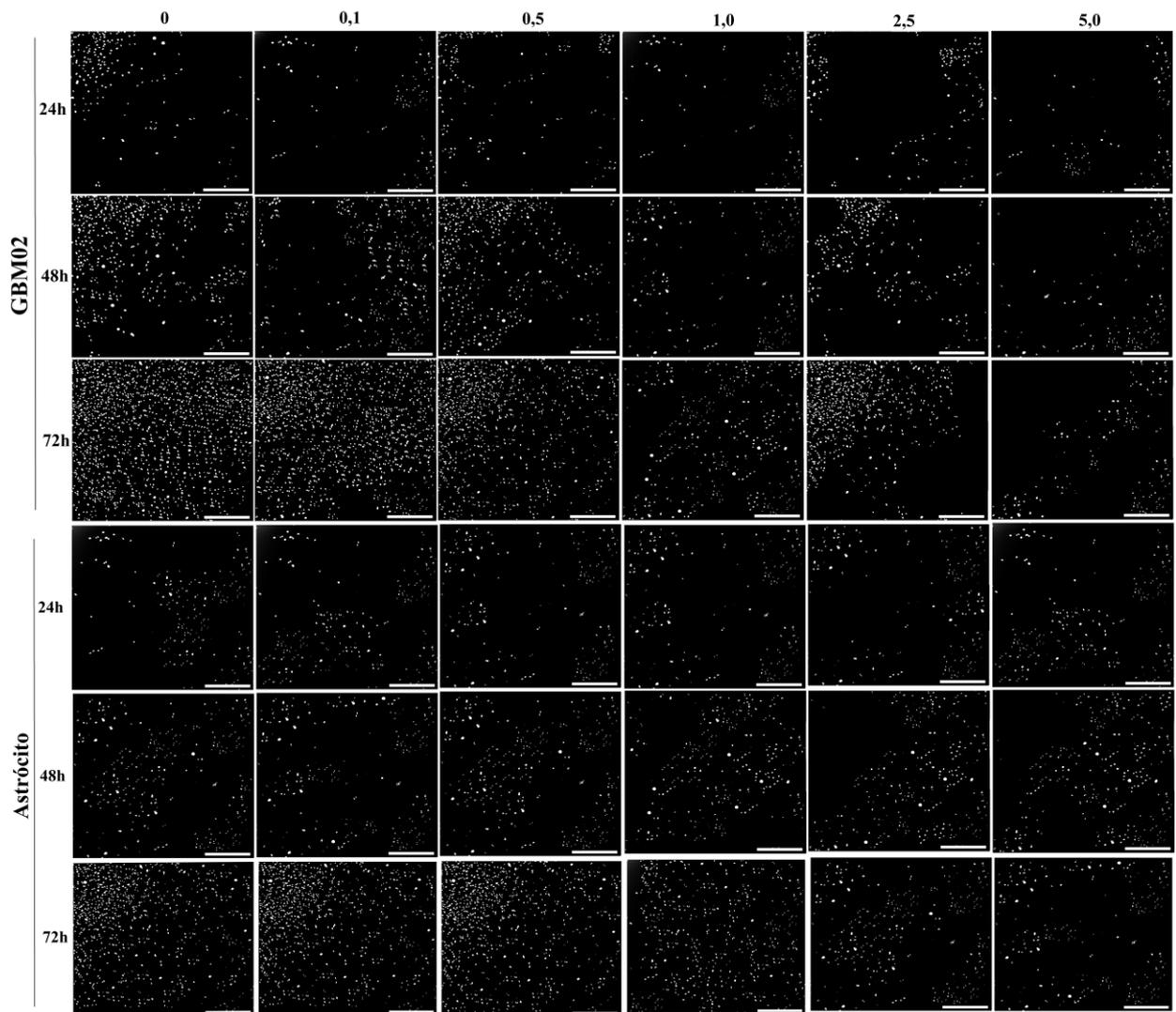
ND = não determinado.

## 5.2. Avaliação da atividade antitumoral em glioblastoma multiforme (GBM02) de Ag/AgCl-NPs produzidas por *C. lusitaniae*

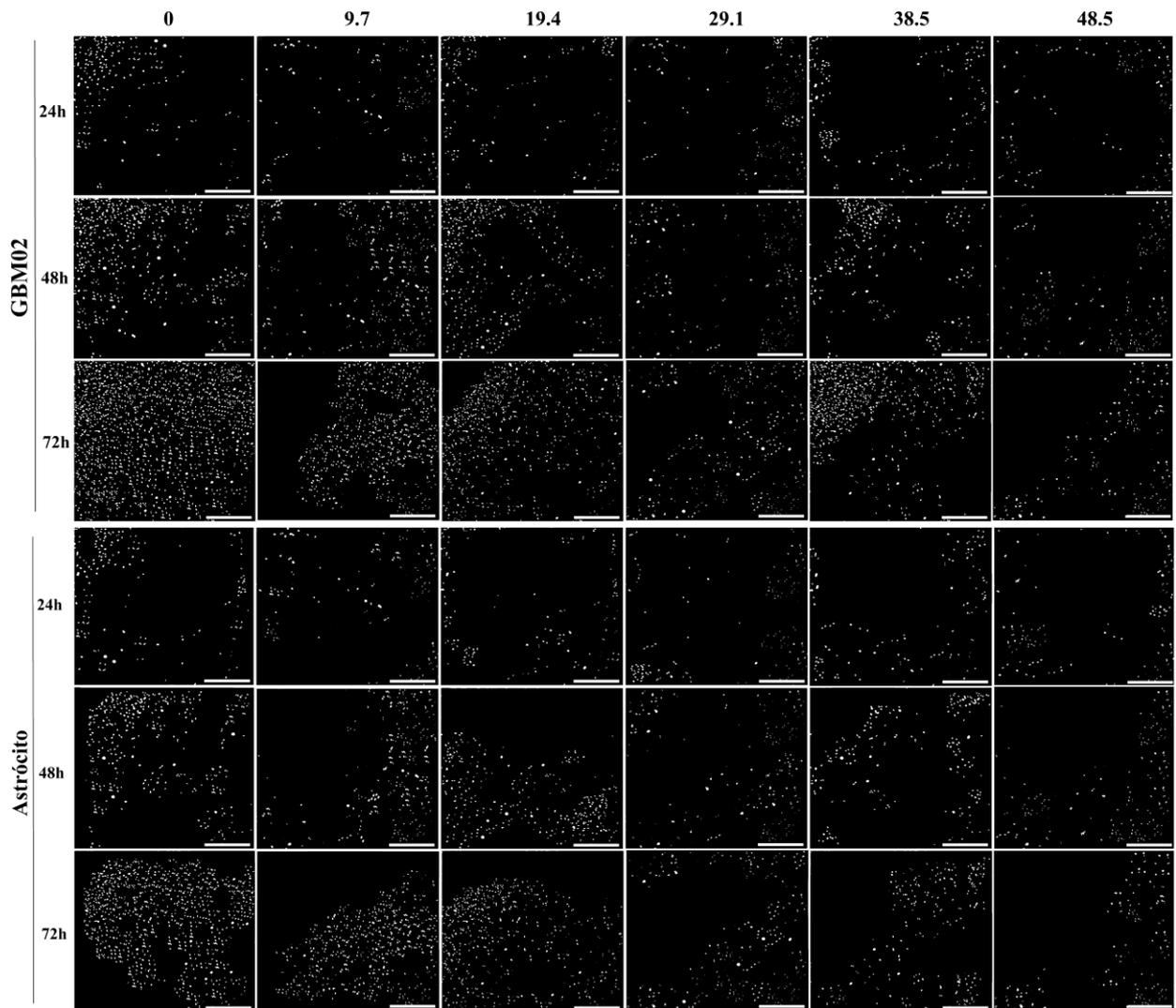
### 5.2.1. Ensaio antiproliferativo de células tumorais (GBM02) e astrócitos humanos tratados com Ag/AgCl-NPs e o quimioterápico temozolamida (TMZ)

Ag/AgCl-NPs produzidas por *C. lusitaniae* têm efeito microbicida potente (Eugenio *et al.*, 2016), mas seu efeito contra a proliferação de células tumorais não foi examinado. Para este fim, utilizou-se o método baseado em imagens para análise de alto conteúdo (HCA) (tradução livre do inglês *high-content analysis*) - frequentemente utilizado na descoberta de medicamentos (YOUNG *et al.*, 2008) e para aplicações de NPs (BRAYDEN *et al.*, 2015), para a contagem do número de células, através da contagem automática do núcleo celular de células tratadas e não tratadas, através da coloração específica do DNA pelo corante fluorescente Hoechst 33258 (ANGUISSOLA *et al.*, 2014) - para estudar o efeito de diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs, isoladamente ou em combinação com o fármaco antitumoral TMZ, sobre a proliferação de uma linhagem celular de glioblastoma multiforme (GBM02). Como controle, também foi testado Ag/AgCl-NPs contra astrócitos humanos isolados de tecido cerebral cortical saudável (removido de pacientes submetidos a cirurgia para epilepsia), para avaliar a seletividade dos tratamentos contra células tumorais. Escolhemos concentrações de TMZ variando de 9,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a um máximo de 48,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que tem um impacto semelhante na viabilidade celular à dose recomendada pelas Diretrizes de Prática Clínica em Oncologia (Diretrizes NCCN) para o tratamento de tumores do sistema nervoso central (350  $\mu\text{M}$  ou 67,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (BALÇA-SILVA *et al.*, 2014).

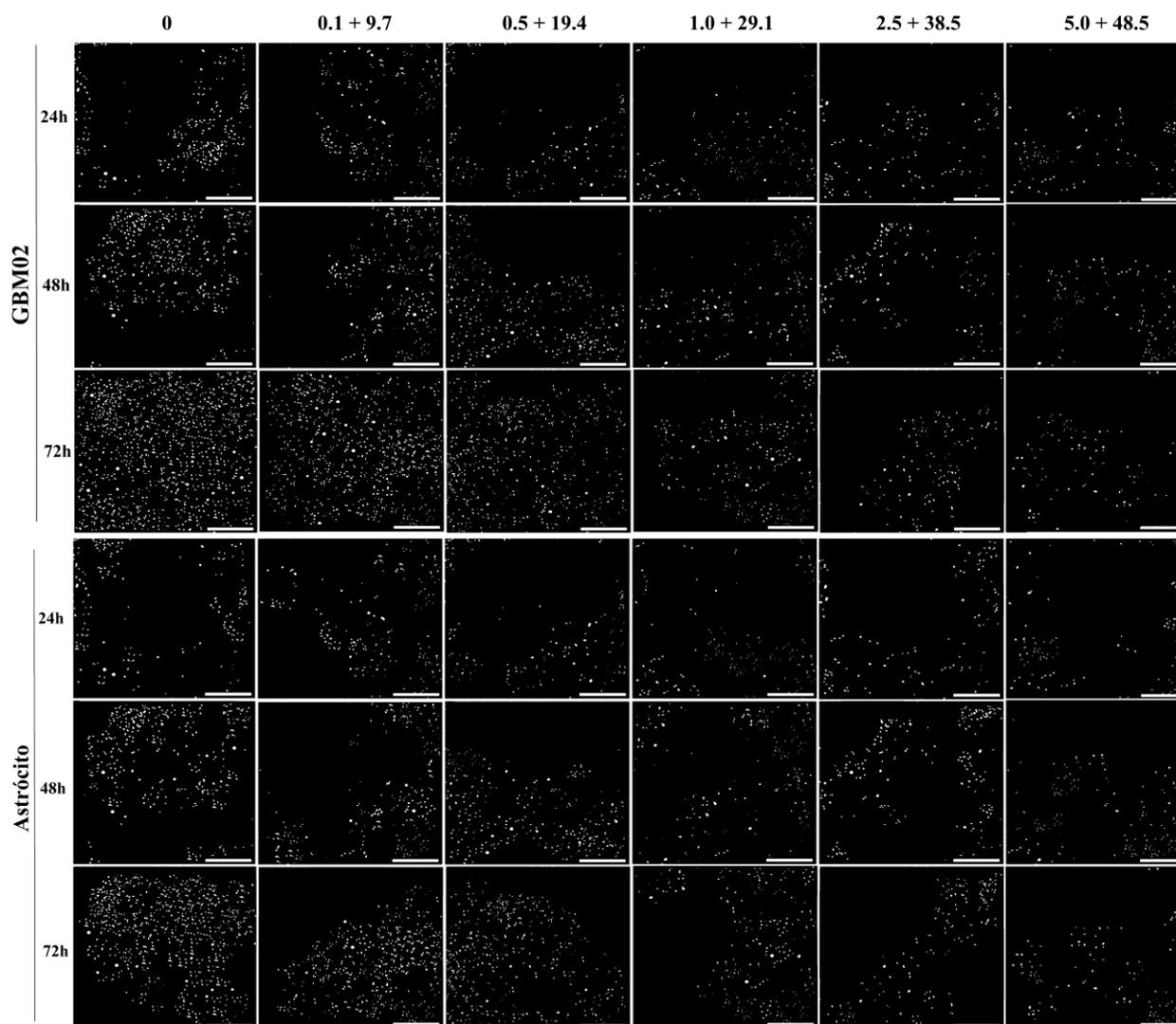
As células (GBM02 e astrócitos humanos) foram separadas em três grupos diferentes (células tratadas com Ag/AgCl-NPs, com TMZ ou com Ag/AgCl-NPs + TMZ) e os dados de cada condição experimental foram expressos como a porcentagem de inibição da proliferação celular em relação ao número de células contadas no dia 0. As imagens representativas dos núcleos corados com Hoechst 33258 (Fig. 15, 16 e 17) mostram a resposta dos dois tipos celulares a cada condição de tratamento.



**Figura 15. Imagens representativas do ensaio antiproliferativo de GBM02 e astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs.** As imagens representam o controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e as diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs ( $0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ao longo de 72 h. Todas as imagens são representativas de um dos seis campos que as imagens foram obtidas para realização dos gráficos. Barra de escala:  $50 \mu\text{m}$ .



**Figura 16. Imagens representativas do ensaio antiproliferativo de GBM02 e astrócitos tratados com TMZ.** As imagens representam o controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e as diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs ( $9,7$ ;  $19,4$ ;  $29,1$ ;  $38,5$ ;  $48,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ao longo de 72 h. Todas as imagens são representativas de um dos seis campos que as imagens foram obtidas para realização dos gráficos. Barra de escala:  $50 \mu\text{m}$ .

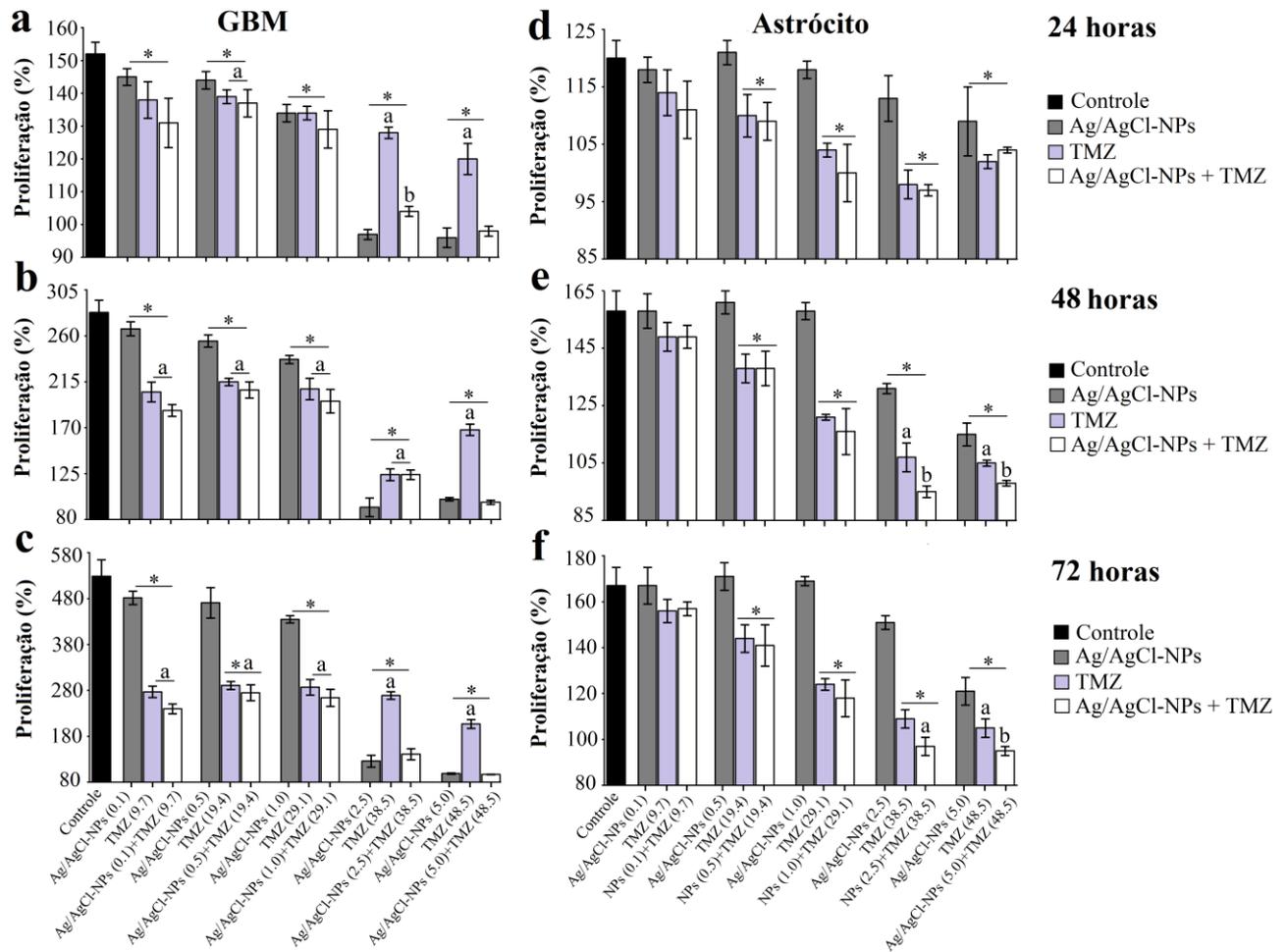


**Figura 17. Imagens representativas do ensaio antiproliferativo de GBM02 e astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs+TMZ.** As imagens representam o controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e as diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs ( $0,1+9,7$ ;  $0,5+19,4$ ;  $1,0+29,1$ ;  $2,5+38,5$ ;  $5,0+48,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ao longo de 72 h. Todas as imagens são representativas de um dos seis campos que as imagens foram obtidas para realização dos gráficos. Barra de escala:  $50 \mu\text{m}$ .

A proliferação de GBM02 foi inibida por Ag/AgCl-NPs e TMZ de maneira tempo e dose dependente, e a inibição da proliferação celular foi consideravelmente menos pronunciada nos astrócitos (Fig. 18, Tabela 7). A inibição da proliferação de GBM02 começou com a concentração de  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs, após 24 h do tratamento (5% de inibição), enquanto que a inibição da proliferação de astrócitos foi perceptível apenas em  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 18, Tabela 7). Nesta concentração, a inibição atingiu 2% em astrócitos. Não observamos inibição do crescimento quando os astrócitos foram incubados na presença de Ag/AgCl-NPs variando de  $0,1$  a  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante 48 h ou 72 h.

Em 24 h, as concentrações mais baixas de TMZ utilizadas aqui (9,7 e 19,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) inibiram a proliferação de GBM02 em ~13 e 10%, respectivamente (Fig. 18a, Tabela 7). Embora a inibição da proliferação celular de GBM02 tenha sido limitada (~5%) nas concentrações mais baixas de Ag/AgCl-NPs (0,1 e 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), essas concentrações tiveram um efeito menor na proliferação dos astrócitos (~2%), enquanto as concentrações mais baixas de TMZ reduziram a proliferação de astrócitos em ~5 e 8% (Fig. 18d, Tabela 7). O mesmo padrão foi observado em 48 e 72 h: TMZ foi mais eficaz do que Ag/AgCl-NPs na inibição da proliferação de células tumorais, mas teve efeitos mais fortes sobre a proliferação de astrócitos do que as Ag/AgCl-NPs (Fig. 18, b, c, e, f). Nas concentrações mais elevadas, a inibição máxima da proliferação celular de GBM02 obtida com monoterapia foram 82 e 62%, após 72 h de exposição a 5,0 e 48,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs e TMZ, respectivamente (Fig. 18c; Tabela 7). Na mesma concentração de Ag/AgCl-NPs, a inibição da proliferação de astrócitos foi de 27% (3 vezes inferior a das células tumorais), enquanto a maior concentração de TMZ inibiu a proliferação de astrócitos em 37%.

O tratamento combinado com Ag/AgCl-NPs e TMZ levou a uma redução tempo e dose dependente na proliferação celular de GBM e astrócitos (Fig. 18, Tabela 7), como ocorreu tanto com células tratadas por Ag/AgCl-NPs quanto com TMZ. Curiosamente, o efeito antiproliferativo de doses mais baixas de Ag/AgCl-NPs e TMZ em células GBM02 foi semelhante ao de TMZ sozinho, enquanto em doses mais elevadas, a combinação teve um efeito semelhante ao de Ag/AgCl-NPs sozinhas (Fig. 18a, b, c; Tabela 7). Em astrócitos, o tratamento com Ag/AgCl-NPs e TMZ inibiu a proliferação celular em níveis semelhantes ao TMZ, independentemente da concentração. Assim, a combinação foi relativamente mais citotóxica para astrócitos do que Ag/AgCl-NPs sozinhas (1,2 a 6 vezes maior inibição de proliferação) (Fig. 1d, e, f, Tabela 7).



**Figura 18. Ensaio antiproliferativo com GBM02 e astrócitos.** Células tumorais e astrócitos humanos foram tratadas com concentrações entre 0,1-5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . (a) GBM02 tratadas com Ag/AgCl-NPs, TMZ e Ag/AgCl-NPs no tempo de 24 h (b) GBM02 tratadas com Ag/AgCl-NPs, TMZ e Ag/AgCl-NPs no tempo de 48 h (c) GBM02 tratadas com Ag/AgCl-NPs, TMZ e Ag/AgCl-NPs no tempo de 72 h (d) astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs, TMZ e Ag/AgCl-NPs no tempo de 24 h (e) astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs, TMZ e Ag/AgCl-NPs no tempo de 48 h (f) astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs, TMZ e Ag/AgCl-NPs no tempo de 72 h. Os grupos seguidos pelas mesmas letras, dentro da mesma concentração de tratamento, não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7** – Percentual médio de inibição em diferentes concentrações de Ag/AgCl-NPs, TMZ e Ag/AgCl-NPs+TMZ usados como tratamento de GBM e astrócitos em diferentes tempos.

Inibição da proliferação celular relativo ao controle (%) em GBM02 / Astrócitos ( $\pm$ DP)			
Tratamento ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	24h	48h	72h
Ag/AgCl-NPs (0,1)	5 ( $\pm$ 4) / 2 ( $\pm$ 4)	12 ( $\pm$ 7) / <u>0,3 (<math>\pm</math>8)</u>	18 ( $\pm$ 8) / <u>0,1 (<math>\pm</math>4)</u>
Ag/AgCl-NPs (0,5)	5 ( $\pm$ 4) / <u>1 (<math>\pm</math>4)</u>	11 ( $\pm$ 6) / <u>2 (<math>\pm</math>7)</u>	14 ( $\pm$ 9) / <u>3 (<math>\pm</math>9)</u>
Ag/AgCl-NPs (1,0)	10 ( $\pm$ 3) / 2 ( $\pm$ 2)	18 ( $\pm$ 6) / <u>0,2 (<math>\pm</math>5)</u>	23 ( $\pm$ 7) / <u>2 (<math>\pm</math>5)</u>
Ag/AgCl-NPs (2,5)	35 ( $\pm$ 1) / 6 ( $\pm$ 4)	65 ( $\pm$ 2) / 17 ( $\pm$ 5)	75 ( $\pm$ 1) / 9 ( $\pm$ 5)
Ag/AgCl-NPs (5,0)	35 ( $\pm$ 3) / 9 ( $\pm$ 5)	65 ( $\pm$ 2) / 27 ( $\pm$ 1)	82 ( $\pm$ 1) / 27 ( $\pm$ 7)
TMZ (9,7)	13 ( $\pm$ 5) / 5 ( $\pm$ 2)	33 ( $\pm$ 7) / 6 ( $\pm$ 6)	53 ( $\pm$ 6) / 6 ( $\pm$ 7)
TMZ (19,4)	10 ( $\pm$ 2) / 8 ( $\pm$ 6)	27 ( $\pm$ 4) / 13 ( $\pm$ 5)	51 ( $\pm$ 5) / 13 ( $\pm$ 7)
TMZ (29,1)	12 ( $\pm$ 1) / 13 ( $\pm$ 3)	32 ( $\pm$ 8) / 24 ( $\pm$ 3)	52 ( $\pm$ 7) / 25 ( $\pm$ 3)
TMZ (38,5)	18 ( $\pm$ 2) / 18 ( $\pm$ 4)	34 ( $\pm$ 6) / 32 ( $\pm$ 7)	54 ( $\pm$ 5) / 34 ( $\pm$ 5)
TMZ (48,5)	19 ( $\pm$ 2) / 15 ( $\pm$ 3)	41 ( $\pm$ 2) / 34 ( $\pm$ 3)	62 ( $\pm$ 2) / 37 ( $\pm$ 5)
Ag/AgCl-NPs (0,1) + TMZ (9,7)	10 ( $\pm$ 3) / 7 ( $\pm$ 7)	34 ( $\pm$ 4) / 6 ( $\pm$ 6)	56 ( $\pm$ 4) / 5 ( $\pm$ 6)
Ag/AgCl-NPs (0,5) + TMZ (19,4)	13 ( $\pm$ 3) / 9 ( $\pm$ 5)	32 ( $\pm$ 7) / 13 ( $\pm$ 8)	54 ( $\pm$ 7) / 15 ( $\pm$ 10)
Ag/AgCl-NPs (1,0) + TMZ (29,1)	17 ( $\pm$ 6) / 18 ( $\pm$ 5)	36 ( $\pm$ 8) / 27 ( $\pm$ 8)	56 ( $\pm$ 7) / 29 ( $\pm$ 8)
Ag/AgCl-NPs (2,5) + TMZ (38,5)	31 ( $\pm$ 2) / 19 ( $\pm$ 3)	56 ( $\pm$ 4) / 40 ( $\pm$ 2)	74 ( $\pm$ 4) / 42 ( $\pm$ 3)
Ag/AgCl-NPs (5,0) + TMZ (48,5)	35 ( $\pm$ 2) / 13 ( $\pm$ 2)	66 ( $\pm$ 2) / 38 ( $\pm$ 3)	83 ( $\pm$ 2) / 43 ( $\pm$ 4)

Os pontos sublinhados na tabela indicam que as células proliferaram em um nível superior ao do controle.

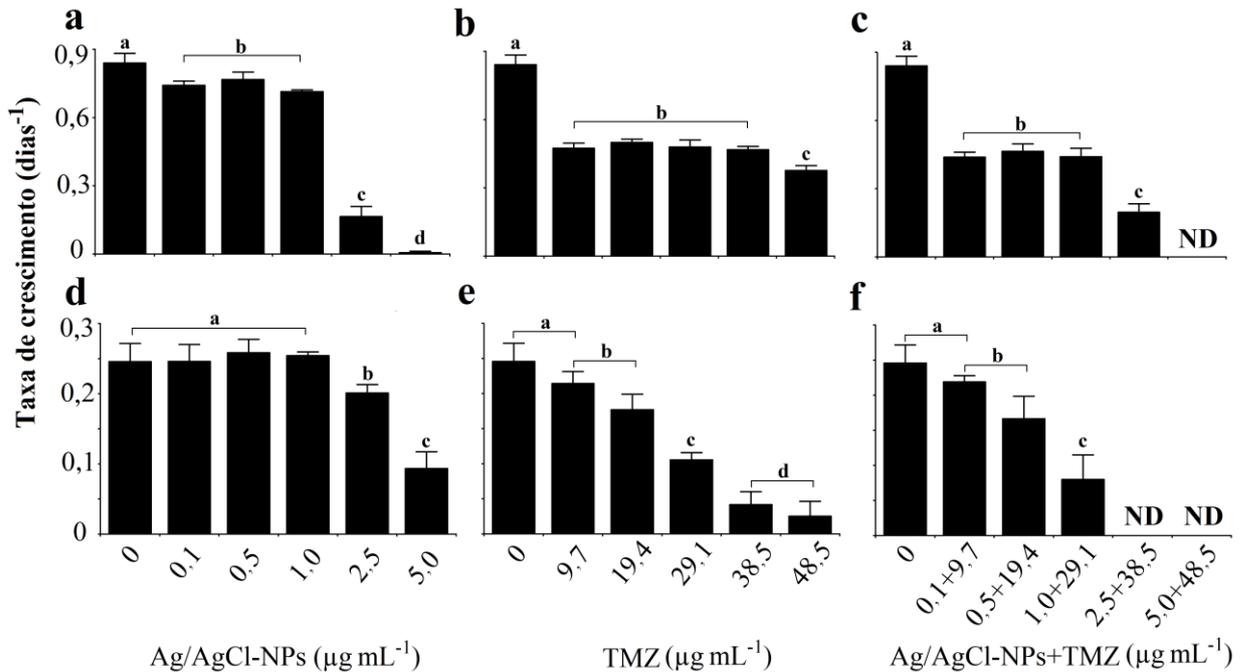
### 5.2.2. Taxa de crescimento e tempo de duplicação da população de GBM02 e astrócitos humanos tratados com Ag/AgCl-NPs e o quimioterápico TMZ

Com objetivo de analisar em mais detalhes os efeitos dos diferentes tratamentos na proliferação celular de GBM02 e astrócitos, foi realizada a quantificação da capacidade proliferativa das células tratadas e não tratadas. Para isso, foram estimadas a taxa de crescimento (Fig. 19) e o tempo de duplicação da população (Tabela 8) (GAVISH *et al.*, 2016; ASSANGA *et al.*, 2013).

A exposição às concentrações mais baixas (0,1 a 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de Ag/AgCl-NP por 72 h levou a uma diminuição limitada (~12%) na taxa de crescimento de GBM02 (em comparação com células não tratadas), enquanto a taxa de crescimento destas células diminuíram acentuadamente, para 80 e 98%, após o tratamento com 2,5 e 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs, respectivamente (Fig. 19a). Em contraste, as concentrações mais baixas de TMZ levaram a uma redução considerável na taxa de crescimento das células GBM02, mas o TMZ em doses mais elevadas foi menos eficaz do que as doses mais elevadas de Ag/AgCl-NPs na redução da taxa de crescimento das células GBM02 (Fig. 19). O tratamento com TMZ levou a uma diminuição dose-dependente na taxa de crescimento de astrócitos, atingindo uma redução da taxa de crescimento de 90%, na maior concentração de TMZ (Fig. 2e). Em contraste, as concentrações de Ag/AgCl-NPs até 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não alteraram a taxa de crescimento de astrócitos, enquanto que 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs apresentaram um efeito modesto (queda de 18%) na taxa de crescimento destas células (Fig. 19d). No entanto, esta taxa de crescimento ainda era ~1,2 vezes maior do que a das células GBM02 tratadas com a mesma concentração de Ag/AgCl-NPs (Fig. 19a), mostrando que maiores concentrações de Ag/AgCl-NPs foram menos citotóxicas para astrócitos do que para as células tumorais. O tratamento com a maior concentração de Ag/AgCl-NPs (5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) diminuiu consideravelmente a taxa de crescimento de astrócitos (62%, Fig. 19d), que ainda foi ~3,7 vezes maior do que a taxa de crescimento de astrócitos tratados com a maior concentração de TMZ (Fig. 19e). As concentrações de TMZ mais altas utilizadas aqui, que estão mais próximas do intervalo utilizado na clínica (BALÇA-SILVA *et al.*, 2014), foram ~4 vezes mais citotóxicas para os astrócitos do que para as células GBM02 (Fig. 19b, e).

O tratamento com uma combinação de Ag/AgCl-NPs e TMZ diminuiu significativamente a taxa de crescimento de células GBM02 (Fig. 19c), quando comparado com células não tratadas. No entanto, a combinação também diminuiu consideravelmente a taxa de crescimento de astrócitos (Fig. 19f). Não foi possível estimar a taxa de crescimento de

GBM02 e astrócitos após o tratamento com a dose mais alta da combinação Ag/AgCl-NPs + TMZ, porque nenhum crescimento foi detectado após 72 h, em comparação com o controle não tratado, evidenciando a agressividade dessas condições de tratamento.



**Figura 19. Taxa de crescimento celular de GBM02 e astrócitos tratados por 72 h com Ag/AgCl-NPs, TMZ ou Ag/AgCl-NPs + TMZ.** (a) GBM02 tratados com Ag/AgCl-NPs. (b) GBM02 tratados com TMZ. (c) GBM02 tratados com Ag/AgCl-NPs + TMZ. (d) Astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs. (e) Astrócitos tratados com TMZ. (f) Astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs + TMZ. Os grupos seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O TDDP de GBM02 tratado com até  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs foi ligeiramente maior (em até 15%) do que a das células não tratadas, enquanto o tratamento com  $2,5$  e  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  aumentou abruptamente (para  $\sim 5$  e  $\sim 130$  vezes, respectivamente) o TDDP das células GBM02 (Tabela 8), indicando claramente que o tratamento com Ag/AgCl-NPs nestas concentrações afeta drasticamente a proliferação celular do glioblastoma. Para os astrócitos, o tratamento com Ag/AgCl-NPs diminuiu cerca de 5% do TDDP em concentrações de até  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e em  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  o TDDP aumentou apenas 20% (em comparação com o aumento de  $\sim 5$  vezes para o GBM02). Na maior concentração de Ag/AgCl-NPs ( $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), o TDDP dos astrócitos aumentou  $\sim 2,7$  vezes em comparação com o controle, porém foi aproximadamente 6 vezes menor que a das células tratadas com TMZ sozinho, com  $48,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Após o tratamento com a combinação de  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs e  $29,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de TMZ, observamos um aumento de  $\sim 3,6$  vezes no TDDP de astrócitos. Não foi possível calcular o TDDP para as doses mais elevadas do tratamento combinado, devido ao efeito drástico dessas condições sobre o crescimento populacional. Esses resultados confirmam que Ag/AgCl-NPs foram menos tóxicas para os astrócitos do que TMZ ou Ag/AgC-NPs + TMZ. O tratamento com TMZ só conseguiu aumentar o TDDP do GBM02 em  $\sim 2,2$  vezes, representando o tratamento menos efetivo. A combinação do tratamento com  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Ag/AgCl-NPs +  $38,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de TMZ aumentou significativamente o TDDP das células do glioblastoma ( $\sim 4,4$  vezes em comparação com o não tratado), mas este efeito ainda era menos pronunciado do que as Ag/AgCl-NPs sozinhas na mesma concentração utilizada na combinação ( $\sim 5,4$  vezes em comparação com células não tratadas).

**Tabela 8** – Tempo de duplicação da população (TDDP) de GBM02 e astrócitos em horas

Tratamento	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	GBM02	Astrócitos
Controle	0	20 ( $\pm 1$ )	68 ( $\pm 7$ )
Ag/AgCl-NPs	0,1	22 ( $\pm 0,5$ )	68 ( $\pm 6$ )
Ag/AgCl-NPs	0,5	22 ( $\pm 1$ )	64 ( $\pm 4$ )
Ag/AgCl-NPs	1,0	23 ( $\pm 0,2$ )	65 ( $\pm 1$ )
Ag/AgCl-NPs	2,5	107 ( $\pm 34$ )	83 ( $\pm 5$ )
Ag/AgCl-NPs	5,0	2514 ( $\pm 1673$ )	188 ( $\pm 56$ )
TMZ	9.7	35 ( $\pm 2$ )	78 ( $\pm 6$ )
TMZ	19.4	33 ( $\pm 1$ )	95 ( $\pm 12$ )
TMZ	29.1	35 ( $\pm 2$ )	159 ( $\pm 15$ )
TMZ	38.5	36 ( $\pm 1$ )	483 ( $\pm 282$ )
TMZ	48.5	44 ( $\pm 3$ )	1119 ( $\pm 938$ )
Ag/AgCl-NPs + TMZ	0.1 + 9.7	38 ( $\pm 2$ )	76 ( $\pm 3$ )
Ag/AgCl-NPs + TMZ	0.5 + 19.4	36 ( $\pm 3$ )	102 ( $\pm 21$ )
Ag/AgCl-NPs + TMZ	1.0 + 29.1	38 ( $\pm 3$ )	245 ( $\pm 130$ )
Ag/AgCl-NPs + TMZ	2.5 + 38.5	86 ( $\pm 15$ )	<b>ND</b>
Ag/AgCl-NPs + TMZ	5.0 + 48.5	<b>ND</b>	<b>ND</b>

O TDDP de alguns tratamentos não pôde ser determinado devido ao número final de células contadas (após 72 h) ter sido igual ou menor que o número inicial de células (em 0 h), sendo representados por ND (não determinado).

### 5.2.3. Análise da eficácia dos tratamentos com Ag/AgCl-NPs e TMZ a partir da determinação do IC<sub>50</sub>

Os dados IC<sub>50</sub> indicam claramente que o tratamento com Ag/AgCl-NPs são eficientes no tratamento contra a linhagem GMB02 (isto é, tem valores IC<sub>50</sub> mais baixos), mas tem um efeito muito menor nos astrócitos humanos, para todos os tempos analisados (Tabela 9).

O IC<sub>50</sub> de GBM02 e astrócitos tratados com Ag/AgCl-NPs foi calculado, respectivamente, como 6,3 e 18,5 µg mL<sup>-1</sup>, em 24 h; de 3,0 e 8,4 µg mL<sup>-1</sup>, em 48 h; e 2,3 e 9,1 µg mL<sup>-1</sup>, em 72 h; mostrando claramente que ao longo do tempo de experimento, o IC<sub>50</sub> sempre foi menor para o GBM02, quando comparado aos astrócitos humanos. É importante ressaltar que em 24 e 48 h, o IC<sub>50</sub> dos astrócitos foi ~3 vezes maior que o do GBM02 e, em 72 h, a diferença aumentou para ~4 vezes, indicando que o tratamento é bem mais agressivo para GBM02 do que para astrócitos, em um processo dependente do tempo.

O IC<sub>50</sub> de GBM02 e astrócitos tratados com TMZ foi calculado, respectivamente, como 198,1 e 152,2 µg mL<sup>-1</sup>, em 24 h; de 98,0 e 65,8 µg mL<sup>-1</sup>, em 48 h; 8,8 e 60,3 µg mL<sup>-1</sup>, em 72 h. Em 24 e 48 h, o tratamento com TMZ foi mais agressivo nos astrócitos, de acordo com o IC<sub>50</sub>, que apresentou valores de ~23 e 34% maiores, respectivamente. Por outro lado, em 72 h, o tratamento foi mais agressivo em células tumorais, pois os valores observados são ~85% menores.

**Tabela 9** – IC<sub>50</sub> (µg mL<sup>-1</sup>) calculado de acordo com cada tratamento em GBM02 e astrócitos.

Tratamento	Tempo (h)	IC <sub>50</sub> GBM02	IC <sub>50</sub> Astrócitos
Ag/AgCl-NPs	24	6,3 (±0,3)	18,5 (±0,7)
Ag/AgCl-NPs	48	3,0 (±0,3)	8,4 (±0,7)
Ag/AgCl-NPs	72	2,3 (±0,3)	9,1 (±1,4)
TMZ	24	198,1 (±5,1)	152,2 (±6,1)
TMZ	48	98,0 (±4,9)	65,8 (±2,6)
TMZ	72	8,8 (0,3)	60,3 (±2,1)

## 6. DISCUSSÃO

NPs à base de prata, principalmente as metálicas de prata (AgNPs) são atualmente utilizadas em diversos produtos de consumo e biomédicos, e outras NPs à base de prata, como a de cloreto de prata (AgCl-NPs) e a de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl-NPs) têm potencial para uso. Mais de um terço dos produtos de consumo que contém nanomateriais contém AgNPs, devido principalmente a sua notável atividade antimicrobiana (VARNER *et al.*, 2010). As preocupações ambientais e econômicas vêm ganhando importância nos últimos anos, portanto, os métodos de síntese verde de NPs têm atraído atenção na pesquisa científica, com o objetivo de substituir os métodos químicos e físicos de produção, que são mais caros (métodos físicos) e prejudiciais para o ambiente (métodos químicos), tornando sua utilização limitada para aplicações biomédicas (NAVEEN *et al.*, 2010). A aplicação de agentes biológicos como fungos filamentosos, bactérias, cianobactérias, microalgas e extratos de plantas (NAVEEN *et al.*, 2010; JAIN & AGGARWAL, 2012; SINGH *et al.*, 2014; JENAA *et al.*, 2013) tem sido relatada como um método ecologicamente amigável ao ambiente para alcançar a produção de AgNPs e Ag/AgCl-NPs. No entanto, poucos trabalhos lidam com a capacidade de leveduras para biossintetizar AgNPs (QUESTER *et al.*, 2013) e menos trabalhos ainda mostram a capacidade de bioprodução de Ag/AgCl-NPs (DÚRAN *et al.*, 2016; EUGENIO *et al.*, 2016). Em comparação com outros agentes biológicos, leveduras têm a grande vantagem de ser facilmente manipuladas em cultura em larga escala para aplicação industrial, como tradicionalmente tem sido mostrado em diferentes setores da indústria (SCHNEITER, 2004). Com base no exposto, a produção de Ag/AgCl-NPs a partir de culturas de leveduras é promissora e precisa ser mais explorada.

O presente estudo investigou a bioprodução (“produção verde”) de Ag/AgCl-NPs pela levedura *C. intermedia*, que foi obtida e isolada a partir do intestino de cupins da espécie *C. cumulans*, de acordo com um recente trabalho publicado por nosso grupo sobre a produção, caracterização e avaliação da atividade antibacteriana de NPs produzidas por *C. lusitaniae* (EUGENIO *et al.*, 2016). Deve-se considerar que o uso biotecnológico de *C. intermedia* é muito pouco explorado e sua utilização promissora não deve ser ignorada no campo da bionanotecnologia. Do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho de bioprodução de qualquer tipo de NPM usando culturas de *C. intermedia*. A levedura *C. intermedia* é uma espécie que faz parte da flora oral do ser humano, habitando a cavidade orofaríngea, e muito raramente tem sido associada à doença humana (MELO *et al.*, 2004). RUAN *et al.* (2010)

fizeram o primeiro relato de caso de infecções da corrente sanguínea humana causada por essa espécie, e a infecção foi facilmente eliminada com administração de fluconazol. Essa espécie é conhecida principalmente pelo seu uso biotecnológico, sendo uma das espécies usadas na fabricação do queijo azul Rokpol (WOJTATOWICZ *et al.*, 2001). Trabalhos recentes mostraram que outras duas espécies de candida (*C. albicans* e *C. utilis*), são capazes de produzir AgNPs (ATEF *et al.*, 2013; WAGHMARE *et al.*, 2015), e apenas uma, *C. lusitaniae*, foi identificada como produtora de Ag/AgCl-NPs (EUGENIO *et al.*, 2016).

A formação de Ag/AgCl-NPs foi sugerida através da análise por UV-Vis, visto que as Ag/AgCl-NPs exibem absorção na região visível do espectro (350-450 nm), com o pico máximo podendo variar conforme o seu tamanho e a sua morfologia (ZHANG & NOGUEZ, 2008). A síntese de Ag/AgCl-NPs sem interferência da atividade biológica das leveduras também foi sugerida no presente trabalho, alteração de cor foi visualizada quando o precursor AgNO<sub>3</sub> foi adicionado ao meio de cultura livre de células, sendo isto um indicativo de que a produção de Ag/AgCl-NPs ocorreu independentemente da presença de leveduras no meio de cultura. No entanto, esta produção não foi confirmada após a leitura do espectro no UV-Vis, pois não houve pico na região característica das NPs à base de prata (SINGH *et al.*, 2014). Segundo VARNER *et al.* (2010), agentes redutores podem ser quaisquer agentes químicos, extratos de plantas, agentes biológicos ou métodos de irradiação que fornecem elétrons livres para reduzir os íons de prata e formar as NPs. Com base nessa descrição, seria possível que os componentes do meio de cultura pudessem induzir a formação de Ag/AgCl-NPs. Entretanto, foi necessário a presença das leveduras em cultura para que ocorresse efetiva produção de NPs.

Dependendo do tamanho e da forma das NPs, a banda de absorção RPSL ocorre numa gama de comprimento de onda específico. Bandas estreitas indicam estreita distribuição de tamanhos e formas de NPs. Por outro lado, as bandas largas indicam distribuição desigual de tamanho e forma de NPs (MBHELE *et al.*, 2003; ZHANG & NOGUEZ, 2008). Assim, o perfil de UV-Vis do espectro pode ser um indicador valioso de uniformidade do tamanho e forma das Ag/AgCl-NPs. O espectro de UV-Vis adquirido a partir do cultivo de *C. intermedia*, com pico máximo em 408 nm, indicou uma distribuição de forma e tamanho desigual das Ag/AgCl-NPs, que foi posteriormente confirmado pelos resultados de MET.

DURÁN *et al.* (2014) utilizaram DRX para caracterizar as Ag/AgCl-NPs em seu estudo de biossíntese pelo fungo *Trametes versicolor*. No presente trabalho, picos semelhantes foram observados em DRX realizada com Ag/AgCl-NPs produzidas pela levedura *C. intermedia*. Na maioria dos trabalhos de síntese de Ag/AgCl-NPs não é bem

discutido se esta técnica é capaz de distinguir dentro de uma população de NPs a formação de AgNPs e AgCl-NPs como populações distintas dentro da mesma amostra, ou se foi formada uma NP híbrida de Ag e AgCl-NPs (GOPINATH *et al.*, 2013; DURÁN *et al.*, 2014; AWWAD *et al.*, 2015). Essa questão não foi investigada neste trabalho. Um estudo em desenvolvimento pelo nosso grupo está focado neste tema através da aplicação de microanálise de raios-X acoplada a um microscópio eletrônico de transmissão de ultra resolução; permitindo que NPs individuais possam ser investigadas quanto à sua composição elementar e perfil cristalográfico (CARTA *et al.*, 2013).

O tamanho das NPs desempenha um papel central na atividade antimicrobiana. Vários estudos têm mostrado que a atividade antibacteriana é um processo dependente do tamanho das NPs. Foi descrito na literatura que, quanto menor o tamanho de uma NP, maior é o seu efeito citotóxico (DURÁN *et al.*, 2010). MORONES *et al.* (2005) mostraram que o efeito citotóxico está relacionado com o tamanho pequeno das NPs (<10 nm) e também com a reatividade das faces das AgNPs. Nesse estudo foi mostrado que as faces [111] são altamente reativas devido à densidade de átomos de prata e, por isso, NPs com mais faces [111] são mais citotóxicas. Imagens de MET das Ag/AgCl-NPs produzidas a partir de culturas de *C. intermedia* demonstraram que estas são, em sua maioria, pequenas (60% do total são menores que 20 nm) e contêm faces [111], como mostrado pelos resultados de DRX. Entretanto, a distribuição desigual de tamanhos (variação de 5-75 nm) pode influenciar negativamente no seu efeito biocida, contudo, esta variação de tamanho é comumente observada nas NPs produzidas biologicamente (DURÁN *et al.*, 2016).

Íons  $\text{Ag}^+$  e outros compostos à base de prata têm sido usados há muito tempo como agentes antimicrobianos, porque eles possuem um forte efeito inibitório contra uma vasta gama de microrganismos (VARNER, 2010; GALDIERO *et al.*, 2011; JAIN & AGGARWAL, 2012). As pesquisas de avaliação do efeito antimicrobiano com todos os tipos de nanomateriais de prata sintetizadas biologicamente têm crescido bastante nos últimos anos, mas ainda são poucos, quando comparados aos estudos com os não biológicos (SINGH, 2014). O rápido desenvolvimento de bactérias multirresistentes, devido ao uso indiscriminado dos antibióticos, torna emergencial o desenvolvimento de novas alternativas de terapias contra esse tipo de bactéria.

*Salmonella enterica serovar Typhi* (*S. typhi*) é o agente etiológico da febre tifóide, uma doença bacteriana invasiva grave de seres humanos, com uma carga global anual de aproximadamente 16 milhões de casos, levando a 600.000 mortes. Muitos sorotipos de *S. entérica* invadem ativamente a superfície da mucosa do intestino, mas são normalmente

contidas em indivíduos saudáveis pelos mecanismos de defesa imune locais. No entanto, *S. typhi* evoluiu e desenvolveu a capacidade de se espalhar para os tecidos mais profundos dos seres humanos, incluindo fígado, baço e medula óssea (PARKHILL *et al.*, 2001). Nestes casos, a doença pode causar a morte, a menos que a pessoa seja rapidamente tratada com antibióticos (CDC, 2014). *Streptococcus pyogenes* é um patógeno humano restrito, nenhum outro reservatório ou espécie conhecida é afetada pelas doenças causadas por este microrganismo. Este patógeno é responsável por uma grande variedade de doenças, incluindo faringite (dores de garganta), escarlatina, impetigo, erisipela, celulite, septicemia, síndrome do choque tóxico, fascíte necrotizante (conhecida popularmente como "doença devoradora de carne") e, suas infecções podem causar sequelas, como febre reumática e glomerulonefrite aguda (FERRETI *et al.*, 2001).

O ensaio antiproliferativo em culturas de *S. typhi* mostrou que a estreptomicina foi o tratamento mais eficiente, seguido das Ag/AgCl-NPs e penicilina. É importante ressaltar que a penicilina é mais efetiva em bactérias gram-positivas, devido ao seu mecanismo de ação baseado na interação com as PLPs (proteínas ligadoras de penicilina), com consequente inibição das transpeptidases, interrompendo a síntese da parede celular (WAXMAN & STROMINGER, 1983). As bactérias gram-negativas, devido a diferente estrutura da sua parede celular, dificulta a chegada da penicilina ao seu alvo, por isso a penicilina foi muito pouco efetiva durante o tratamento contra *S. typhi* (MORONES *et al.*, 2005), ainda assim, em concentrações de até  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  ela foi tão ineficiente quanto as Ag/AgCl-NPs.

Já para as bactérias da espécie *S. pyogenes*, foi observado que ambos antibióticos foram igualmente efetivos desde as menores concentrações. Era esperado que a penicilina aumentasse sua eficácia contra essa bactéria, por ser uma bactéria gram-positiva, facilitando seu mecanismo de ação (WAXMAN & STROMINGER, 1983). O mecanismo de ação da estreptomicina é baseado em se associar irreversivelmente à uma ou mais proteínas da subunidade 30 S dos ribossomos bacterianos e interferir na maneira como o RNA mensageiro e a subunidade 30 S se ligam para traduzir proteínas, interferindo assim na síntese proteica (LUZZATTO *et al.*, 1968). Esse mecanismo de ação faz com que esse antibiótico tenha efeito tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, como observado em nossos resultados.

Durante o primeiro ensaio com culturas de *S. pyogenes* e *S. typhi*, a exposição à Ag/AgCl-NPs levou, curiosamente, ao estímulo do crescimento nas concentrações inferiores a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . XIU *et al.* (2012) observaram resultados semelhantes em seus estudos de atividades de AgNPs em culturas de *E. coli*. Os autores discutiram que a exposição a baixas

doses pode ativar mecanismos de reparo das células contra as NPs, e este processo de reparo pode compensar a exposição, levando ao estímulo da proliferação dos microrganismos.

O comportamento das culturas após interrupção dos tratamentos por 24 h foi investigado. Observou-se que as culturas de *S. typhi* previamente tratadas com Ag/AgCl-NPs, após 24 h de tratamento, se recuperou nas concentrações inferiores a  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e chegaram a níveis bem próximos de densidade celular do controle em  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , tendendo claramente ao reestabelecimento, apesar de terem apresentado níveis de inibição de ~50% ao final do primeiro ciclo de tratamento. As culturas tratadas no primeiro ensaio com penicilina, foram capazes de se recuperar após 24 h (até  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), embora já tivesse apresentado níveis de densidade celular iguais ao controle até  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Além disso, as culturas se mostraram mais propensas a se recuperar após tratamento com penicilina, já que apresentaram densidade celular maior que as tratadas com Ag/AgCl-NPs.

As culturas de *S. pyogenes*, ao final de 24 h, conseguiram reverter totalmente o efeito das Ag/AgCl-NPs, atingindo níveis de densidade celular semelhantes ao controle nas concentrações até  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , indicando que as bactérias que resistiram à primeira rodada de tratamento foram capazes de se proliferar, com uma taxa de crescimento maior que o controle, após a interrupção do tratamento, principalmente em  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que havia apresentado níveis de densidade celular ~68% menores que o controle. Além disso, dependendo da bactéria e da concentração de NPs usadas no tratamento (em geral baixas doses), as NPs podem ter o efeito inesperado de indução da proliferação, ao invés da morte, como discutido por XIU *et al.* (2012), e observado em nossos resultados. Este efeito pode ser especialmente perigoso no caso de administração em seres humanos.

Curiosamente, as culturas tratadas com penicilina se mantiveram inibidas até 6 h pós tratamento, contudo, em 24 h as bactérias apresentaram alta taxa de crescimento, chegando a níveis de densidade celular próximas ao controle até  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , indicando reversibilidade do efeito deste antibiótico, e uma tendência de reversão até  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As culturas de ambas bactérias tratadas com estreptomicina não apresentaram reversibilidade do efeito, indicando que este antibiótico foi o mais eficaz dentre os 3 compostos aqui testados para o tratamento dessas bactérias.

O segundo ciclo de tratamentos com Ag/AgCl-NPs aumentou a sensibilidade das bactérias *S. pyogenes*, visto que o segundo ciclo levou a uma inibição muito menor em todas as concentrações usadas, além de apresentar um  $\text{IC}_{50}$  bem menor. O senso comum da literatura aponta que a resistência microbiana à prata elementar é algo extremamente raro, pela presença de múltiplos mecanismos microbicidas que atuam em sinergia (SILVER, 2003;

FRANCI *et al.*, 2015). Com base nesses múltiplos mecanismos de ação, podemos hipotetizar que este foi o motivo do segundo ciclo de tratamento melhorar a eficácia em *S. pyogenes*. No entanto, é surpreendente que tenha sido observado este fenômeno apenas após dois ciclos de tratamento. Além disso, em algumas concentrações o tratamento em *S. typhi* também foi superior no segundo ciclo de tratamento (10, 25, 125 e 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), nas demais não houve diferenças. O  $\text{IC}_{50}$  diminuiu ligeiramente após o segundo ciclo de tratamento, reforçando a teoria de que a resistência à prata é bastante incomum. Portanto, através do  $\text{IC}_{50}$ , podemos concluir que os antibióticos, em apenas um ciclo extra de tratamento, selecionou bactérias resistentes e tiveram piora significativa da sua eficácia, o que não foi observado após o segundo tratamento com Ag/AgCl-NPs, que teve seu efeito aumentado.

Ao contrário do que é relatado para o tratamento com NPs à base de prata, é mais comum observar eventos de resistência a penicilina e estreptomicina (FRIDKIN, 2001; THORNSBERRY *et al.*, 2008; LANDMAN & QUALE, 1997; ARIAS *et al.*, 2010; MESAROS *et al.*, 2007; UÇKAY *et al.*, 2011), como confirmado nos resultados do segundo ciclo de tratamento em ambas bactérias, porém, sendo mais marcante para as culturas de *S. pyogenes*, que piorou em eficácia em todas as concentrações inferiores a 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os principais mecanismos de resistência a estes antibióticos são a produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas que degradam a penicilina impedindo sua ação (HACKER *et al.*, 2009) e, para estreptomicina através de mutações no gene *rrs*, que codifica o 16S RNA ribossomal, e no gene *rpsL*, que codifica o gene da proteína ribossomal S12 (SPRINGER *et al.*, 2001).

Estudos avaliando o potencial antifúngico de NPs à base de prata são muito escassos, em comparação aos estudos antibacterianos. O número de publicações é cerca de 90% menor (RAI *et al.*, 2014), a despeito dos impactos negativos causados pelas infecções fúngicas, em especial as causadas por *Candida* spp. (PFALLER & DIEKEMA, 2012). Em algumas partes do mundo, em especial países subdesenvolvidos, a candidemia é a causa mais comum de todas as infecções da corrente sanguínea relacionadas com cateteres vasculares. Nesses locais, tem sido observado aumento da mortalidade devido a aplicação inadequada da terapia, que aumenta a incidência de resistência aos antifúngicos mais usados (OMS, 2014).

Nossos estudos antiproliferativos usando Ag/AgCl-NPs e anfotericina B revelaram que ambas leveduras podem ser sensíveis aos tratamentos, dependendo da concentração, para o caso das Ag/AgCl-NPs, já que a anfotericina B teve efeito em todas as concentrações testadas. O mecanismo de ação da anfotericina B é baseado na ligação da molécula ao ergosterol, o esterol primário na membrana celular fúngica. Como consequência dessa ligação pode ocorrer interrupção da integridade osmótica da membrana, com extravasamento

intracelular, podendo estar relacionado com a alta eficácia do fármaco, como mostrado nos resultados. Além disso, a anfotericina B tem um amplo espectro de ação, sendo usado com êxito contra candidíases, criptococoses, histoplasmoses, blastomicoses, paracoccidiodomicoses, coccidiodomicoses, aspergiloses, esporotricoses, mucomicose extracutânea, hialohifomicoses e feneofomicoses (ELLIS, 2002).

As Ag/AgCl-NPs apresentaram efeito significativo, comparável aos fármacos de uso (anfotericina B, penicilina e estreptomicina), apenas em algumas condições, geralmente em concentrações mais elevadas ( $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  para leveduras e  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  para bactérias). Uma possível explicação para esse resultado é de que as Ag/AgCl-NPs apresentaram alto grau de agregação, como pode ser observado nas imagens de MET. O estado de agregação está diretamente relacionado com a reatividade das NPs, devido à razão área de superfície/volume, que conseqüentemente irá diminuir seu efeito antimicrobiano (ALBERNAZ, 2014; DURÁN *et al.*, 2010; MORONES *et al.*, 2005). Essa hipótese ganha mais força ao analisar os resultados de PANÁCEK *et al.* (2009), em que os autores observaram uma melhora de 2 até 8 vezes no efeito antiproliferativo contra *C. albicans*, após estabilizar suas AgNPs com diferentes agentes.

Existem diferentes formas de estabilizar NPs em solução coloidal, mas todas elas dependem da presença de um agente estabilizador. Os agentes estabilizadores previnem a agregação indesejada das NPs e a estabilização se dá através de moléculas que se adsorvem sobre a superfície das NPs, formando uma camada auto-organizada que impede a coalescência. A estabilização pode ser estérica, eletrostática ou ambas (OLENIN *et al.*, 2008; MELO JR. *et al.*, 2012). O agente estabilizador deve ser facilmente disperso no solvente desejado e ter alta afinidade pela superfície da NP, como polímeros com grupos com alta densidade eletrônica como tiol (-SH), amino (-NH<sub>2</sub>), hidroxil (-OH) e carboxil (-COOH) formando uma camada protetora (estabilização estérica). Alguns estabilizantes estéricos são os polímeros poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(álcool vinílico) (PVA) e ácido poliacrílico (PAA). A estabilização pode ser também eletrostática, através da distribuição de íons sobre a superfície da NP, gerando repulsão entre elas e dificultando a agregação, como ocorre com o boroidreto de sódio e o citrato de sódio, onde a estabilização ocorre pela adsorção dos íons boroidreto e citrato, respectivamente (MELO JR. *et al.*, 2012; PIRES, 2013). Em nosso estudo, usamos citrato de sódio para estabilização das Ag/AgCl-NPs, no entanto, elas se apresentaram aglomeradas, como observo por MET. Vários trabalhos reportam sucesso na estabilização de AgNPs usando citrato de sódio (PARK *et al.*, 2013; ZEWDE *et al.*, 2016), portanto, é necessário encontrar a relação citrato/NPs/volume de solução que permita a

estabilização nas Ag/AgCl-NPs produzidas neste estudo. Além disso, o uso de albumina do soro bovino pode ser feito como alternativa de estabilizante estérico para obter boa estabilidade das NPs em solução, como demonstrado por outros trabalhos (ANANTH *et al.*, 2011; MARTIN *et al.*, 2014).

Comparando nossos dados com outros resultados da literatura, podemos observar que efeitos antiproliferativos podem ser observados em variadas concentrações, desde 0,21 até 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , confirmando que é possível obter melhores resultados usando AgNPs estáveis (MONTEIRO *et al.*, 2011; VAZQUEZ-MUÑOS *et al.*, 2014; PANÁCEK *et al.*, 2009). Foi observado também estímulo da proliferação no tratamento com 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em *C. lusitaniae*. Como discutido anteriormente, isso pode ser devido à ativação de um processo de reparo que pode compensar a exposição à baixas doses de Ag/AgCl-NPs, levando ao estímulo da proliferação, como observado em nossos resultados de bactérias e por XIU *et al.* (2012) em *E. coli*.

Estímulo da proliferação celular gerado por NPs tem sido observado também em diferentes tipos de células de mamíferos tratadas com NPMs ou NPs não-metálicas. UNFRIED *et al.* (2008) trataram células epiteliais pulmonares de humanos e de ratos com NPs de carbono. Os autores observaram que a proliferação induzida pelas NPs é mediada por cascatas de sinalização dependentes de fosfatidilinositol-3-quinase e proteína quinase B. HUSSIEN *et al.* (2013) observou a indução da proliferação de células epiteliais de mama humanas após tratamento com diferentes concentrações (3 até 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de NPs poliméricas comerciais. SODERSTJERNA *et al.* (2013) investigaram o efeito de AgNPs, AuNPs e  $\text{AgNO}_3$  sobre a proliferação de células precursoras neurais embrionárias. Os autores observaram o aumento significativo da proliferação celular durante o tratamento com as NPs, enquanto observaram uma diminuição significativa após tratamento com  $\text{AgNO}_3$ . Contudo, a revelação de que culturas bacterianas e fúngicas tratadas com baixas doses de Ag/AgCl-NPs também podem estimular a proliferação celular, abre uma grande discussão acerca do tratamento de seres humanos com essas NPs, visto que a possibilidade de que baixas concentrações cheguem aos patógenos, poderá levar o paciente à uma piora no quadro infeccioso, podendo ter sérias consequências. Sendo necessário a realização de mais investigação a respeito desse tema.

O comportamento das leveduras após lavagem das culturas em meio puro foi investigado. Observou-se que as culturas de *C. albicans* previamente tratadas com Ag/AgCl-NPs, 72 h após o tratamento, se recuperaram nas concentrações inferiores a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mas é importante ressaltar que até 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , durante o tratamento, os níveis de densidade

celular já estavam próximos ao controle. Já após a retirada do tratamento com anfotericina B, as culturas não foram capazes de se reestabelecer, obtendo apenas um pequeno aumento no nível de densidade celular até  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

As culturas de *C. lusitaniae* se reestabeleceram com tratamentos prévios de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  (enquanto *C. albicans* reestabeleceram com  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sugerindo que em baixas concentrações elas são menos sensíveis, no entanto, não foi observado aumento nenhum da densidade celular nas duas maiores concentrações, enquanto *C. albicans* houve aumento da proliferação, apesar de menor que o controle, sugerindo que nas concentrações mais altas *C. lusitaniae* foi mais sensível que *C. albicans*. *C. lusitaniae* se mostrou menos sensível ao tratamento com anfotericina B, visto que foi observado um grande aumento da proliferação celular em culturas previamente tratadas com concentrações até  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ , chegando a níveis de densidade celular muito próximos ao controle, que não foi observado para *C. albicans*.

O segundo ciclo de tratamentos com Ag/AgCl-NPs aumentou a sensibilidade de ambas as leveduras nas maiores concentrações (acima de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e apresentou um  $\text{IC}_{50}$  bem menor. Esses resultados são bem semelhantes ao que foi observado no tratamento com bactérias neste trabalho, e vai de encontro ao que é demonstrado na literatura a respeito da resistência ao tratamento com prata, algo poucas vezes relatado (SILVER, 2003; FRANCI *et al.*, 2015). Por outro lado, foi observado uma grande diminuição da sensibilidade de *C. lusitaniae* após dois ciclos de tratamento com anfotericina B. Portanto, através do  $\text{IC}_{50}$ , podemos concluir que a anfotericina B, em apenas um ciclo extra de tratamento, selecionou leveduras resistentes da espécie *C. lusitaniae* e teve piora significativa da sua eficácia, o que não foi observado após o segundo tratamento com *C. albicans* e para o tratamento com Ag/AgCl-NPs nas duas espécies.

Segundo a OMS (2014), *C. lusitaniae* é uma das espécies fúngicas que pode apresentar resistência a esse tratamento na clínica. PAPPAGIANIS *et al.* (1979), mostraram que uma cepa, após 20 dias, requeria uma dose mais de 320 vezes maior de anfotericina B para ser inibida *in vitro*. Desde este estudo de 1979, vários estudos têm demonstrado sistematicamente a rápida aquisição de resistência dessa espécie ao tratamento com anfotericina B (GUINET *et al.*, 1983; FAVEL *et al.*, 1997; PEYRON *et al.*, 2001; YOUNG *et al.*, 2003; PAPPAS *et al.*, 2004). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência à anfotericina B por *C. lusitaniae* são mutações e/ou alterações na expressão gênica dos genes ERG3 e ERG6, que estão relacionados com a via biossintética do ergosterol, molécula alvo do fármaco (YOUNG *et al.*, 2003).

Visando tirar o máximo proveito das propriedades das NPs à base de prata, vários grupos estão trabalhando para encontrar formas de alterar propriedades físico-químicas, como estabilidade, formato, tamanho, dentre outros. A principal estratégia abordada para NPs de origem biológica é a alteração das condições de cultivo, como temperatura, pH, concentração do precursor, quantidade de biomassa, etc. (WANG, 2012). JENAA *et al.* (2012) modularam condições de síntese para obter AgNPs com variação máxima de 14 nm, algo raro em NPs de origem biológica, que em geral possuem larga distribuição de tamanhos (TRAN *et al.*, 2013). KULKARNI & BHANAGE (2014) variaram a concentração do agente redutor (cana-de-açúcar), tempo e temperatura de reação para controlar o tamanho e a morfologia de Ag/AgCl-NPs. Com o objetivo de obter AgNPs monodispersas, com tamanho e morfologia ajustáveis, NDIKAU *et al.* (2017) controlaram e otimizaram vários parâmetros de reação para conseguir NPs produzidas a partir do extrato de casca de melancia melhores. Foram alteradas a temperatura de reação, o pH da solução reacional, a concentração e a proporção dos reagentes. HUSSEINY *et al.* (2015) realizaram biossíntese com o fungo *Fusarium oxysporum* modificando parâmetros de cultivo e conseguiram controlar o tamanho das AgNPs. As AgNPs produzidas apresentaram efeito antibacteriano e antitumoral. Baseado nisso, futuramente as condições de produção das Ag/AgCl-NPs produzidas neste trabalho serão otimizadas, para obter NPs com propriedades melhores.

Recentemente, tem sido mostrado que AgNPs fornecem uma abordagem única para o tratamento de tumores, especialmente os de origem neuroepitelial, sendo o GBM o mais maligno das neoplasias neuroepiteliais, o uso de AgNPs contra GBM torna-se bastante atraente (URBANSKA *et al.*, 2015). Ensaio utilizando AgNPs contra GBM em diferentes modelos têm sido relatados na literatura, com relativo sucesso. Por exemplo, AgNPs quimicamente sintetizadas ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) tiveram efeito antiproliferativo contra a linhagem celular GBM comercial U87, levando a uma diminuição de 35% na taxa de crescimento, quando comparada às células não tratadas ou tratadas com placebo (URBANSKA *et al.*, 2015). Quando conjugados com outros agentes citotóxicos, as AgNPs também foram eficazes contra GBM (ASHARANI *et al.*, 2009). AgNPs impregnadas com uma mistura de alginato-quitosana (produzido por um método "verde") tiveram um potente efeito antiproliferativo contra a linhagem celular GBM U87MG ( $\text{IC}_{50} = 2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), levando a danos extensos ao DNA, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial (com perda do potencial da membrana mitocondrial) e apoptose (SHARMA *et al.*, 2014). AgNPs lipofílicas (presas em NPs poliméricas à base de PEG) conjugadas com o peptídeo clorotoxina também tiveram um efeito citotóxico significativo contra células U87MG *in vitro* ( $\text{IC}_{50} = 45 \mu\text{M}$ ) (LOCATELLI *et*

*al.*, 2012). Nanocompositos poliméricos de AgNPs e o fármaco citotóxico alisertib reduziram o crescimento do tumor GBM *in vivo* (LOCATELLI *et al.*, 2014). Do nosso conhecimento, o uso de Ag/AgCl-NPs para o tratamento de GBM nunca foi relatada na literatura. Além disso, a utilização de HCA para avaliar o efeito antiproliferativo de células tumorais expostas à NPs tem sido pouco explorado.

Resumidamente, a técnica de HCA é uma plataforma de aquisição e análise automatizada de imagens. São amplamente aplicadas em triagem fenotípica, fornecendo identificação de alterações morfológicas complexas em células individuais, em resposta a um tratamento específico ou alterações em condições de cultura (SHARIFF *et al.*, 2010). HCA é utilizada com bastante êxito no campo da descoberta de drogas (YOUNG *et al.*, 2008) e toxicologia (RAMERY & O'BRIEN, 2014), devido a sua capacidade de analisar amostras numerosas, em nível celular, em um mesmo experimento. Recentemente, HCA também tem sido sugerida como uma poderosa ferramenta para avaliar o potencial de toxicidade dos nanomateriais, em especial NPMs (ANGUISSOLA *et al.*, 2014). Neste estudo, utilizou-se HCA para monitorar de forma automática, rápida e precisa o efeito de Ag/AgCl-NPs sobre a proliferação celular, com o intuito de facilitar a análise e minimizar a possibilidade de uma análise tendenciosa do operador, visto que a HCA é considerada uma metodologia imparcial (ZANELLA *et al.*, 2010).

O GBM é o tipo de tumor cerebral mais maligno e o prognóstico do paciente não melhorou apesar dos esforços de pesquisadores de campos amplamente diferentes (LOUIS *et al.*, 2007; GOLDLUST *et al.*, 2008; STUPP *et al.*, 2009). Nas duas últimas décadas, o tratamento de GBM com quimioterapia sofreu algumas mudanças, como a substituição do uso de algumas substâncias alquilantes, como carmustina, nimustina e lomustina por TMZ. Isso ilustra claramente a necessidade de adaptações no tratamento desta doença (BEIER *et al.*, 2011). A possível causa da quimiorresistência do GBM é a presença de células-tronco neoplásicas. Eles são células tumorais com propriedades semelhantes a células-tronco que residem no GBM e podem facilmente gerar células tumorais semelhantes às progenitoras e proliferar em meio a sinais de microambiente (MOROKOFF *et al.*, 2015). As células-tronco neoplásicas podem ser mais resistentes e sobreviver à terapias oncológicas intensivas, levando à recorrência do tumor (MODREK *et al.*, 2014). Como o GBM é um tumor agressivo, é urgente o desenvolvimento de terapias alternativas que visem as células-tronco neoplásicas.

Nossos resultados usando uma faixa de concentração consideravelmente inferior ao utilizado em outros estudos (de 25 a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; ASHARANI *et al.*, 2009; URBANSKA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2014) mostraram que Ag/AgCl-NPs provocam efeitos altamente

deletérios sobre a taxa de crescimento das células GBM (83% de inibição em  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Também mostramos que as NPs sintetizadas pelo nosso grupo foram mais eficazes em inibir a proliferação de células tumorais do que o TMZ, a droga quimioterapêutica padrão de escolha para o tratamento de GBM, tendo pouco impacto na proliferação de astrócitos. ASHARANI *et al.* (2009) mostraram que as AgNPs revestidas com amido geraram efeitos citotóxicos - incluindo danos mitocondriais e ao DNA, aumento da produção de ROS e parada do ciclo celular - em células de glioblastoma humano (U251). No entanto, esses efeitos citotóxicos foram observados na presença de AgNPs em concentrações muito maiores ( $25 - 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) do que as concentrações de Ag/AgCl-NP usadas aqui. Além disso, os autores observaram efeitos semelhantes em fibroblastos pulmonares humanos normais (IMR-90), mas, curiosamente, no experimento de recuperação de culturas após tratamentos por 48 h, houve recuperação eficiente em fibroblastos humanos normais, enquanto as células tumorais pararam de proliferar. Estes dados suportam os resultados observados em nosso estudo, em que células não tumorais (astrócitos) foram menos afetadas pelas NPs do que as células tumorais.

Com base em dados de estudos anteriores sobre o uso de AgNPs, acreditamos que o efeito antiproliferativo dos Ag/AgCl-NPs em GBM02 pode ser atribuído à interação físico-química da prata com grupos funcionais de proteínas intracelulares, bem como com bases nitrogenadas e grupos fosfato do DNA (RUTBERG *et al.*, 2008). Ag/AgCl-NPs também podem se acumular no núcleo, causando instabilidade cromossômica e perturbando a mitose. Também é possível que Ag/AgCl-NPs interajam com os microfilamentos de actina, causando danos estruturais e funcionais aos elementos do citoesqueleto (URBANSKA *et al.*, 2015). Além disso, a superfície ativa das AgNPs pode induzir diretamente a geração de radicais livres e a dissolução de AgNPs em íons  $\text{Ag}^+$ , que é uma característica compartilhada por NPs à base de prata, incluindo Ag/AgCl-NPs (KANG *et al.*, 2016). Isso causa danos ao DNA e perturbação do potencial da membrana mitocondrial, liberando citocromo c e levando à apoptose dependente de mitocôndria (HSIN *et al.*, 2008; PIAO *et al.*, 2011). Estas são hipóteses interessantes que devem ser investigadas em estudos futuros sobre o mecanismo de inibição das Ag/AgCl-NPs sobre a proliferação celular do GBM.

MAC EWAN *et al.* (2010) relatou que as NPs poderiam responder ao baixo pH extracelular do microambiente tumoral. A partir desta descoberta, URBANSKA *et al.* (2015) hipotetizaram que a liberação de íons de prata de AgNPs seria maior nas células tumorais em comparação com células normais. Isso explicaria o efeito antiproliferativo diferencial observado para células tumorais *versus* células saudáveis (astrócitos), conforme descrito por

outros (ASHARANI *et al.*, 2009). Por outro lado, nossos dados mostraram que o TMZ foi mais agressivo para astrócitos do que para células de GBM. O motivo para isso continua para ser encontrado, no entanto, a ação de TMZ envolve danos ao DNA por meio da metilação da posição O6 de guaninas, bloqueando a replicação do DNA e induzindo a morte de células ou a interrupção do ciclo celular, em um processo que é semelhante em células tumorais e células não tumorais (GLASER *et al.*, 2017).

As vantagens de combinar Ag/AgCl-NPs e TMZ seriam um possível aumento na eficácia do tratamento e uma diminuição na dose de fármaco, conforme demonstrado anteriormente (NAQVI *et al.*, 2013; MUÑOZ *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015). LIANG *et al.* (2017) mostraram que as AgNPs combinadas com TMZ aumentaram a sensibilidade das células de glioma humano (U251) ao TMZ, com citotoxicidade dose-dependente. Em contraste, mostramos aqui que o tratamento de células GBM02 com uma combinação de Ag/AgCl-NPs e TMZ não foi claramente mais eficaz do que o tratamento com Ag/AgCl-NPs somente. Além disso, nossos dados mostraram que tanto a monoterapia com TMZ quanto o tratamento combinado com Ag/AgCl-NPs e TMZ foram significativamente mais agressivos em relação aos astrócitos do que Ag/AgCl-NPs sozinhas.

Os resultados aqui apresentados demonstraram que as Ag/AgCl-NPs são promissoras como agentes antimicrobianos e antitumorais. É importante enfatizar que um maior espectro de microrganismos e tumores podem ser sensíveis ao tratamento com estas Ag/AgCl-NPs, portanto outros tipos celulares devem ser testados. Além disso, devem ser realizados um conjunto adicional de testes de susceptibilidade a antimicrobianos, incluindo concentrações inibitórias mínimas (MICs), concentrações bactericidas mínimas (MBCs) e concentrações fungicidas mínimas (MFCs), seguindo as orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para melhor avaliar o desempenho antibacteriano e antifúngico de AgCl-NPs. Ensaio adicionais com as células tumorais e astrócitos são necessários para determinar se o efeito das Ag/AgCl-NPs é citostático, citotóxico ou ambos, além de investigar melhor os efeitos de indução da proliferação observados em bactérias e leveduras. Análises morfológicas ajudarão a compreender possíveis mudanças estruturais que levaram ao aumento da eficácia dos tratamentos e ao estímulo da proliferação em baixas concentrações nos ensaios com Ag/AgCl-NPs observado nos microrganismos, assim como, verificar estruturas alvo das NPs dentro das células. Análises ultraestruturais também podem ajudar a entender os motivos pelos quais as Ag/AgCl-NPs são mais efetivas em células tumorais do que astrócitos, bem como investigar quais estruturas são modificadas e qual a localização das Ag/AgCl-NPs após o tratamento.

## 7. CONCLUSÕES

- Leveduras da espécie *C. intermedia* foram capazes de produzir Ag/AgCl-NPs em cultura, na presença de AgNO<sub>3</sub>. As Ag/AgCl-NPs apresentaram faixas de tamanho e faces reativas que favorecem seu potencial microbicida, no entanto, o estado de aglomeração pode comprometer sua eficácia.
- As Ag/AgCl-NPs produzidas foram mais eficientes que a penicilina e menos que a estreptomicina para o tratamento contra *S. typhi*, e menos eficientes que ambos os antibióticos para *S. pyogenes*, nas condições testadas neste trabalho. As maiores concentrações de Ag/AgCl-NPs também não permitiram aumento da densidade celular das bactérias, após retirada do tratamento por 24 h, indicando que estas concentrações inviabilizam a cultura. Após o segundo ciclo de tratamento, ficou claro que os tratamentos com antibióticos têm uma maior tendência a selecionar bactérias resistentes, enquanto as Ag/AgCl-NPs, devido aos múltiplos alvos potenciais na célula, tendem a aumentar a eficácia ao longo do tempo.
- O tratamento com Ag/AgCl-NPs em *C. albicans* e *C. lusitaniae* é tempo e dose dependente, sendo igualmente eficaz à anfotericina B nas concentrações de 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup>, com exceção em 72 h para *C. albicans*. Em concentrações menores que 400 µg mL<sup>-1</sup>, a anfotericina B foi mais eficaz. Após a retirada dos tratamentos pelo período de 72 h, as culturas tratadas com Ag/AgCl-NPs conseguiram se reestabelecer na maioria das concentrações testadas, no entanto para *C. lusitaniae*, as maiores concentrações inviabilizam a cultura completamente. O segundo ciclo de tratamentos mostrou que, da mesma forma que foi observado nas bactérias, as Ag/AgCl-NPs melhoram sua eficácia, enquanto as culturas de *C. lusitaniae* tratadas com anfotericina B apresentaram níveis muito maiores de proliferação celular, comparado ao primeiro ciclo, indicando resistência ao tratamento.
- Ag/AgCl-NPs produzidas biologicamente por culturas de *C. lusitaniae* têm atividade antiproliferativa contra células de GBM. Importaneamente, Ag/AgCl-NPs apresentaram um efeito antiproliferativo consideravelmente menor em astrócitos humanos, e nossos dados indicaram que a concentração de 2,5 µg mL<sup>-1</sup> de Ag/AgCl-NPs foi a dose mais segura testada aqui, pois teve um forte efeito antiproliferativo contra células de GBM02 - e foi mais potente

do que TMZ - com baixo efeito antiproliferativo em astrócitos saudáveis. Estes resultados sugerem que Ag/AgCl-NPs têm potencial aplicação no tratamento de pacientes com GBM.

- Nossos dados também mostraram que o HCA pode ser usado para investigar o efeito antiproliferativo de NPMs contra células humanas, por análises de imagens de alto conteúdo de proliferação celular, com base na contagem de núcleos marcados com corantes fluorescentes.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ABHILASH, M., 2010.** Potential applications of Nanoparticles. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 1:1-12.

**ACS Green Chemistry Institute® & Oregon Nanoscience and Microtechnologies Institute, 2011.** Green Nanotechnology Challenges And Opportunities.

Disponível em: [www.greennano.org](http://www.greennano.org)

Acessado em: 20/06/2015.

**ALBERNAZ, V.L., 2014.** Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

**ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P., 2010.** *Biologia Molecular da Célula*, 5ª edição. Editora Artmed. Porto Alegre, 1396p.

**ALIEV, G.; DAZA, J.; LIPSITT, A.; MARTÍNEZ-AGÜERRO, M.; PALACIOS, H. H.; FISCHBACH, K.; OBRENOVICH, M. E.; LaMANNA, J. C.; BRAGIN, V. & MORALES, L., 2009.** Silver nanoparticles as alternate strategies for drug delivery to the Alzheimer brain. *The Journal of the Alzheimer's Association*, 5(4):324.

**ALVES, T.R., LIMA, F.R., KAHN, S.A., LOBO, D., DUBOIS, L.G., SOLETTI, R., BORGES, H. & NETO, V.M., 2011.** Glioblastoma cells: a heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life Sciences*, 89:532–539.

**ANANTH, A.N., DANIEL, S.C., SIRONMANI, T.A., UMAPATHI, S., 2011.** PVA and BSA stabilized silver nanoparticles based surface-enhanced plasmon resonance probes for protein detection. *Colloids Surf B Biointerfaces*; 1;85(2):138-44.

**ANDERSON, D. J. & MOSKOVITS, M., 2006.** A SERS-Active System Based on Silver Nanoparticles Tethered to a Deposited Silver Film. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(28):13722-7.

**ANGUISSOLA, S., GARRY, D., SALVATI, A., O'BRIEN, P.J. & DAWSON, K.A., 2014.** High content analysis provides mechanistic insights on the pathways of toxicity induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *PLoS One*, 9(9):108025.

**ARIAS, C.A., CONTRERAS, G.A. & MURRAY B.E., 2010.** Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6):555-62.

**ARVOLD, N.D. & RAERDON, D.A., 2014.** Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient. *Journal of Clinical Interventions in Aging*, 9:357–367.

**ASHARANI, P.V., HANDE, M.P. & VALIYAVEETIL, S., 2009.** Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*; 10:65.

**ASHOUR, S.M., 2014.** Silver nanoparticles as antimicrobial agent from *Kluyveromyces marxianus* and *Candida utilis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied*, 3(8):384-396.

**ASSANGA, S.B.I., GIL-SALIDO, A.A., LUJÁN, L.M.L., ROSAS-DURAZO, A., ACOSTA-SILVA, A.L., RIVERA-CASTAÑEDA, E.G., RUBIO-PINO, J.L., 2013.** Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, 4(4):60-70.

**ATEF, A.H., MANSOURB, M.K. & MAHMOUDC, H.H., 2013.** Biosynthesis of silver nanoparticles (Ag-Nps) (a model of metals) by *Candida albicans* and its antifungal activity on Some fungal pathogens (*Trichophyton mentagrophytes* and *Candida albicans*). *New York Science Journal*, 6(3):27-34.

**ATLAS, R.M., 2010.** Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition. CRC Press.

**AWWAD, A.M., SALEMB, N.M., KHRFANB, W. & IBRAHIMA, Q., 2015.** FT-IR spectroscopy and X-ray diffraction characterization of biosynthesised silver/silver chloride nanoparticles. *Arab Journal of Physical Chemistry*, 2(1):14-19.

**AZEVEDO, A.P.G.B., ADATI, F.M., SANTOS, G.S., CARVALHO, G.C., VETURELLI, P.N., DIAS, F.R. & FILHO, C.B.S., 2015.** Análise do potencial mercadológico de nanopartículas de prata de origem biológica por mapeamento de tecnologias e produtos em documentos de patentes. *Cadernos de prospecção*, 8:3.

**AZIZ, N., FARAZ, M., PANDEY, R., SHAKIR, M., FATMA, T., VARMA, A., BARMAN, I. & PRASAD, R., 2015.** Facile algae-derived route to biogenic silver nanoparticles: synthesis, antibacterial, and photocatalytic properties. *Langmuir* 31:11605–11612.

**BEIER, D., SCHULZ, J.B. & BEIER, C.P., 2011.** Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells—much more complex than expected. *Mol. Cancer*; 10:128 10.1186/1476-4598-10-128.

**BLYTH, C.C., PALASATHIRAN, P., O'BRIEN, T.A., 2007.** Antifungal Therapy in Children With Invasive Fungal Infections: A Systematic Review. *Pediatrics*, 119:772–784.

**BOOTE, B.W., BYUN, H. & KIM, J.H., 2013.** One-pot synthesis of various Ag–Au bimetallic nanoparticles with tunable absorption properties at room temperature. *Gold Bulletin*, 46(3):185-193.

**BRAYDEN, D.J., CRYAN, S.A., DAWSON, K.A., O'BRIEN, P.J. & SIMPSON, J.C., 2015.** High-content analysis for drug delivery and nanoparticle applications. *Drug Discovery Today*, 20(8):942–957.

**BUZEA, C., BLANDINO, I.I.P. & ROBBIE, K., 2007.** Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4):17-172.

**CARTA, D., CORRIAS, .A, FALQUI, A., BRESCIA, R., FANTECHI, E., PINEIDER, F. & SANGREGORIO, C., 2013.** EDS, HRTEM/STEM, and X-ray Absorption Spectroscopy Studies of Co-Substituted Maghemite Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117:9496–9506.

**CDC - Centers for Disease Control and Prevention, 2013.** Antibiotic resistance threats in the United States.

Disponível em: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

Acessado em: 30/04/2015

**COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO, 1991.** Relatório Brundtland - Nosso Futuro Comum, 2ª edição – Rio de Janeiro: Editora da Fundação Getúlio Vargas, 430 p.

**CREWE, A.V., WALL, J. & LANGMORE, J., 1970.** Visibility of Single Atoms. *Science*, 12:168(3937):1338-1340.

**CRUZ, D.S.M., 2010.** Biossíntese e Caracterização de Nanopartículas Metálicas. Dissertação submetida ao Departamento de Química e Bioquímica da Universidade de Lisboa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

**CUENCA-ESTRELLA, M., GOMEZ-LOPEZ, A., CUESTA, I., ZARAGOZA, O., MELLADO, E. & RODRIGUEZ-TUDELA, J.L., 2011.** Frequency of voriconazole resistance in vitro among Spanish clinical isolates of *Candida* spp. According to breakpoints established by the Antifungal Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4):1794-1797.

**DEVI, B., AHMARUZZAMAN & BEGUM, S., 2016.** A rapid, facile and green synthesis of Ag@AgCl nanoparticles for the effective reduction of 2,4-dinitrophenyl hydrazine. *New Journal of Chemistry*, 40:1497-1506.

**DINIZ, L.P., ALVES-LEON, S.V., TORTELLI, V., LOPES C.V., SETTI-PERDIGÃO, P., STIPURSKY, J., et al., 2012.** Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor  $\beta$  signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 287:49:13.

**DURÁN, N., CUEVAS, R., CORDI, L., RUBILAR, O. & DIEZ, M.C., 2014.** Biogenic silver nanoparticles associated with silver chloride nanoparticles (Ag@AgCl) produced by laccase from *Trametes versicolor*. *SpringerPlus*, 3:645.

**DURÁN, N., MARCATO, P.D., CONTI, R.D., ALVES, O.L., COSTA, F.T.M. & BROCCHI, M., 2010.** Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(6):949-959.

**DURÁN, N., NAKAZATO, G. & SEABRA, A.B., 2016.** Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15):6555-70.

**EL-BADAWY, A., LUXTON, T., SILVA, R., SCHECKEL, K., SUIDAN, M. & TOLAYMAT, T., 2010.** Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environmental Science & Technology*, 44(4):1260-1266.

**ELLIS, D., 2002.** Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother*;49 Suppl 1:7-10.

**ELUMALAI, S. & DEVIKA, R., 2014.** Biosynthesis Of Silver Nanoparticles Using *Curcuma longa* And Their Antibacterial Activity. *International Journal of Pharmacy Research Science*, 02(1):98-103.

**EUGENIO, M., MULLER, N., FRASES, S., ALMEIDA-PAES, R., LIMA, L.M.T.R., LEMGRUBER, L., FARINA, M., DE SOUZA, W. & SANT'ANNA, C., 2016.** Yeast-derived biosynthesis of silver/silver chloride nanoparticles and their antiproliferative activity against bacteria. *RSC Advances*, 6:9893-9904.

**EUROPEAN COMISSION, 2011.** On the definition of a nanomaterial. *Official Journal of the European Union*, v. 696.

**FARIA, J., ROMÃO, L., MARTINS, S., ALVES, T., MENDES, F.A., FARIA, G.P., HOLLANDA, R., TAKIYA, C., CHIMELLI, L., MORANDI, V., SOUZA, J.M., ABREU, J.G. & MOURA-NETO, V., 2006.** Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization. *Differentiation*, 74(9-10):562-72.

**FAVEL, A., MICHEL-NGUYEN, A., CHASTIN, C., TROUSSON, F., PENAUD, A., REGLI, P., 1997.** In-vitro susceptibility patterns of *Candida lusitanae* isolates and evaluation of the Etest method. *J. Antimicrob. Chemother.* 39:591–596.

**FERRETTI, J.J., McSHAN, W.M., AJDIC, D., SAVIC, D.J., SAVIC, G., LYON, K., et al., 2001.** Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8):4658-63.

**FILHO, V.W., MIRRA, A.P., LOPEZ, R.V.M. & ANTUNES, L.F., 2010.** Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*; 13(2):175-87.

**FIOL, F.S., MATTOS FILHO, T.R. & GROppo, F.C., 2000.** Resistência Bacteriana. *RBM. Revista Brasileira de Medicina*, 57(10):1129-1140.

**FRANCI, G., FALANGA, A., GALDIERO, S., PALOMBA, L., RAI, M., MORELLI, G. & GALDIERO, M., 2015.** Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules*, 20:8856-8874.

**FREY, C.N., 1930.** History and Development of the Mordern Yeast Industry. *Industrial & Engineering Chemistry*, 22(11):1154-1162.

**FRIDKIN, S.K., 2001.** Vancomycin-Intermediate and Resistant *Staphylococcus aureus*: What the Infectious Disease Specialist Needs to Know. *Clinical Infectious Diseases*, 32:108-15.

**GADE, A., RAI, M. & KULKARNI, S., 2011.** *Phoma sorghina*, a phytopathogen mediated synthesis of unique silver rods. *International Journal of Green Nanotechnology*, 3:153–159.

**GAJBHIYE, M.B., KESHARWANI, J.G., INGLE, A.P., GADE, A.K. & RAI, M.K., 2009.** Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and its activity against pathogenic fungi in combination of fluconazole. *Nanomedicine*, 5(4):382-6.

**GALDIERO, S., FALANGA, A., VITIELLO, M., CANTISANI, M., MARRA, M. & GALDIERO, M., 2011.** Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. *Molecules*, 16:8894-8918.

**GALLEGO, O., 2015.** Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Current Oncology*, 22(4):273–281.

**GAVISH, A., KRAYZLER, E., NAGLER, R., 2016.** Tumor Growth and Cell Proliferation Rate in Human Oral Cancer. *Arch Med Res*, 47(4):271-4.

**GLASER, T., HAN, I., WU, L., ZENG, X., 2017.** Targeted Nanotechnology in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Pharmacology*; 8:166.

**GOLDLUST, S.A., TURNER, G.M., GOREN, J.F. & GRUBER, M.L., 2008.** Glioblastoma Multiforme: Multidisciplinary Care and Advances in Therapy. *Hospital Physician*, 44:6:9-22.

**GOPINATH, V., PRIYADARSHINIA, S., PRIYADARSHINIA, N.M., PANDIANB, K. & VELUSAMY, P., 2013.** Biogenic synthesis of antibacterial silver chloride nanoparticles using leaf extracts of *Cissus quadrangularis Linn*. *Materials Letters*, 91:224–227.

**GRASSIAN, V.H., 2008.** When size really matters: size-dependent properties and surface chemistry of metal and metal oxide nanoparticles in gas and liquid phase environments. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(47):18303-18313.

**GUINET, R., CHANAS, J., GOULLIER, A., BONNEFOY, G., AMBROISE-THOMAS, P., 1983.** Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitaniae*. *J. Clin. Microbiol.* 18:443–444.

**HACKER, M., MESSER, W.S. & BACHMANN, K.A., 2009.** *Pharmacology: Principles and Practice*. Academic Press, pp. 380.

**HOLMES, A.M., LIM, J., STUDIER, H., ROBERTS, M.S., 2016.** Varying the morphology of silver nanoparticles results in differential toxicity against micro-organisms, HaCaT keratinocytes and affects skin deposition. *Nanotoxicology*, 10(10):1503-1514.

**HSIN, Y.H., CHEN, C.F., HUANG, S., SHIH, T.S., LAI, P.S. & CHUEH, P.J., 2008.** The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS-and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett.*;179:130–9.

**HUSSEINY, S.M., SALAHB, T.A., ANTERB, H.A., 2015.** Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences; 4(3):225-231.

**HUSSIEN, R., RIHN, B. H., EIDI, H., RONZANI, C., JOUBERT, O., FERRARI, L., VAZQUEZ, O., KAUFER, D., BROOKS, G. A., 2013.** Unique growth pattern of human mammary epithelial cells induced by polymeric nanoparticles. *Physiological Reports*, 1(4), e00027.

**HYNING, D.L.V. & ZUKOSKI, C.F., 1998.** Formation Mechanisms and Aggregation Behavior of Borohydride Reduced Silver Particles. *Langmuir*, 14:7034–7046.

**IBRAHIM, H.M.M., 2015.** Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8:265–275.

**INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015. Tipos de câncer.**

Disponível em: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)

Acessado em: 11/05/2015

**JAIN, P. & AGGARWAL, V., 2012.** Synthesis, Characterization and Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles from Microorganisms-A Review. *International Journal of Nano and Material Sciences*, 1(2):108-120.

**JAIN, P. & PRADEEP, T., 2005.** Potential of Silver Nanoparticle-Coated Polyurethane Foam As an Antibacterial Water Filter. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1):59-63.

**JENAA, J., PRADHANA, N., DASHB, B.P., SUKLAA, L.B., PANDA, P.K., 2013.** Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using microalga *Chlorococcum humicola* and its antibacterial activity. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(1):1-8.

**JEYARAJ, M., SATHISHKUMAR, G., SIVANANDHAN, G., MUBARAK ALI, D., RAJESH, M., ARUN, R., KAPILDEV, G., MANICKAVASAGAM, M., THAJUDDIN, N., PREMKUMAR, K. & GANAPATHI, A., 2013.** Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: An experimental report. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106:86–92.

**KAYSER, O., LEMKE, A. & HERNANDEZ-TREJO, N., 2005.** The Impact of Nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 6(1):3-5.

**KIM, K.J., SUNG, W.S., MOON, S.K., CHOI, J.S., KIM, J.G. & LEE, D.G., 2008.** Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18:1482–1484.

**KIM, L. & GLANTZ, M., 2006.** Chemotherapeutic options for primary brain tumors. *Current Treatment Options in Oncology*, 7:467–78.

**KULKARNI, A.A. & BHANAGE, B.M., 2014.** Ag@AgCl Nanomaterial Synthesis Using Sugar Cane Juice and Its Application in Degradation of Azo Dyes. *ACS Sustainable Chem. Eng.*; 2(4):1007–1013.

**KUSHI, L.H., DOYLE, C., McCULLOUGH, M., ROCK, C.L., DEMARK-WAHNEFRIED W, BANDERA, E.V., GAPSTUR, S., PATEL A.V., ANDREWS, K. & GANSLER, T., 2012.** American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: A Cancer Journal for Clinician*, 62(1):30-67.

**LANDMAN, D. & QUALE, J.M., 1997.** Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40:161-70.

**LAVAKUMAR, V., MASILAMANI, K., RAVICHANDIRAN, V., VENKATESHAN, N., SAIGOPAL, D.V.R., KUMAR, C.K.A., SOWMYA, C., 2015.** Promising upshot of silver nanoparticles primed from *Gracilaria crassa* against bacterial pathogens. *Chem Centr J* 9:42.

**LARA, H.H., ROMERO-URBINA, D.G., PIERCE, C., LOPEZ-RIBOT, J.L., ARELLANO-JIMÉNEZ, M.J., JOSE-YACAMAN, M., 2015.** Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J Nanobiotechnology*, 15;13:91.

**LIANG, P., SHI, H., ZHU, W., GUI, Q., XU, Y., MENG, J., GUO, X., GONG, Z., CHEN, H., 2017.** Silver nanoparticles enhance the sensitivity of temozolomide on human glioma cells. *Oncotarget*, 8(5): 7533-7539.

**LOCATELLI, E., NADDAKA, M., UBOLDI, C., LOUDOS, G., FRAGOGEORGI, E., MOLINARI, V., PUCCI, A., TSOTAKOS, T., PSIMADAS, D., PONTI, J. & FRANCHINI, M.C., 2014.** Targeted delivery of silver nanoparticles and alisertib: *in vitro* and *in vivo* synergistic effect against glioblastoma. *Nanomedicine (Lond)*, 9(6):839-849.

**LONGHI, C., SANTOS, J.P., MOREY, A.T., MARCATO, P.D., DURÁN, N., PINGE-FILHO, P., NAKAZATO, G., YAMADA-OGATTA, S.F. & YAMAUCHI, L.M., 2016.** Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 54:428–432.

**LOUIS, D.N., OHGAKI, H., WIESTLER, O.D., CAVENEE, W.K., BURGER, P.C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B.W. & KLEIHUES, P., 2007.** The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2):97–109.

**LUZZATTO, L., APIRION, D., & SCHLESSINGER, D., 1968.** Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 60(3): 873–880.

**MAC EWAN, S.R., CALLAHAN, D.J. & CHILKOTI, A., 2010.** Stimulus-responsive macromolecules and nanoparticles for cancer drug delivery. *Nanomedicine (Lond)*; 5:793-806.

**MACIEJ, S. LESNIAK & BREM, H., 2004.** Targeted therapy for brain tumours. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3:499-508.

**MAFUNÉ, F., KOHNO, J., TAKEDA, Y. & KONDOW T., 2000.** Low temperature aqueous phase synthesis of silver/silver chloride plasmonic nanoparticles as visible light photocatalysts. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104:8333–8337.

**MARCATO, P.D. & DURÁN, N., 2011.** Metal nanoparticles in microbiology. In: M.Rai, Durán N (eds) *Biogenic silver nanoparticles: applications in medicines and textiles and their health implications*. Springer verlag, Berlin Chap. 11, pp. 249–267.

**MARR, A.K., McGWIRE, B.S. & McMASTER, W.R., 2012.** Modes of action of leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future Microbiology*, 7(9):1047–59.

**MARTIN, M.N., ALLEN, A.J., MACCUSPIE, R.I., HACKLEY, V.A., 2014.** Dissolution, agglomerate morphology, and stability limits of protein-coated silver nanoparticles. *Langmuir*;30(38):11442-52.

**MATHEW, J., RATHOD, V., SINGH, D., NINGANAGOUDA, S., SINGH, A.K. & KULKARNI, P., 2015.** Enhanced efficacy of ketoconazole coated silver nanoparticles against the fungus *Malassezia furfur* a dandruff causing agent. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4:1246–1258.

**MBHELE, Z.H., SALEMANTE, M.G., SITTERT, C.G.C.E.V., NEDELJKOVIC, J.M., DJOKOVIC, V. & LUYT, A.S., 2003.** Fabrication and Characterization of Silver–Polyvinyl Alcohol Nanocomposites. *Chemistry of Materials*, 15(26):5019–5024.

**MELO JR., M.A., SANTOS, L.S.S., GONCALVES, M.C. & NOGUEIRA, A.F., 2012.** Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, 35(9):1872-1878.

**MELO, N.R., TAGUCHI, H., JORGE, J., PEDRO, R.J., ALMEIDA, O.P., FUKUSHIMA, K., NISHIMURALL, K., & MIYAJI, M., 2004.** Oral Candida flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 99:425-431.

**MESAROS, N., NORDMANN, P., PLESIAT, P., ROUSSEL-DELVALLEZ, M., VAN ELDERE, J., GLUPCZYNSKI, Y., VAN LAETHEM, Y., JACOBS, F., LEBECQUE, P., MALFROOT, A., TULKENS, P.M. & VAN BAMBEKE, F., 2007.** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(6):560-78.

**MODREK, A.S., BAYIN, N.S., PLACANTONAKIS, D.G., 2014.** Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J Stem Cells*; 6(1):43-52.

**MONTEIRO, D.R., GORUP, L.F., SILVA, S., NEGRI, M., CAMARGO, E.R., OLIVEIRA, R., BARBOSA, D.B., HENRIQUES, M., 2011.** Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*, 27(7):711-719.

**MOROKOFF, A., NG, W., GOGOS, A. & KAYE, AH., 2015.** Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J Clin Neurosci*;22(8):1219-26.

**MORONES, J.R., ELECHIGUERRA, J.L., CAMACHO, A., HOLT, K., KOURI, J.B., RAMÍREZ, J.T. & YACAMAN, M.J., 2005.** The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16:2346-2353.

**MUÑOZ, R.V., BORJA, M.A. & LONGORIA, E.C., 2014.** Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles. *PLoS ONE*, 9(10): e108876.

**NAGARAJAN, S. & KUPPUSAMY, K.A., 2013.** Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of gulf of Mannar, India. *Journal of Nanobiotechnology*, 11:39.

**NAGHDI, M., TAHERAN, M., BRAR, S.K., VERMA, M., SURAMPALLI, R.Y. & VALERO, J.R., 2015.** Green and energy-efficient methods for the production of metallic nanoparticles. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6:2354–2376.

**NAMASIVAYAM, S.K.R., JAYAKUMAR, D., KUMAR, R. & BHARANI, R.S.A., 2015.** Antibacterial and anticancerous biocompatible silver nanoparticles synthesised from the cold-tolerant strain of *Spirulina platensis*. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3:265–272.

**NAQVI, S.Z., KIRAN, U., ALI, M.I., JAMAL, A., HAMEED, A., AHMED, S. & ALI, N., 2013.** Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Journal of International Journal of Nanomedicine*, 8:3187-95.

**NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE**, [homepage na internet]. What's so special about the nanoscale?

Disponível em: [www.nano.gov](http://www.nano.gov)

Acessado em: 11/03/2015

**NAVEEN, K.S.H., KUMAR, G., KARTHIK, L. & RAO, K.V.B., 2010.** Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. *Archives of Applied Science Research*, 2(6):161-167.

**NDIKAU, M., NOAH, N.M., ANDALA, D.M., & MASIKA, E., 2017.** Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Citrullus lanatus* Fruit Rind Extract. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017:ID8108504.

**NEUBECK, C., SEIDLITZ, A., KITZLER, H.H., BEUTHIEN-BAUMANN, B. & KRAUSE, M., 2015.** Glioblastoma multiforme: emerging treatments and stratification markers beyond new drugs. *The British Journal of Radiology*, 88(1053):20150354.

**OLENIN, A.Y., KRUTYAKOV, Y.A., KUDRINSKII, A.A. & LISICHKIN, G.V. 2008.** Formation of surface layers on silver nanoparticles in aqueous and water-organic media. *Colloid J*, 70:71–76.

**OLIVEIRA, A.C., KOVNER, C.T. & SILVA, R.S., 2010.** Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 18(2):97-104.

**OMS - Organização Mundial da Saúde, 2014.** Antimicrobial resistance: Global report on surveillance.

Disponível em: [www.who.int](http://www.who.int)

Acessado em: 05/08/2016

**PANÁCEK, A., KOLÁR, M., VECEROVÁ, R., KVITEK, L., 2009.** Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, 30(31):6333-40.

**PANIGRAHI, M., DAS, P.K., PARIKH, P.M., 2011.** Brain tumor and Gliadel wafer treatment. *Indian Journal of Cancer*, 48:11–17.

**PAPPAGIANIS, D., COLLINS, M. S., HECTOR, R., & REMINGTON, J., 1979.** Development of Resistance to Amphotericin B in *Candida lusitanae* Infecting a Human. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16(2), 123–126.

**PAPPAS, P.G., REX, J.H., SOBEL, J.D., FILLER, S.G., DISMUKES, W.E., WALSH, T.J., EDWARDS, J.E., 2004.** Guidelines for Treatment of Candidiasis. *Clin Infect Dis*;38 (2): 161-189.

**PARKHILL, J., DOUGAN, G., JAMES, K.D., THOMSON, N.R., PICKARD, D., WAIN, J., et al., 2001.** Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhi* CT18. *Nature*, 413(6858):848-52.

**PARK, K., TUTTLE, G., SINCHE, F., & HARPER, S.L., 2013.** Stability of citrate-capped silver nanoparticles in exposure media and their effects on the development of embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Archives of Pharmacal Research*, 36(1), 125–133.

**PATEL, A. C., LI, S., WANG, C., ZHANG, W. & WEI, Y., 2007.** Electrospinning of Porous Silica Nanofibers Containing Silver Nanoparticles for Catalytic Applications. *Chemistry of Materials*, 19(6):1231–1238.

**PAULL, R.; WOLFE, J.; HÉBERT, P. & SINKULA, M., 2003.** Investing in nanotechnology. *Nature Biotechnology*, 21:1144-1147.

**PEREIRA, M.K., 2009.** Ressonância de plasmon de superfície localizado e espalhamento Raman em soluções coloidais de ouro. Dissertação apresentada ao Instituto de Física da UFRGS, em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

**PFALLER, M.A. & DIEKEMA, D., 2012.** The epidemiology of invasive candidiasis. In: Calderone RA, editor. *Candida and candidiasis*. 2 ed. Washington DC: ASM Press. 449–480.

**PFALLER, M.A., 2011.** *Candida* Bloodstream Infections: Comparison of Species Distributions and Antifungal Resistance Patterns in Community-Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55:561-566.

**PIAO, M.J., KANG, K.A., LEE, I.K., KIM, H.S., KIM, S., CHOI, J.Y., et al., 2011.** Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett*; 201:92–100.

**PIRES, N.R., 2013.** Síntese verde e parcialmente verde de nanopartículas de prata estabilizadas por galactomanana da fava danta. Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Química.

**QUESTER, K., AVALOS-BORJA, M. & CASTRO-LONGORIA, E., 2013.** Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, 54(55):1–27.

**RAI, M., 2013.** Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. *Ciência e Cultura*, 65:44-48.

**RAI, M., KON, K., INGLE, A., DURÁN, N., GALDIERO, S., GALDIERO, M., 2014.** Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5):1951-61.

**RAIZER, J.J., FITZNER, K.A., JACOBS, D.I., BENNETT, C.L., LIEBLING, D.B., LUU, T.H., TRIFILIO, S.M., GRIMM, S.A., et al., 2015.** Economics of Malignant Gliomas: A Critical Review. *Journal of Oncology Practice*, 11(1):59-65.

**RAMERY, E. & O'BRIEN, P.J., 2014.** Evaluation of the cytotoxicity of organic dust components on THP1 monocytes-derived macrophages using high content analysis. *Environmental Toxicology*, 29(3):310–319.

**RAMIREZ, Y.P., WEATHERBEE, J.L., WHEELHOUSE, R.T. & ROSS, A.H., 2013.** Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance. *Pharmaceuticals*, 6:1475-1506.

**RAMYADEVI, J., JEYASUBRAMANIAN, K., MARIKANI, A., RAJAKUMAR, G. & RAHUMAN, A.A., 2012.** Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 71:114–116.

**RAO, B.V. & BOOMINATHAN, M., 2016.** Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles of Seaweeds. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 3(06):296-307.

**RAWAT, M., SINGH, D., SARAF, S. & SARAF, S., 2006.** Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(9):1790-1798.

**REIDY, B., HAASE, A., LUCH, A., DAWSON, K.A. & LYNCH, I., 2013.** Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials*, 6:2295-2350.

**ROSARIN, F.S., ARULMOZHI, V., NAGARAJAN, S. & MIRUNALINI, S., 2013.** Antiproliferative effect of silver nanoparticles synthesized using amla on Hep2 cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(1):1-10.

**RUAN, S.Y., CHIEN, J.Y., HOU, Y.C., HSUEH, P.R., 2010.** Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia*. *International Journal of Infectious Diseases*; 14, e147-e149.

**RUTBERG, F.G., DUBINA, M.V., KOLIKOV, V.A., MOISEENKO, F.V., IGNAT'eva, E.V., VOLKOV, N.M. et al., 2008.** Effect of silver oxide nanoparticles on tumor growth in vivo. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 421:191-3.

**SATHISHKUMAR, M., SNEHA, K., WON, S.W., CHO, C.W., KIM, S., YUN, Y.S., 2009.** Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nanocrystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 73:332–338.

**SATHISHKUMAR, M., SNEHA, K. & YUN, Y.S., 2010.** Immobilization of silver nanoparticles synthesized using *Curcuma longa* tuber powder and extract on cotton cloth for bactericidal activity. *Bioresource Technology*, 101:7958–7965.

**SATHORNSUMETEE, S., REARDON, D.A., DESJARDINS, A., QUINN, J.A., VREDENBURGH, J.J. & RICH, J.N., 2007.** Molecularly Targeted Therapy for Malignant Glioma. *Cancer*, 110(1):13-24.

**SCHNEIDER, C.A., RASBAND, W.S. & ELICEIRI, K.W., 2012.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7):671-5.

**SCHNEITER, R., 2004.** *Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast*.  
Disponível em: [www.unifr.ch](http://www.unifr.ch)

**SEBAUGH, J.L., 2011.** Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2):128-34.

**SHARIFF, A., KANGAS, J., COELHO, L.P., QUINN, S. & MURPHY, R.F., 2010.** Automated image analysis for high-content screening and analysis. *Journal of biomolecular screening*, 15:726-734.

**SHARMA, S., CHOCKALINGAM, S., SANPUI, P., CHATTOPADHYAY, A. & GHOSH, S.S., 2014.** Silver nanoparticles impregnated alginate-chitosan-blended nanocarrier induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Advanced Healthcare Materials*, 3(1):106-114.

**SHERLEY, J.L., STADLER, P.B., STADLER, J.S., 1995.** A quantitative method for the analysis of mammalian cell proliferation in culture in terms of dividing and non-dividing cells. *Cell Proliferation*, 28(3):137-44.

**SHI, H., MAGAYE, R., CASTRANOVA, V. & ZHAO, J., 2013.** Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, 10:15.

**SILVA, H.F.O., LIMA, K.M.G., CARDOSO, M.B., OLIVEIRA, J.F.A., MELO, M.C.N., SANT'ANNA, C., EUGENIO, M. & GASPAROTTO, L.H.S., 2016.** Doxycycline conjugated with polyvinylpyrrolidone encapsulated silver nanoparticles: a polymer's malevolent touch against *Escherichia coli*. *RSC Advances*, 5:66886.

**SILVER, S., 2003.** Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3):341-53.

**SINGH, G., BABELE, P.K., SHAHI, S.K., SINHA, R.P., TYAGI, M.B. & KUMAR, A., 2014.** Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Cell Extracts of *Anabaena doliolum* and Screening of Its Antibacterial and Antitumor Activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10):1354–1367.

**SINGH, P., KIM, Y.J., SINGH, H., WANG, C., HWANG, K.H., FARH, M.E.A. & YANG, D.C., 2015.** Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 10:2567–2577.

**SMITH, P.B., STEINBACH, W.J. & BENJAMIN JR., D.K., 2005.** Invasive *Candida* infections in the neonate. *Drug Resistance Updates*, 8:147–162.

**SODERSTJERNA, E., JOHANSSON, F., KLEFBOHM, B., JOHANSSON, U.E., 2013.** Gold- and Silver Nanoparticles Affect the Growth Characteristics of Human Embryonic Neural Precursor Cells. *PlosOne*; 8(3):e58211.

**SONG, J., ROH, J., LEE, I. & JANG, J., 2013.** Low temperature aqueous phase synthesis of silver/silver chloride plasmonic nanoparticles as visible light photocatalysts. *Dalton Transactions*, 42(38):13897-904.

**SOOMRO, R.A., SHERAZI, S.T.H., SIRAJUDDIN, MEMON, N., SHAH, M.R., KALWAR, N.H., HALLAM, K.R. & SHAH, A., 2013.** Synthesis of air stable copper nanoparticles and their use in catalysis. *Advanced Materials Letters*, 5(4):191-198.

**SPRINGER, B., KIDAN, Y.G., PRAMMANANAN, T., ELLROTT, K., BÖTTGER, E.C. & SANDER, P., 2001.** Mechanisms of Streptomycin Resistance: Selection of Mutations in the 16S rRNA Gene Conferring Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10):2877-2884.

**SRIRAN, M.I., KANTH, S.B.M., KALISHWARALAL, K. & GURUNATHAN, S., 2010.** Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *International Journal of Nanomedicine*, 5:753–762.

**STUPP, R., HEGI, M.E., MASON, W.P., VAN DEN BENT, M.J., TAPHOORN, M.J., JANZER, R.C., LUDWIN, S.K., ALLGEIER, A., FISHER, B., et al., 2009.** Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-Year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10:459–466.

**SURESH, A.K., PELLETIER, D.A., WANG, W., MOON, J.W., GU, B., MORTENSEN, N.P., ALLISON, D.P., JOY, D.C., PHELPS, T.J., DOKTYCZ, M.J., 2010.** Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. *Environ Sci Technol* 44:5210–5215.

**TRAN, Q.H., NGUYEN, V.Q. & LE, A.T., 2013.** Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4:3.

**THORNSBERRY, C., BROWN, N.P., DRAGHI, D.C., EVANGELISTA, A.T., YEE, Y.C. & SAHM, D.F., 2008.** Antimicrobial activity among multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in the United States, 2001-2005. *Postgraduate Medical Journal*, 120:32.

**UÇKAY, I., PITTET, D., VAUDAUX, P., SAX, H., LEW, D. & WALDVOGEL, F., 2009.** Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Annals of Medicine*, 41(2):109-19.

**UNFRIED, K., SYDLIK, U., BIERHALS, K., WEISSENBERG, A., ABEL, J., 2008.** Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 294(2):L358-67.

**URBANSKA, K., PAJAK, B., ORZECZOWSKI, A., SOKOLOWSKA, J., GRODZIK, M., SAWOSZ, E., SZMIDT, M. & SYSA, P., 2015.** The effect of silver nanoparticles (AgNPs) on proliferation and apoptosis of in ovo cultured glioblastoma multiforme (GBM) cells. *Nanoscale Research Letters*, 10:98.

**VANAJA, M., RAJESHKUMAR, S., PAULKUMAR, K., GNANAJOBITHA, G., CHITRA, K., MALARKODI, C. & ANNADURAI, G., 2015.** Fungal assisted intracellular and enzyme based synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal efficiency. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2:8–19.

**VARNER, K., SANFORD, J., VENKATAPATHY, B.R., EL-BADAWY, A. & FELDHAKE, D., 2010.** State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More.

Disponível em: [www.epa.gov](http://www.epa.gov)

Acessado em: 18/03/2015.

**VASEASHTA, A. & DIMOVA-MALINOVSKA, D., 2005.** Nanostructured and nanoscale devices, sensors and detectors. *Science and Technology of Advanced Materials*, 6:3-4.

**VAZQUEZ-MUÑOZ, R., AVALOS-BORJA, M., CASTRO-LONGORIA, E., 2014.** Ultrastructural Analysis of *Candida albicans* When Exposed to Silver Nanoparticles. *PLoS ONE* 9(10): e108876.

**VIGNESHWARAN, N., ASHTAPUTRE, N.M., VARADARAJAN, P.V., NACHANE, R.P., PARALIKAR, K.M. & BALASUBRAMANYA, R.H., 2007.** Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Material Letters*, 61:1413–1418.

**VILLANUEVA-IBÁÑEZ, M., YAÑEZ-CRUZ, M.G., ÁLVAREZ-GARCÍA, R., HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.A. & FLORES-GONZÁLEZ, M.A., 2015.** Aqueous corn husk extract – mediated green synthesis of AgCl and Ag nanoparticles - *Materials Letters*, 152:166–169.

**WAGHMARE, S.R., MULLA, M.N., MARATHE, S.R. & SONAWANE, K.D., 2015.** Ecofriendly production of silver nanoparticles using *Candida utilis* and its mechanistic action against pathogenic microorganisms. *3 Biotech*, 5(1):33-38.

**WANG, H., CHEN, H., WANG, Y., HUANG, J., KONG, T., LIN, W., ZHOU, Y., LIN, L., SUN, D. & LI, Q., 2012.** Stable Silver Nanoparticles with Narrow Size Distribution Non-enzymatically Synthesized by *Aeromonas* sp. SH10 Cells in the Presence of Hydroxyl Ions. *Current Nanoscience*; 8(6):838-846.

**WAXMAN, D.J. & STROMINGER, J.L., 1983.** Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics. *Annual Review of Biochemistry*, 52:825-869.

**WEIR, A., WESTERHOFF, P., FABRICIUS, L., HRISTOVSKI, K. & GOETZ, N.V., 2012.** Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental Science & Technology*, 46:2242–2250.

**WEN, P.Y. & KESARI, S., 2008.** Malignant gliomas in adults. *The New England Journal of Medicine*, 359:492–507.

**WOJTATOWICZ, M., CHRZANOWSKA, J., JUSZCZYK, P., SKIBA, A., GDULA, A., 2001.** Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. *Int J Food Microbiol*;69:135-140.

**XU, Y., GAO, C., LI, X., HE, Y., ZHOU, L., PANG, G. & SUN, S., 2013.** In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against ocular pathogenic filamentous fungi. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29:270–274.

**YOUNG, D.W., BENDER, A., HOYT, J., McWHINNIE, E., CHIRN, G.W., et al., 2008.** Integrating high-content screening and ligand-target prediction to identify mechanism of action. *Nature Chemical Biology*, 4:59–68.

**YOUNG, L.Y., HULL, C.M., HEITMAN, J., 2003.** Disruption of Ergosterol Biosynthesis Confers Resistance to Amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother*;47(9): 2717–2724.

**ZANELLA, F., LORENS, J.B. & LINK, W., 2010.** High content screening: seeing is believing. *Trends in Biotechnology*, 28(5):237-45.

**ZEWDE, B., AMBAYE, A., STUBBS III, S., RAGHAVAN, D., 2016.** A Review of Stabilized Silver Nanoparticles – Synthesis, Biological Properties, Characterization, and Potential Areas of Applications. *JSM Nanotechnology & Nanomedicine*; 4(2): 1043.

**ZHANG, J.Z. & NOGUEZ, C., 2008.** Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. *Plasmonics*, 3:127–150.