

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
CURSO DE BIOMEDICINA**

Alice dos Santos Araujo

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PRODUZIDAS POR SÍNTESE VERDE**

Santa Cruz do Sul
2021

Alice dos Santos Araujo

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PRODUZIDAS POR SÍNTESE VERDE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso
de Biomedicina da Universidade de Santa Cruz do Sul
para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Profa. Dra. Lisianne Brittes Benitez

Santa Cruz do Sul
2021

RESUMO

A resistência bacteriana, conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma das principais ameaças de saúde pública do mundo no século 21, devido à maior dificuldade no tratamento eficaz de patologias causadas por bactérias e fungos de origem clínica, levando, por consequência, a um aumento nos gastos com saúde pública pelo prolongamento dose tratamentos e das internações. O uso das nanopartículas vem ganhando destaque como uma alternativa aos tratamentos convencionais. Dentre as nanopartículas metálicas utilizadas, se destacam as nanopartículas de prata (AgNPs) formadas a partir de síntese verde, que são atualmente amplamente pesquisadas e consideradas como promissoras para o controle da multirresistência microbiana, uma vez que, podem transformar-se em nanoantibióticos e potencializadoras para aqueles antibióticos já existentes, além ,é claro, de devido ao seu potencial antimicrobiano sua aplicação em diversos produtos da área da saúde, da indústria e meio ambiente vem ganhando destaque nos últimos anos. Diferentes organismos biológicos são capazes de sintetizar nanopartículas a partir de um método mais eficiente e ecologicamente correto, dentre eles, destaca-se as plantas, as quais produzem extratos com substâncias de potencial redutor, as quais atuam reduzindo íons metálicos presentes em um sal inorgânico a forma reduzida desse metal, transformando-os em nanopartículas. O objetivo deste estudo foi avaliar a possível atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de diferentes extratos de plantas, mel e glicerol frente aos isolados bacterianos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* e à levedura *Candida albicans*. Para a avaliação da atividade antimicrobiana das diferentes nanopartículas foi utilizada a técnica de ágar difusão em poços. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para as nanopartículas que apresentaram atividade antimicrobiana. Como resultados observou-se que das oito nanopartículas de prata testadas, seis apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, podendo ser observada uma maior resistência às AgNPs pelas bactérias Gram-negativas. Os valores de CIM observados mostram inibição, em sua maioria, no valor de 32 ug/mL. Apenas a bactéria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* não sofreu a ação inibitória de nenhuma nanopartícula. A AgNP de rabanete pH 11,4 (3) obteve o maior espectro de ação. A nanopartícula de prata sintetizada com rabanete (pH 6,8) foi o antimicrobiano cuja menor concentração foi capaz de impedir o crescimento visível do fungo *Candida albicans*. Concluiu-se que as AgNPs sintetizadas a partir de produtos naturais, em sua maioria, inibiram, em algum grau, o crescimento dos isolados clínicos testados evidenciando que essa nanotecnologia pode ser uma alternativa promissora para o desenvolvimento e auxílio de novos produtos antimicrobianos.

Palavras-chaves: Nanopartículas de prata, Síntese verde, Multirresistência, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) claims bacterial resistant is one of the main public health threats in the world in the 21st century. This happens due to the greater difficulty in the effective treatment of pathologies caused by bacteria and fungi of clinical origin. As a result there is an increase in public health expenses due to the extension of treatments and hospitalizations. The use of nanoparticles has gained prominence as an alternative to conventional treatments. Among the metallic nanoparticles used, silver nanoparticles (AgNPs) formed from green synthesis stand out. AgNPs are currently widely researched and considered as promising for the control of microbial multiresistance, since they can be transformed into nanoantibiotics and enhancers for those that already exist. When used in products for health, industry and the environment. Different biological organisms are capable of synthesizing nanoparticles using a safer, more efficient and ecologically correct method, among them, plants stand out, which produce extracts that act as metal ion reducers, transforming them into nanoparticles. The aim of this study was to evaluate the possible antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from different plant extracts, honey and glycerol against bacterial isolates *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* and *Candida albicans* yeast. To evaluate the antimicrobial activity of different nanoparticles, the well diffusion method was used. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for the nanoparticles that showed antimicrobial activity. As a result, it was observed that of the eight silver nanoparticles tested, six showed antimicrobial activity against the tested microorganisms, with greater resistance to AgNPs by Gram-negative bacteria being observed. The MIC values observed show mostly inhibition at 32 ug/ml. Only the Gram negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* did not suffer the inhibitory action of any nanoparticles. The radish AgNP pH 11.4 (3) had the largest action spectrum. The silver nanoparticle synthesized with radish (pH 6.8) was the antimicrobial whose lowest concentration was able to prevent the visible growth of the fungus *Candida albicans*. It was concluded that AgNPs synthesized from natural products, mostly, inhibited, to some degree, the growth of the clinical isolates tested, showing this nanotechnology can be a promising alternative for the development and assistance of new antimicrobial products.

Keywords: Silver nanoparticles, Green synthesis, Multiresistance, Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de síntese verde de NPs através de diferentes organismos biológicos.....	13
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos sintetizadores de NPs metálicas.....	14
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
3.1 Nanotecnologia.....	11
3.2 Nanopartículas metálicas (sintéticas e biológicas)	12
3.2.1 Nanopartículas sintetizadas por plantas e produtos derivados de plantas	15
3.2.2 Nanopartículas sintetizadas por microrganismos	16
3.3 Nanopartículas de prata	17
3.3.1 Utilização das nanopartículas de prata	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Local de estudo	21
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	21
4.2.1 Padronização da densidade do inóculo	21
4.2.2 Inoculação das placas e leitura dos resultados	22
4.3 Concentração Inibitória Mínima	22
4.4 Análise dos dados	23
4.5 Divulgação dos dados da pesquisa	23
5 RESULTADOS	24
6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXOS	31

ANEXO A32

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um sério problema de saúde pública, não só no Brasil, mas também em todo o mundo, uma vez que doenças causadas por bactérias e fungos, que antes eram tratadas eficientemente com o auxílio destes medicamentos, hoje estão cada vez mais difíceis de serem tratadas (BODNAR, 2018). A resistência desenvolvida por alguns microrganismos é algo natural e evolutivo, no entanto, ultimamente essa resistência tem acelerado de forma preocupante e, muitas vezes, mais rápida que a produção de novos antibióticos eficientes, pois o uso indiscriminado e incorreto desses medicamentos fez com que esses microrganismos ficassem seletivos e multirresistentes (BODNAR, 2018). Esse fato é, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das principais ameaças de saúde pública do mundo no século 21, uma vez que, ocorre um aumento nos gastos de saúde pública, devido ao prolongamento de tratamentos e internações e um aumento nos números de morbidade e mortalidade (SINGH et al., 2020).

A partir disso, a nanotecnologia, em especial as nanopartículas metálicas, surgem como uma viável e promissora alternativa e auxílio para esses antibióticos convencionais e, também para o uso em produtos desenvolvidos que tenham como objetivo tentar minimizar danos que uma bactéria ou fungo, em especial em ambientes hospitalares, possam causar à saúde de pacientes, uma vez que essas nanomoléculas conseguem interagir com diferentes componentes estruturais de bactérias e fungos, levando-os à morte celular e a uma dificuldade de desenvolverem resistência e à formação de biofilmes frente a essas NPs. Dentre essas nanoestruturas, é importante destacar as nanopartículas de prata (AgNPs), pois se trata de um excelente antimicrobiano devido a seu tamanho reduzido e sua grande área de superfície, lhe permitindo uma eficiente ação sobre diversos microrganismos, afetando suas estruturas e prejudicando importantes funções celulares (SCHRÖFEL et al., 2014). Além disso, as nanopartículas de prata podem ser sintetizadas biologicamente, pela conhecida síntese verde que é um processo de baixo custo, ecologicamente correto, com efeitos adversos reduzidos sobre os tecidos biológicos, com baixa toxicidade e sem a produção de resíduos tóxicos. As NPs podem ser produzidas a partir do extrato vegetal de diferentes partes de uma planta ou composto, sendo esse extrato o responsável por reduzir os íons metálicos a nanopartículas por meio de enzimas normalmente presentes em sua estrutura e essências para a manutenção de sua sobrevivência (AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013).

Portanto, é necessário e extremamente importante para a saúde pública e para a saúde dos pacientes que essas patologias advindas desses microrganismos multirresistentes sejam tratadas

de forma eficiente, evitando, assim, o prolongamento da doença e a possibilidade de um aumento na multirresistência bacteriana, em especial em ambientes hospitalares (ALMEIDA, 2017). Por esse motivo a biossíntese de AgNPs vem crescendo como possível solução a essas importantes questões, justificando o interesse no desenvolvimento desse trabalho de pesquisa como forma de compreender como ocorre a biossíntese das nanopartículas e a sua possível ação antimicrobiana e antifúngica frente a isolados de origem clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencial atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata, produzidas por síntese verde, frente a microrganismos de origem clínica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Testar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata sintetizadas a partir de extratos botânicos e de mel de abelhas frente aos isolados bacterianos de origem clínica *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* e ao isolado fúngico *Candida albicans*;

-Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das nanopartículas que apresentaram atividade antimicrobiana.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Nanotecnologia

A nanociência foi definida, em 1959, por Richard Feynman como o estudo e a manipulação de substâncias em sua escala atômica, molecular e macromolecular, nas quais suas propriedades são diferentes de quando estão em escala normal (BODNAR, 2018). A faixa de tamanho normalmente utilizada para caracterizar produtos de escala nanométrica é de 1 a 100 nm (BOVERHOF et al., 2015) e, além do tamanho formado, esses nanomateriais possuem composição química, forma e estrutura específicas que acabam por determinar características únicas a esses produtos (HULL, 2018).

Por possuírem especificidades importantes as substâncias nanomoleculares estão em expansão na contemporaneidade, uma vez que, sua manipulação, produção e suas possíveis utilizações, em diferentes áreas, são focos de pesquisa (SHARMA et al., 2019). Dentre os diferentes setores em que a nanotecnologia vem sendo aplicada, pode-se destacar o setor agrícola, que em busca de alternativas para minimizar a utilização de pesticidas, aumentar a produção agrícola e encaixar-se nos parâmetros de sustentabilidade está promovendo a pesquisa e o desenvolvimentos de novas ferramentas que envolvam a nanotecnologia (FORTUNATI et al., 2019). Outro setor que vem se destacando nesse quesito é a saúde, sendo essa tecnologia empregada em diferentes áreas, dentre elas pode-se citar a farmacologia e a biotecnologia que são responsáveis pela composição de fármacos e novos compostos viáveis para tratar patologias de origem clínica, como por exemplo, as nanopartículas (SBALQUEIRO et al., 2018).

Essa constante procura por novas tecnologias, em especial na área da saúde, se deve ao grande desafio que essa área e a saúde pública vem enfrentando com relação a multirresistência bacteriana e fúngica de cepas de origem clínica, uma vez que, esses microrganismo, passam por um processo evolutivo, devido a frequente utilização, pela sociedade, de antibióticos de amplo espectro, acabam por evoluir e tornarem-se multirresistentes a medicamentos que antes eram eficazes contra esses patógenos, diminuindo, por consequência, drasticamente as opções de tratamentos existentes (BODNAR, 2018). É dentro desse contexto que as nanopartículas metálica veem sendo amplamente estudadas e associadas a uma promissora e eficiente alternativa aos antibióticos convencionais ou então uma maneira de auxiliar esses medicamentos a se tornarem mais eficientes, uma vez que, essas nanomoléculas conseguem interagir com diferentes componentes celulares de um mesmo microrganismo, como por

exemplo, o DNA, enzimas, ribossomos e lisossomas, afetando a permeabilidade da membrana celular, causando estresse oxidativo, expressão gênica e ativação de diferentes proteínas e enzimas celulares, dificultando, por consequência que bactérias e fungos consigam desenvolver resistência perante essas NPs (SINGH et al., 2020).

3.2 Nanopartículas metálicas (sintéticas e biológicas)

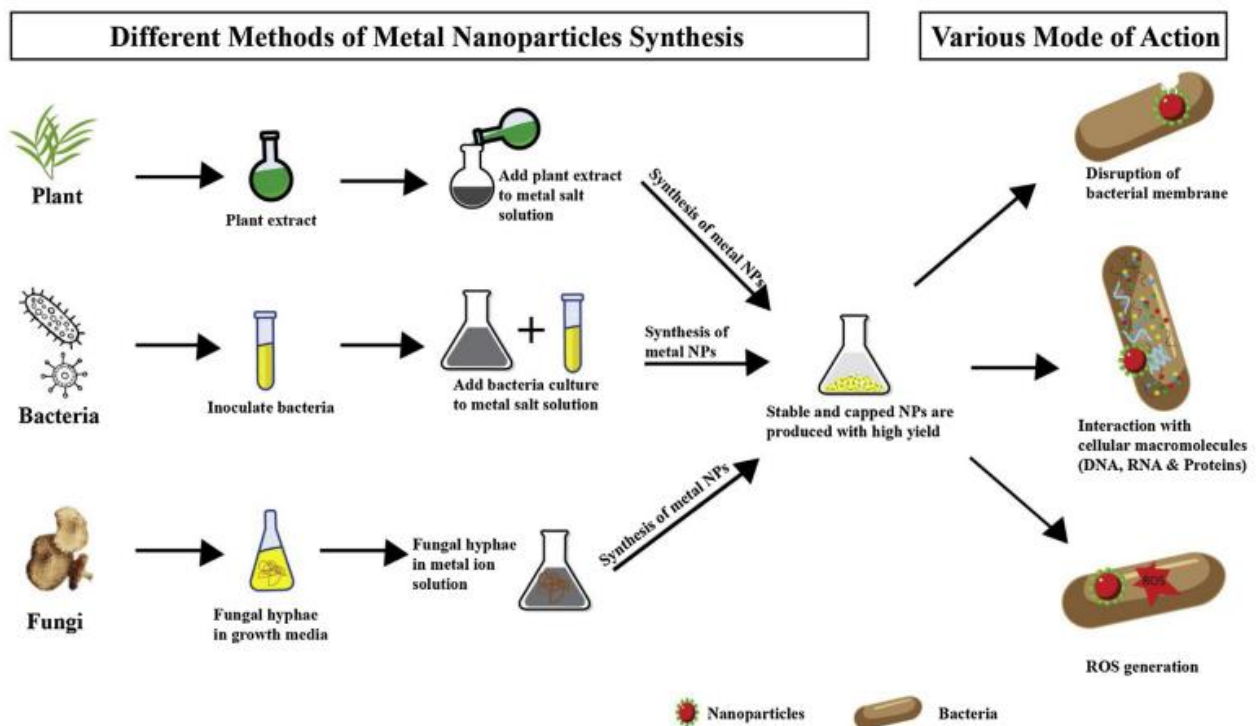
Dentre as alternativas estudadas e proporcionadas pela nanociência, as nanopartículas metálicas, em especial as formadas por prata e ouro, destacam-se como alternativas viáveis e promissoras, não apenas para a área farmacêutica, de alimentos e da medicina, mas também para áreas como a cosmética e eletroquímica, podendo, essas nanopartículas, serem sintetizadas a partir de diferentes métodos, destacando-se os métodos químicos e biológicos (JIRAVOVA et al., 2016).

A síntese química é o método mais utilizado para produzir nanopartículas metálicas, o qual consiste na redução química de sais (OTTONI et al., 2018) e necessita de produtos que atuem como estabilizantes e redutores, que, em sua maioria, acabam por serem tóxicos e caros (XUE et al., 2016). O método de síntese química de nanopartículas metálicas mais utilizado consiste em uma reação em meio aquoso, na qual como agente redutor, normalmente, utiliza-se citrato de sódio ou borohidreto, formando uma suspensão coloidal, no entanto, para que ocorra de maneira correta essa suspensão é necessário que ela seja estável, sendo essa uma das principais dificuldades encontradas nesse tipo de processo, já que essas partículas possuem uma alta energia superficial, favorecendo termodinamicamente a agregação das nanoestruturas, impedindo que ocorra a formação de nanomateriais estáveis. A fim de evitar que ocorra a agregação das nanoestruturas é necessário que agentes estabilizantes poliméricos, como por exemplo o PVP (polivinilpirrolidona), o PVA (álcool polivinílico) e o PAA (ácido poliacrílico) que possuem cadeias orgânicas longas, compostas por ânions (sítios básicos de Lewis), que os confere uma alta afinidade com as nanopartículas e um efeito estérico com as NP's, impedindo interações entre elas. (MELO JR et al., 2012).

Já a síntese biológica ou então chamada “síntese verde” consiste na síntese de nanopartículas a partir de um outro microrganismo biológico, podendo este ser uma planta, bactéria ou um fungo, o qual pode produzir as NP's de duas formas, a extracelular, que consiste na redução do material orgânico fora das células por meio de enzimas como a nitrato redutase ou com o transporte de elétrons por quinonas, e a intracelular, na qual esse material é reduzindo dentro da própria célula do microrganismo produtor (LATHA et al., 2015) (FIGURA 1). Esse

processo vem sendo cada vez mais utilizado pois consiste em uma abordagem que utiliza, em diferentes hospedeiros biológicos, uma reação moderada capaz de produzir nanopartículas de características estáveis e com dimensões pré-definidas, sem gerar resíduos (AJITHA; ASHOK KUMAR REDDY; SREEDHARA REDDY, 2015). Além da estabilidade, essas nanopartículas possuem uma boa compatibilidade biológica, ou seja, os efeitos adversos sobre tecidos biológicos são menores, reduzindo, portanto, a sua toxicidade (SCHRÖFEL et al., 2014), é um processo de baixo custo, não demanda de uma alta energia e não necessita da utilização de produtos tóxicos e/ou agressivos, sendo, por consequência, uma alternativa viável e ecologicamente correta se comparada a síntese química (SINGH et al., 2015).

Figura 1. Mecanismos de síntese verde de NPs através de diferentes organismos biológicos.



Fonte: Singh (2020)

As nanopartículas metálicas biossintetizadas podem variar em tamanho e forma, uma vez que, essas características estão diretamente ligadas ao microrganismo e aos parâmetros definidos durante seu processo de formação, dentre esses parâmetros, pode-se citar o pH do meio, a temperatura de estufa, a concentração metálica utilizada, a agitação e o tempo de exposição ao metal escolhido, os quais irão determinar como a nanopartícula irá se caracterizar, em especial o tamanho, em nanômetros (nm) que irá ter (ZHANG et al., 2016), como pode ser observado na tabela 1, que traz diferentes espécies formadoras de NPM biológicas e seus respectivos tamanhos.

Tabela 1: Microrganismos sintetizadores de NPs metálicas.

	Microrganismos	Tipo de NP	Tamanho (nm)	Referências
Fungos	<i>Penicillium oxalicum</i>	Ag	21	Sukla Bhattacharjee et al 2017
	<i>Arthroderma fulvum</i>	Ag	15,5	XUE et al., 2016
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ag	1 -20	Kalyani et al., 2018
	<i>Penicillium polonicum</i>	Ag	10-15	Neethu et al., 2018
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ag	5-25	Elamawi et al., 2018
	<i>Aspergillus niger</i>	Ag	20-40	Noguti., 2019
Bactérias	<i>Bacillus sp.</i>	Ag	42 – 92	Das et al., 2013
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Ag	43– 143	Najitha et al., 2014
	<i>Acinetobacter sp.</i>	Ag	15 – 50	Zaki et al., 2011
	<i>Bacillus megaterium</i>	Ag	15 – 50	Zaki et al., 2011
	<i>Escherichia coli</i>	Ag	15 – 50	Zaki et al., 2011
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Ag	15 – 50	Zaki et al., 2011
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ag	5 – 32	Zaki et al., 2011
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ag	160-180	Shahverdi et al., 2007
	<i>Morganella sp.</i>	Ag	15 – 25	Nanda; Saravanan, 2009
	<i>Pseudoduganella ebúrnea</i>	Ag	8 – 24	Parikh et al., 2008
<i>Sphingobium sp.</i>	Ag	7 – 22	Huq., 2020	
Plantas	<i>Eriobotrya japônica</i>	Ag	46	Rao, 2017
	<i>Justicia adhatoda L</i>	Ag	5 – 50	Bose, 2015
	<i>Ananas. comosus</i>	Ag	12,4	Emeka et al., 2014
	<i>Melissa. de fi cinalis</i>	Ag	12	Baltazae et al., 2017

Essas NPs metálicas normalmente possuem formato esférico e normalmente, são estruturadas em camadas distintas, com funções específicas, sendo elas a camada funcional central (é comum apresentar comportamento óptico e magnético como, por exemplo a fluorescência), a camada protetoras (responsável por preservar tanto a camada funcional de possíveis danos químicos, quanto a célula de possíveis propriedades tóxicas que possam estar presente e constituir a camada central), e a camada exterior (responsável pela biocompatibilidade a outros componentes celulares, a solubilidade em água e do reconhecimento específico). É nessa camada superficial que os grupamentos bioquímicos estão agrupados, podendo, assim, permitir que ocorra ligação entre a nanopartícula e outras moléculas e/ou estruturas celulares, como por exemplo, de fungos e bactérias (ALMEIDA, 2017). Quando essa NP é formada, sendo seu tamanho em escala nanométrica, boa parte de seus átomos irão

se dispor em volta de sua camada exterior, sendo a quantidade de átomos presentes em seu interior bem menor, isso ocorre, pois quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior a quantidade de átomos em sua superfície externa, quando comparada a outras nanopartículas maiores, é por isso que as reações envolvendo essas partículas ocorre em sua superfície, indicando que, nanopartículas menores são mais reativas. No caso das AgNPs (nanopartículas de prata), elas possuem tendência a terem tamanho menor, fazendo com que estejam mais propensas a interagir com outras estruturas biológicas e, por consequência, serem mais efetivas em suas ações, em especial como antimicrobiana e antifúngica (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010).

3.2.1 Nanopartículas sintetizadas por plantas e outros produtos naturais

As plantas são outra importante opção para a síntese ecologicamente amigável de nanopartículas metálicas, uma vez que, esses organismos vivos conseguem utilizar metabólitos que normalmente usam para sua sobrevivência como redutores de íons metálicos para as rotas de síntese verde e como estabilizantes para as NPMs formadas (AKHTAR; PANWAR; YUN, 2013). Diferentes partes do vegetal como as folhas, sementes, cascas, raízes e extratos podem produzir nanopartículas com diferentes características, uma vez que, o extrato de diferente parte da planta escolhida pode gerar nanopartículas diferentes e com características distintas, sendo, devido a isso, nanopartículas que foram sintetizadas a partir de uma mesma planta, mas de extratos de locais diferentes, como por exemplo extrato da folha e extrato da casca de uma mesma planta, devem ser consideradas como NPMs diferentes, com formas e tamanhos distintos (DAS; DAS; VELUSAMY, 2013).

Dentre as diferentes partes de uma mesma planta que podem servir como agente redutores de íons metálicos, como as folhas, a casca, as flores e sementes, uma coisa há em comum sobre a formação de nanopartículas derivadas desses extratos, a concentração de extrato e de íons metálicos presentes, o tempo de reação, a temperatura e o pH influenciam diretamente na forma e no tamanho da nanopartícula formada, influenciando, por consequência, na sua ação frente a diferentes microrganismos (MITTAL; KALER; BANERJEE, 2012).

Outro composto, já descrito na literatura por Balasooriya et al., 2015 e Junior et al., 2017, utilizado para a síntese de nanopartículas de prata é o mel, que é um fluido viscoso e doce produzido por abelhas a partir do néctar de flores, que é constituído por açúcares, como a glicose e a frutose, de água e por mais alguns compostos como vitaminas e enzimas (SOUSA et al., 2017). São esses compostos fenólicos e açúcares presentes na composição do mel que são os

responsáveis por reduzir os íons metálicos Ag^+ , transformando-os em nanopartículas de prata, além é claro de servirem como agentes estabilizantes para essas AgNPs, evitando que elas se agrupem (OSKUEE et al., 2016).

O uso do glicerol na biossíntese de nanopartículas deve-se ao fato de que atua como um agente redutor flexível, eco-friendly (biocompatível e biodegradável) e de baixo custo (NALAWADE et al., 2013).

O glicerol (1,2,3-propanotriol), também conhecido como glicerina (na sua forma impura), é um composto derivado da produção do biodiesel que é utilizado como fonte de carbono em processos biotecnológicos, como aditivo combustível, lubrificante e em diversos tipos de indústrias (farmacêutica, alimentícia, cosméticos etc.) (CAMPOS et al. 2017).

3.2.2 Nanopartículas sintetizadas por microrganismos

As bactérias são uma ótima opção de microrganismos utilizados para biossintetizar nanopartículas metálicas, as quais utilizam métodos de redução do íon metálico que pode ocorrer intracelular, caso em que os íons sofrem redução no meio citoplasmático, ou então extracelular, através da ação de metabólitos secretados ou por moléculas que já estão localizadas na superfície da bactéria. Existem estudos que mostram que algumas bactérias, como as bactérias magnetotáticas (BMT), possuem em seu interior, de forma natural, nanoestruturas chamadas de magnetossomos, que são formadas por óxido de ferro (Fe_3O_4) e sulfeto de ferro (Fe_3S_4) (SAWOSZ et al., 2010). Além dessas bactérias existe a possibilidade de produzir NPMs a partir de bactérias que conseguem reduzir, naturalmente, íons metálicos que entram em contato com suas enzimas, sendo importante destacar a nitrato redutase, enzima mais utilizadas nesse tipo de reação, a qual é importante para o ciclo do nitrogênio, onde converte nitrato em nitrito e o elétron resultante é transferido para o íon de prata, sendo esse reduzido à AgNPs (MANIKPRABHU; LINGAPPA, 2013). De acordo com estudos já feitos (Tabela 1), algumas bactérias aparecem como alternativas promissoras para a biossíntese de nanopartículas de prata, como exemplo os pertencentes ao gênero *Bacillus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*.

Os fungos também se destacam como ótimas opções para a biossíntese de AgNPs, uma vez que, diversos componentes celulares presentes normalmente em suas estruturas e para as suas funções metabólicas, como proteínas, produtores de enzimas que possuem potencial de redução, intra ou extracelular, dos íons metálicos para formação de nanopartículas e sua estabilização (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010); como exemplo de espécies de fungos

que aparecem na literatura como formadores de AgNPs, podemos citar *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* (KAMINSKYJ et al., 2008).

3.3 Nanopartículas de prata

A prata é um composto que já vinha sendo utilizada e comercializada para uso tópico, ao longo da história, por sua eficiência em tratamentos contra diferentes patologias, como úlceras, infecções, queimaduras e feridas (SINGH et al., 2015), sendo reconhecida por sua excelente ação antibiótica (BALAKUMARAN et al., 2016), uma vez que seu uso como agente antimicrobiano é antigo, podendo ser exemplificada com a utilização de vasos feitos de prata para armazenar água e vinho, evitando possíveis contaminações ou então durante a idade moderna (século XVII) em que a prata, na forma de sal de nitrato, era utilizada para tratar feridas (KLASEN, 2000).

Quando se fala em síntese de AgNPs, diversos compostos orgânicos podem ser citados como seus sintetizastes, como por exemplo bactérias, fungos, leveduras ou, então, extratos vegetais. Esses compostos orgânicos são capazes de produzir nanopartículas a partir de seu próprio metabolismo, uma vez que, os agentes redutores e estabilizantes necessários para a formação e estabilização dessas nanomoléculas são produzidos pelo próprio metabolismo desse micróbio (GADE et al., 2010). Essa síntese pode ocorrer intra ou extra celular, sendo o mecanismo de biossíntese intracelular um processo que envolve o transporte de íons no interior da célula produtora, ocorrendo uma interação de íons de carga positiva provenientes da prata (Ag^+) com a carga negativa da superfície interior da parede celular, e são as enzimas localizadas na parede celular que irão reduzir esses íons de prata para Ag^0 , formando nanopartículas que, posteriormente, irão ser transportadas para o meio extracelular (HULKOTI; TARANATH, 2014). Já no meio extracelular essa síntese ocorre a partir de interações entre íons metálicos da prata com moléculas que são liberadas pelas células ou com proteínas presentes na membrana celular. Esses extratos orgânicos produzidos por esses organismos, como as enzimas/proteínas, aminoácidos, polissacarídeos e vitaminas, são os responsáveis por reduzir os íons metálicos e por estabilizar as nanoestruturas formadas, no caso da biossíntese de nanopartícula de prata a enzima nitrato redutase é a mais presente nas reações, essa enzima é importante para o ciclo do nitrogênio pois é a responsável pela conversão de nitrato em nitrito e, no caso da formação de nanomoléculas de prata, na maioria dos microrganismos, é a responsável por reduzir o íon metálico. Isso ocorre porque quando o nitrato é reduzido a nitrito, um dos elétrons da reação é

transferido para os íons de prata presentes no microrganismo, bioreduzindo, por consequência, a prata Ag^+ em Ag^0 e formando as AgNPs (DURÁN et al., 2011).

3.3.1 Utilização das nanopartículas de prata

O interesse na utilização da prata associada a nanotecnologia é um recurso que vem crescendo e ao longo dos últimos anos como uma eficiente e importante ferramenta para a saúde e a biotecnologia, torna a nanopartícula de prata uma alternativa interessante e promissora de nano antibiótico se comparado aos antibióticos comerciais comuns, uma vez que, a crescente e preocupante resistência de bactérias clínicas frente a boa parte desses medicamentos os tornaram ineficientes para diferentes patologias. A partir disso, as nanopartículas de prata (AgNP), em especial as sintetizadas a partir de métodos verdes, tendo ocorrido em 1984 o primeiro relato de biossíntese de AgNPs a partir de uma bactéria isolada de minas de prata, a *Pseudomonas stutzeri* AG259 (HAEFELI; FRANKLIN; HARDY, 1984), são descritas, estudadas e utilizadas como os novos e promissores agentes biotecnológicos de nanoescala com uma vasta aplicação em diferentes âmbitos, desde o industrial ao comercial e clínico (SILVA 2019). Dentre exemplos de aplicação em área clínica, pode-se citar estudos feitos por Rahisuddin et al. (2015) que evidenciaram a ação antimicrobiana de nanopartículas de prata contra cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (MTCC3160) e *Escherichia coli* (MTCC405) e de espécies fúngicas de *Candida*, como a *Candida albicans* (ATCC90028), *Candida glabrata* (ATCC90030) e *Candida tropicalis*, também a sua utilização em produtos de higiene, curativos, dispositivos médicos e sua possível atividade, além de antibacteriana, antifúngica e antiviral (ALSALHI et al., 2016).

A resistência bacterina aos antibióticos é um preocupante problema de saúde pública em diversos países, em especial no Brasil, uma vez que as bactérias antes suscetíveis a determinados antibióticos, hoje encontram-se resistentes. A resistência bacteriana aos antibióticos é algo comum, resultante de uma seleção e adaptação natural do microrganismo aos antibióticos comumente utilizados contra ela, no entanto, o grande problema é que essa adaptação e essa resistência estão em um ritmo acelerado, uma vez que, nas últimas décadas o uso indiscriminado desses medicamentos, fez com que amentasse a resistência de bactérias e fungos, em especial de origem clínica, a esses medicamentos, sendo isso um fator determinante para o aumento de gastos com os custos de saúde da população e com o aumento da morbidade e mortalidade, já que o tratamento eficaz contra diversas patologias causadas por bactérias resistentes é mais prolongado, podendo causar hospitalização prolongada desses pacientes,

acarretando um aumento de gastos, a diminuição de leitos disponíveis, o prolongamento de doenças e um problema sério de saúde pública (MANAGEIRO et al., 2012).

O uso inadequado de antibióticos é um problema de muitas causas, podendo ser elas, a prescrição inadequada, o excesso de medicamentos, antes mesmo de exames comprobatórios ficarem prontos, a não adesão ou a utilização inadequada pelos pacientes e a automedicação (HAWKEY, 2008). O processo de resistência bacteriana aos antibióticos é natural e evolutivo, no entanto, vem crescendo progressivamente nos últimos anos, essa evolução ocorre a partir de quatro mecanismos diferentes, sendo eles a modificação ou destruição enzimática do antibiótico (destruição do antibiótico por enzimas presentes nas bactérias, como por exemplo, o B-lactâmicos que são destruídos por enzimas B-lactamases), redução da permeabilidade celular ao antibiótico (evitando sua acumulação intracelular, como exemplo, pode-se citar *Pseudomonas aeruginosa* que são resistentes a imipenem), sistemas de efluxos hiperexpressos (corresponde a excreção de substâncias tóxicas) e a alteração, bloqueio e proteção das células alvo dos antibióticos (ocorre a produção de células alternativas para se tornarem alvo dos antibióticos, enquanto as moléculas alvo reais continuam a se reproduzir) (COGLIANI; GOOSSENS; GREKO, 2011). Considerando esse processo evolutivo das bactérias frente aos medicamentos, podemos destacar que nas bactérias Gram-positivas, o gênero *Enterococcus* e a espécie *Staphylococcus aureus* são as mais susceptíveis a desenvolverem resistência, sendo importante enfatizar o *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), que é extremamente preocupante e presente em todo o mundo, em especial em ambiente hospitalar. Quanto as bactérias Gram-negativas, é importante destacar a espécie *Escherichia coli* e o gênero *Klebsiella* spp., sendo um dos principais mecanismos utilizados por essas bactérias a destruição enzimática de antibióticos (como por exemplo a produção de enzimas B-lactamases) e que a transferência dessa resistência entre bactérias ocorre através de plasmídeos de resistência (LOUREIRO et al., 2016).

No intuito de solucionar o problema da multirresistência bacterina e fúngica, a nanop prata está se tornando um dos nanomateriais mais estudados e pesquisados uma vez que estudos mostram que, devido ao seu tamanho reduzido e sua grande área de superfície, as AgNPs possuem uma promissora e eficiente ação sobre microrganismo, afetando suas estruturas e prejudicando algumas importantes funções da membrana celular como a respiração e a permeabilidade (ALLAHVERDIYEV et al., 2013). Além disso, essas partículas possuem atividade de amplo espectro contra diferentes patógenos e uma probabilidade muito menor de induzir uma resistência microbiana, se compara as drogas atuais. Essas características fomentam o desenvolvimento, não só de nanoantibióticos a base de prata, mas também outros

tipos de materiais e para diferentes funções, como por exemplo, em estações de tratamento de água, em equipamentos e utensílios hospitalares, como conservantes de alimentos em embalagens e para tratar infecções e queimaduras hospitalares (GUZMAN; DILLE; GODET, 2012).

Os íons de prata, componentes fundamentais das AgNPs, são capazes de se ligar a importantes componentes das células de fungos e bactérias que estão em contato, causando sua morte celular, que pode ser ocasionada por diferentes mecanismos utilizados pelas nanopartículas, como por exemplo, a sua ação na parede celular (as AgNPs conseguem se fixar na parede celular e penetrar, causando assim uma mudança na estrutura e permeabilidade dessa parede, levando a morte celular), a formação de radicais livres (quando em contato com as células bacterianas, ocorre formação de radicais livres, os quais são responsáveis por tornar a parede dessas organismos porosa, o que, por consequência, induz a sua morte celular) e a deformação da estrutura do DNA bacteriano (as NPs agem sobre o DNA da bactéria, o qual é composto por enxofre e fósforo e não se encontra condensado por não possuir o complexo de proteínas de condensação e compactação, as histonas, ligando-se a essas moléculas de enxofre e fósforo, promovendo problemas na replicação desse DNA) (THOMAS et al., 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do estudo, amostras e microrganismos testados

Este estudo foi desenvolvido no Centro de Excelência em Produtos e Processos Oleoquímicos e Biotecnológicos – CEPPOB do Parque Regional Científico e Tecnológico da Universidade de Santa Cruz do Sul (TecnoUnisc), localizado no Bloco 55 e no laboratório de Microbiologia, bloco 20, da UNISC.

O estudo foi feito em parceria com o grupo de pesquisa da professora Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o qual produziu e forneceu as nanopartículas de prata para os testes de atividade antimicrobiana. As nanopartículas testadas e seus respectivos números para identificação foram as seguintes: AgNP de rabanete pH 6,8 (1), AgNP da casca do rabanete pH 6,8 (2), AgNP de rabanete com pH de 11,4 (3), AgNP de mel com pH de 3,0 (4), AgNP de mel com pH de 7,0 (5), AgNP de mel com pH de 10 (6), AgNP de glicerol (7) e AgNP de aipim (8). Todas as oito nanopartículas foram testadas, pelo método de ágar difusão em poços, para verificar a possível atividade antimicrobiana e antifúngica dos isolados bacterianos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella sp.* e da levedura *Candida albicans*. As nanopartículas foram sintetizadas a partir do extrato aquoso do rabanete e da sua casca, do aipim, glicerol e da diluição do mel, em síntese assistida por irradiação micro-ondas.

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

O espectro de atividade antimicrobiana das AgNPs foi determinado pela técnica de ágar difusão em poços, conforme Perez et al (1990) com modificações. Placas de ágar Mueller-Hinton (MH-Himedia®) foram preparadas conforme as instruções do fabricante. O volume de 25 mL de ágar foi distribuído nas placas de Petri para garantir uma profundidade uniforme.

4.2.1 Padronização da densidade do inóculo

As bactérias e a levedura testadas no estudo foram ativadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C, por 24 h. Em seguida, as suspensões de microrganismos foram centrifugadas a 5000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas por duas vezes com solução salina 0,85% m/v. O inóculo foi preparado fazendo-se suspensão direta do *pellet* obtido, em solução salina. A absorbância foi ajustada para 0,100 a 625 nm utilizando espectrofotômetro

(uv-vis 1800), o que corresponde ao padrão McFarland 0,5, que contém, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹. As suspensões microbianas foram semeadas com o uso de um swab estéril na superfície do ágar MH.

4.2.2 Inoculação das placas e leitura dos resultados

No meio de cultura foram perfurados poços de 5 mm de diâmetro com o auxílio de molde estéril. Após, foram inoculados 30 µL das AgNP em cada poço. As placas foram mantidas *overnight* sob refrigeração (7 °C a 10 °C), por 24 horas, para difusão das nanopartículas e, em seguida, incubadas a 35 °C por 24 h.

Após o período de incubação os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos (em milímetros) com o auxílio de um paquímetro. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Foram utilizados como controle negativo a água destilada estéril e como controles positivos o AgNO₃ e os antibióticos gentamicina para *Pseudomonas aeruginosa*, oxacilina para *Staphylococcus aureus*, sulfametoxazol para *Proteus mirabilis*, levofloxacina para *Escherichia coli*, Ciprofloxacino para *Salmonella* sp. e o antifúngico sulfazotrim para a levedura *Candida albicans*.

4.3 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi feita utilizando o método de microdiluição em caldo, segundo as metodologias propostas por Soberón et al., (2007) e Ellof (1998), com algumas modificações: os ensaios foram realizados em caldo Mueller Hinton para as bactérias e caldo Sabouraud para a levedura.

Primeiramente, para determinar a CIM das nanopartículas sobre as bactérias 200µL de caldo Mueller Hinton (MH) foram distribuídos em cada poço de placas de microtítulos de 96 poços. Para a CIM da levedura o meio utilizado foi caldo Sabouraud. Uma alíquota de 200µL da solução coloidal de cada nanopartícula de prata foi adicionada aos primeiros poços da primeira coluna da placa, homogeneizada e em seguida transferida para o poço seguinte, e assim sucessivamente obtendo-se as diluições de 1:1 até 1:512 µg/mL.

A concentração final de cada microrganismo-teste foi ajustada para 1×10^8 UFC mL⁻¹ a partir da suspensão direta do *pellet* obtido em solução salina, em um volume final de 100 µL e 10 µL foram adicionados aos poços da placa que continham as diluições das AgNPs. Os controles de crescimento microbiano foram feitos substituindo as nanopartículas pelo mesmo

volume de meio de cultura (caldos MH e Sabouraud). Controles de esterilidade foram preparados usando apenas os caldos.

As placas foram seladas, homogeneizadas e incubadas a 35°C por 24 h. O crescimento microbiano foi indicado pela turbidez do meio nos poços da placa. A ausência de crescimento bacteriano foi interpretada como atividade antimicrobiana. O valor da CIM foi considerado como a menor concentração da amostra capaz de causar inibição total do crescimento microbiano.

4.4 Divulgação dos dados da pesquisa

Os resultados deste projeto foram compilados na forma de um artigo científico a ser submetido a um periódico com classificação Qualis A1 a A4 da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

5 RESULTADOS

Os resultados e a discussão deste estudo serão apresentados na forma de um artigo científico intitulado “**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE VERDE**” a ser submetido para publicação na revista JOURNAL OF BIOMEDICAL NANOTECHNOLOGY com classificação Qualis A2 em Biotecnologia.

6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo mostrou, por conseguinte que as nanopartículas sintetizadas através de um método verde utilizando extratos de rabanete, aipim, glicerol e mel, conseguiram, em sua maioria, apresentar atividade antimicrobiana e antifúngica frente as cepas de bactérias e fungos de origem clínicas que foram selecionados, mostrando que a utilização de extratos para a síntese dessas nanopartículas é eficiente e pode ser mais explorada a partir de novas pesquisas e testes. Ademais, vale ressaltar que a utilização das AgNPs como antimicrobianos, em especial na área da saúde apresentam nas literaturas resultados promissores, em especial para aquelas que utilizam da síntese verde para serem originadas, no entanto algumas dúvidas ainda não foram esclarecidas com relação a outras possíveis ações dessa nanotecnologia no organismo humano e nem quais nanopartículas seriam mais eficientes contra determinados microrganismo, é por isso, que é necessário que mais pesquisas e estudos sejam feitos nesse amplo campo da nanotecnologia, uma vez que, é uma tecnologia promissora para futuros tratamentos na tentativa de conter a multirresistência bacteriana e fúngica cada vez mais presente na sociedade.

REFERÊNCIAS

AJITHA, B.; ASHOK KUMAR REDDY, Y.; SREEDHARA REDDY, P. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Lantana camara* leaf extract. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 373–381, 2015.

AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y. S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 1, n. 6, p. 591–602, 2013.

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Investigation of antileishmanial activities of Tio₂@Ag nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 55–63, 2013.

ALMEIDA, É. S. Biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata por *Fusarium oxysporum*. p. 149, 2017.

ALSALHI, M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Pimpinella anisum* seeds: antimicrobial activity and cytotoxicity on human neonatal skin stromal cells and colon cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 11, p. 4439–4449, set. 2016.

ALVES MELO JR, M.; SAMUEL SOARES SANTOS, L.; DO CARMO GONÇALVES ANA FLÁVIA NOGUEIRA, M. **Preparação De Nanopartículas De Prata E Ouro: Um Método Simples Para A Introdução Da Nanociência Em Laboratório De EnsinoQuim. Nova**. [s.l: s.n.].

ANTUNES, F. et al. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 20–26, 2013.

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

BODNAR, G. C. **Giovana carolina bodnar atividade antibacteriana de nanopartículas de prata associadas ao eugenol**. [s.l: s.n.].

BOSE, D.; CHATTERJEE, S. Antibacterial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using *Vasaka* (*Justicia adhatoda* L.) Leaf Extract. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 163–167, 2015.

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

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation

of nanoparticle in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 580–588, 2010.

COGLIANI, C.; GOOSSENS, H.; GREKO, C. Restricting antimicrobial use in food animals: Lessons from Europe. **Microbe**, v. 6, n. 6, p. 274–279, 2011.

DA SILVA, W. J. et al. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. **Brazilian Dental Journal**, v. 19, n. 4, p. 364–369, 2008.

DAS, J.; DAS, M. P.; VELUSAMY, P. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy *Sesbania grandiflora* leaf extract mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy**, v. 104, p. 265–270, 2013.

DE OLIVEIRA, J. F. A.; CAPELETTI, L. B.; CARDOSO, M. B. Are antibiotic-functionalized nanoparticles a promising tool in antimicrobial therapies? **Nanomedicine**, v. 12, n. 23, p. 2587–2590, 2017.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 5, p. 1609–1624, 2011.

FORTUNATI, E.; MAZZAGLIA, A.; BALESTRA, G. M. Sustainable control strategies for plant protection and food packaging sectors by natural substances and novel nanotechnological approaches. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 986–1000, 2019.

GADE, A. et al. Mycogenic metal nanoparticles: Progress and applications. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 5, p. 593–600, 2010.

GHIUȚĂ, I. et al. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles, biosynthesized using *Bacillus* species. **Applied Surface Science**, v. 438, p. 66–73, 2018.

GOMES, D. M. D. et al. Síntese verde de nanopartículas de prata intermediada por fungo anamórfico e eficácia antibacteriana e antifúngica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais**, v. 15, n. 2, 2020.

GUZMAN, M.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 37–45, 2012.

HAEFELI, C.; FRANKLIN, C.; HARDY, K. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. **Journal of Bacteriology**, v. 158, n. 1, p. 389–392, 1984.

HAWKEY, P. M. The growing burden of antimicrobial resistance. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62 Suppl 1, p. 1–9, 2008.

HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 474–483, 2014.

HULL, M. S. **Multidimensional impacts of nanotechnology on public health**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

JIRAVOVA, J. et al. The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 96, p. 50–61, 2016.

KALYANI, P. et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles By Using *Aspergillus Fumigatus* and Their Antibacterial Activity. **International Journal of Current Research in Life Sciences**, v. 7, n. 01, p. 788–791, 2018.

KAMINSKYJ, S. et al. High spatial resolution analysis of fungal cell biochemistry - Bridging the analytical gap using synchrotron FTIR spectromicroscopy. **FEMS Microbiology Letters**, v. 284, n. 1, p. 1–8, 2008.

KLASEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, v. 26, n. 2, p. 131–138, 2000.

LATHA, M. et al. Biocatalytic and antibacterial visualization of green synthesized silver nanoparticles using *Hemidesmus indicus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, n. March, p. 43–49, 2015.

LOUREIRO, R. J. et al. Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Revista Portuguesa de Saude Publica**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.

MANAGEIRO, V. et al. Genetic diversity and clonal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Portugal and the dissemination of ST118. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 5, p. 398–403, 2012.

MANIKPRABHU, D.; LINGAPPA, K. Microwave assisted rapid bio-based synthesis of gold nanorods using pigment produced by *Streptomyces coelicolor* klmp33. **Acta Metallurgica Sinica (English Letters)**, v. 26, n. 5, p. 613–617, 2013.

MITTAL, A. K.; KALER, A.; BANERJEE, U. C. Free radical scavenging and antioxidant activity of silver nanoparticles synthesized from flower extract of *Rhododendron dauricum*. **Nano Biomedicine and Engineering**, v. 4, n. 3, p. 118–124, 2012.

NEVES, P. R. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: An endemic problem in Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409–420, 2011.

OSKUEE, R. K. et al. Honey-based and ultrasonic-assisted synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activities. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 8, p. 7989–7993, 2016.

OTTONI, C. A. et al. Glycerol and ethanol oxidation in alkaline medium using PtCu/C electrocatalysts. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 13, n. 2, p. 1893–1904, 2018.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. [s.l: s.n.].

ROBLES-MARTÍNEZ, M. et al. Mentha piperita as a natural support for silver nanoparticles: A new Anti- Candida albicans treatment. **Colloids and Interface Science Communications**, v. 35, n. February, p. 100253, 2020.

SAWOSZ, E. et al. Visualization of gold and platinum nanoparticles interacting with Salmonella Enteritidis and Listeria monocytogenes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 631–637, 2010.

SBALQUEIRO, G. et al. Uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 10, p. 242–252, 2018.

SCHACHT, V. J. et al. Effects of silver nanoparticles on microbial growth dynamics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 1, p. 25–35, 2013.

SCHRÖFEL, A. et al. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - A review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4023–4042, 2014.

SHARMA, V. K. et al. Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under environmentally relevant conditions: A review. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 1042–1051, 2019.

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

SINGH, R. et al. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11, p. 4579–4593, 2015.

SOLOMON, S. D. et al. Synthesis and study of silver nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322–325, 2007.

SOUSA, G. et al. Avaliação da Capacidade Antimicrobiana de Nanopartículas de Prata Sintetizadas com Mel de Abelha Evaluation of the Antimicrobial Capacity of Silver Nanoparticles Synthesized with Bee Honey. p. 305–309, 2017.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010.

THOMAS, R. et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by marine *Ochrobactrum* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1221–1227, dez. 2014.

XUE, B. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 1899–1906, 2016.

ZHANG, X. F. et al. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 2016.

ANEXOS

ANEXO A – Normas de formatação para a revista *JOURNAL OF BIOMEDICAL NANOTECHNOLOGY*

Author Prof. Dr. Murugan Ramalingam

Authors should submit a **list of FIVE (5) potential referees** accompanied with their complete mailing address, telephone, fax and email address, who may be contacted for reviewing the manuscript though refereeing, is done by anonymous reviewers. In order to ensure that the highest quality manuscripts are published, reviewing process is carried out in two stages. A mandatory editor's approval is required in the first stage for the manuscripts before it is submitted to the peer review process in the second stage.

MANUSCRIPT-PROCESSING FEES

All new manuscripts submitted to this journal after 12am Pacific Time on **August 1, 2014** will be subjected to a Manuscript-Processing Fees. Research article publishing is not without occurring costs and the costs have been steadily increasing. To defray part of the publication cost, the journal will charge manuscript-processing fees, to be paid by the authors or their affiliated research institutions. The publication fee will be used to defray part of the occurring expenses associated with manuscript processing, editorial work flow, typesetting, proofreading, printing, online-hosting, and archiving. Authors or their affiliated research institutions are required to pay **US\$ 1280** per article from all Countries. **All color figures/illustrations in a manuscript will be published FREE OF CHARGES.** When submitting a manuscript through online, it will be processed with an understanding that the corresponding authors fully agree to pay all manuscript-processing fees upon acceptance. The author who submits the manuscript to the journal is fully responsible for the manuscript-processing fees. Accepted peer-reviewed manuscripts will not be processed and forwarded to production until all fees are paid in full to the publisher. Publisher will issue an invoice of manuscript-processing fees after a manuscript has been accepted for publication. Corresponding author will be asked to submit a signed Copyright Transfer Agreement (CTA) along with manuscript processing fees.

ENGLISH LANGUAGE AND COPYEDITING

It is sole responsibility of the authors to submit their final accepted manuscript in correct English language, free of all typographical/grammatical errors to meet high publishing

standards. All authors from non-English language countries should get their final accepted manuscripts copyedited by professional copyediting services at author's own expense. All copyediting services are fully paid for and arranged by the authors. Manuscripts will be processed for publication on a condition that authors submit a certificate of proof along with their final accepted manuscript. A list of professional copyediting editing services can be found below.

1. American Journal Experts (www.aje.com)
2. Charlesworth Author Services China Phone: +86(10) 87095751,
Email: info@cwauthors.com.cn
3. BioMed Proofreading LLC (www.biomedproofreading.com/index.htm)
4. Editage (www.editage.com)
5. International Science Editing Ltd. (www.internationalscienceediting.com)
6. ScienceDocs Inc. (www.sciencedocs.com)
7. SciTechEdit International (www.scitechedit.com)
8. Stallard Scientific Editing (www.stallardediting.com)
9. Textcheck (www.textcheck.com)
10. Write Science Right (www.writescienceright.com/index.html)

PDF FILES AND HARDCOPIES:

Authors who submitted their manuscripts after 12:00am Pacific Time on August 1, 2014 and have paid manuscript-processing fees will receive pdf files of their published articles. If authors require a hardcopy of the journal issue having their research articles then authors may also purchase hardcopies of the journal issue or subscribe to the journal by contacting the publisher. No free hardcopies of journal issue and/or research article are provided. If authors require a hardcopy of the journal issue having their research article then authors should pay additional \$850 to the publisher to recover the costs of all color illustrations in a print edition and shipping.

OPEN ACCESS: After the manuscript passed the peer-review/editorial process, the Publisher would allow open access participation in Author ChoiceTM with an advanced payment of \$3000

fee where author may select open access publication of their published articles. Open access publication of articles will be allowed only after receiving a full payment.

All open-access articles are permitted with a mutual understanding between authors and Publisher that Journal is able to attribute to authors of published articles a “CC-BY-Non-Commerical (NC)-No-Derivatives (ND)” license where users can download and distribute the work without any alterations of any kind, after giving appropriate credit to original source, but material cannot be used for “any kind of commercial purpose” whatsoever. Neither modifications to the work nor commercial uses of the work are permitted

COMMUNICATIONS: Highest priority will be given to the communications reporting important new scientific and technological findings. Rapid publication is provided for concise and up-to-date reports. These articles should not exceed three-four published pages. No section headings should be used for these short communications.

RESEARCH ARTICLES: Full length papers that report original research work on new ideas in the fields of biomedical nanotechnology.

REVIEWS: The state-of-the-art review articles with author's short biography and photo will be published. Reviews are limited to a maximum length of 30 journal pages. It is author's responsibility to obtain written copyright permissions to reproduce any copyright materials from other sources. Authors are advised to cite proper references in figure/tables captions of all previously published figures/tables/illustrations including their own published work and obtain copyright permissions from appropriate publishers and authors.

TYPING: All manuscripts must be in English, typed double-spaced on one side of the page throughout (including footnotes, references, tables, legends) on 8.5" x 11" or A4 white paper

INTRODUCTORY MATERIAL: The first page of the manuscript should have a concise title limited to about 15 words and the names of all authors, complete mailing address for correspondence, telephone, fax numbers and email address. Please indicate with an asterisk (*) the author to whom correspondence regarding the manuscript should be directed. leaving at least 1 inch left hand margin.

ABSTRACT: All manuscripts must contain an informative 100 to 250 words abstract explaining the essential contents of the work, key ideas and results.

KEYWORDS: A list of 5-10 "Keywords" should be included with the abstract.

MAIN AUTHOR'S BIOGRAPHICAL SKETCH (FOR REVIEW ARTICLES ONLY): JBN publishes author's biographical sketch for the review articles.

FIGURES: It is very important to supply high quality figures in a form suitable for reproduction. All figures, tables, illustrations, photographs should be prepared in such a way that they could be printed in a single column size with a width of 3 1/4 inches or 8.25 cm. Only if absolutely necessary should figures/tables/photos occupy double columns. Each figure must be referred to in the text and will be printed in black and white unless otherwise instructed by the authors. Each Figure should be submitted on a separate sheet and marked with the name of the author, title of manuscript and figure number. All formulae and figures should be carefully drafted and never drawn freehand. Use same font and size for all figure legends. High quality original figures and glossy prints of all photographs are required. Photocopies of the figures and photographs are not acceptable. Use 12 font for numbering and 14 font for legends.

FREE COLOR PRINTING: Color illustrations are most welcome by the journal as they are effective in conveying complex graphs and photographs. Free color printing at the Editor-in-Chief's discretion, will provide an opportunity to publish color figures/illustrations in print at NO COST to the authors.

PHOTOGRAPHS: Half-tone illustrations should be supplied as clear, glossy, unmounted prints. The author's name, title of manuscript and figure number should be written on the back.

TABLES: Each table must be referred to in the text. Each table should be typed double-spaced on a separate sheet and identified sequentially by Arabic numerals corresponding to the order in which they appear in the text. Each table should have a brief explanatory title, which should be labeled unambiguously. The position of each table should be clearly marked in the text.

UNITS: Internationally accepted units of measurement must be used. The units of measurement are used in conjunction with their numerical values; the units should be abbreviated as suggested below. If more commonly used units are adopted, conversion factors should be given at their first occurrence. Greek symbols may be used. %, $\hat{\text{A}}^{\circ}\text{C}$, nm, $\hat{\text{A}}\mu\text{m}$ (not m), mm, cm, cm^3 , m, h (or hr), min, s (or sec), $\hat{\text{A}}\mu\text{g}$, mg, g (or gm), kg, cal, kcal, in. (or write out inch), ml [write out liter(s)].

ABBREVIATIONS: No abbreviations are allowed in the title and abstract and should be defined the first time they are used within the text. The "Journal of Biomedical Nanotechnology" should be abbreviated as J. Biomed. Nanotech. for the citation purpose.

REFERENCES (Use Harvard Referencing): References should be in the proper Harvard style on a separate page, numbered in the sequence in which they occur in the text. Cite references numerically in a bracket [] in the text and list in the same numerical order at the end of the manuscript. References should be listed in the **HARVARD Referencing format:**

Names of all Authors. The Surname is followed by First name initials. (example; Williams, P. G.)

Year of Research Article Publication (in Bold: **2015**)

Title of Research Article.

Full **Journal Title** (complete journal title *in Italics, do not use abbreviated journal titles*).

Volume Number of the Journal.

Issue Number of Journal.

Page Numbers of research article (starting from beginning page to last page of a research article)