

Nanopartículas de Prata para uso Bactericida: Fatores Extrínsecos e Intrínsecos para Aumento da Estabilidade

Silver Nanoparticles for Antibacterial Use: Extrinsic and Intrinsic Factors to Increase Stability

Gabriel Mustafá Misirli,^{a*} Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio,^b Shirley de Mello Pereira Abrantes^c

^aBio-Manguinhos/Fiocruz, Departamento de Controle da Qualidade, Laboratório Físico-químico (LAFIQ), Av. Brasil, 4365, CTV/DEQUA/LAFIQ, Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^bFarmanguinhos/Fiocruz, Laboratório de Micro e Nanotecnologia, Av. Brasil 4365, Manguinhos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^cINCQS/Fiocruz, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Av. Brasil 4365, Manguinhos, CEP 21045-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

*E-mail: gabriel.misirli@bio.fiocruz.br

Recebido em: 14 de Dezembro de 2020

Aceito em: 14 de Dezembro de 2021

Publicado online: 8 de Abril de 2022

Recent studies with silver nanoparticles (AgNPs), a broad spectrum bactericidal and virucidal agent, place them as a promising ingredient in fighting the spread of multiresistant bacteria, viruses and neglected diseases, as well as other biological uses. In this review, we show the difference between the mechanisms of the AgNPs and silver ions (Ag⁺) in the chemical, biological and toxicological level, as well as the augmented influence of the bactericidal activity in the facets {111}. To better understand the efficacy of the AgNPs as an antimicrobial agent, the mechanism of action of the AgNPs was analyzed in bacteria and viruses. Furthermore, we described intrinsic and extrinsic factors that directly affect the physical-chemical stability of AgNPs and are essential for their biological use, in future clinical studies and in the development of new products containing AgNPs.

Keywords: Silver nanoparticles; bactericidal and virucidal agent; mechanism of action; stability; toxicity.

1. Introdução

A prata é um dos agentes bactericidas mais antigos da história. Existem registros que datam de mais de 1000 anos a.C. referindo-se ao seu uso medicinal, como um agente antimicrobiano.¹ Desde então, o efeito bactericida da prata e das nanopartículas de prata (AgNPs) tem sido estudado e diversas evidências experimentais de sua eficácia têm sido comprovadas tanto em estudos *in vitro*, como *in vivo*.²⁻⁶ Uma revisão sistemática realizada concluiu que curativos, para tratamento de feridas, contendo AgNPs mostram a ação antibacteriana dos mesmos.⁷

O uso indiscriminado de antibióticos e o aumento de microrganismos multirresistentes nos últimos anos ressuscitou a atenção dos cientistas para os estudos do uso de prata e de suas nanopartículas como agentes antimicrobianos.^{3,4,8-10} Os vírus são uma das principais causas de doenças e mortes no mundo e têm a capacidade fascinante de se adaptar ao seu hospedeiro, passar para um novo hospedeiro e escapar das medidas antivirais e, da mesma forma, as bactérias são resistentes aos antibióticos principalmente devido à sua capacidade de criar biofilme.¹⁰⁻¹³ Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o aumento da resistência das bactérias e vírus aos antibióticos já causa pelo menos 700.000 mortes/ano e tende a aumentar para 10 milhões mortes/ano até 2050, caso nenhuma solução seja encontrada para limitar a resistência microbiana.¹⁴

Ao contrário do que acontece com antibióticos convencionais e de alvo específico, a prata ataca os organismos em diferentes alvos e esta pode ser uma explicação plausível que dificulta a criação de resistência contra ela, pois não seria possível as bactérias e vírus desenvolverem uma série de mutações, simultaneamente, para se protegerem.¹⁵

Por outro lado, as propriedades físico-químicas das AgNPs, como o seu tamanho, morfologia e agente estabilizantes, podem afetar a eficácia e segurança do uso desse material.^{9,16} A agregação e a dissolução oxidativa são pontos cruciais para evitar riscos à saúde decorrentes da exposição das AgNPs e liberação de íons Ag⁺ no meio.¹⁷ O desenvolvimento das AgNPs, como agentes terapêuticos de alta eficácia e baixa toxicidade, avança para uma nova era da medicina e sua caracterização adequada é essencial para garantir sua eficácia e baixa toxicidade.^{18,19} Assim, essa revisão busca discutir a relevância do controle da estabilidade das AgNPs por meio da avaliação de trabalhos da literatura. A busca desses trabalhos foi feita, principalmente, via as bases de dados da Pubmed e Science Direct com descritores nanopartículas de prata, estabilidade, aplicação microbiológica, toxicidade.

1.1. Morfologias de AgNPs

As AgNPs podem ser sintetizadas com várias morfologias, dependendo do método de fabricação, como: esferas, bastões, fios, placas triangulares, placas hexagonais, pirâmides, cubos, além de compostos bimetálicos. E todas possuem características específicas, tanto do ponto de vista físico-químico, como no campo biomédico.^{16,20}

As propriedades químicas e físicas únicas dos nanocristais de prata são determinadas não apenas pela grande concentração dos átomos da superfície, mas também pelas orientações cristalográficas das faces. O número de átomos na superfície é influenciado pelo tamanho da nanopartícula e a morfologia das partículas depende da orientação cristalográfica. As faces $\{111\}$, $\{100\}$ e, possivelmente, $\{110\}$ das AgNPs são diferentes, não apenas nas densidades dos átomos da superfície, mas também na densidade eletrônica, ligação e reatividade química.²¹⁻²³ Na Figura 1 é possível visualizar estas faces de forma mais clara.

A orientação cristalográfica de uma AgNP pode ser determinada usando a técnica de difração de raios-X (XRD), que é baseada na lei de Bragg. Os planos cristalográficos de um cristal (faces), atuam como espelhos, de modo que os feixes de raios-X são refletidos formando um segundo ângulo, θ , permitindo a identificação das faces.^{20,26}

1.2. Propriedades antimicrobianas das AgNPs

Ajayan e Marks (1988) e Hatchett e Henry (1996) demonstraram que a reatividade da prata é favorecida pelas faces de alta densidade atômica $\{111\}$.^{27,28} Morones e colaboradores (2005) mostraram, usando microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução com detecção de campo escuro anular, que em torno de 98% das partículas

de AgNPs, sintetizadas pela *Nanotechnologies Inc.*, tinham morfologia cubo-octaédrica, icosaédrica e decaédrica geminadas.²⁹ Todas estas morfologias apresentaram, principalmente, superfícies $\{111\}$.^{15,27,28} Pal e colaboradores (2007) foram os primeiros a avaliar comparativamente a atividade bactericida das formas das AgNPs triangulares truncadas (40 nm), esféricas (39 nm) e tubulares (133 nm), frente à bactéria *Escherichia coli*, e concluíram que a forma triangular truncada apresentava maior ação biocida.¹⁵ Tal fato foi explicado por essa última apresentar uma maior quantidade de orientações cristalográficas das faces $\{111\}$, observada na difração de raios-X. Já as AgNPs esféricas e tubulares tinham predominantemente faces $\{100\}$, junto com pequena percentagem de faces $\{111\}$, logo menor reatividade da prata, uma vez que essa é favorecida por faces com alta densidade atômica como $\{111\}$.¹⁵ Van Dong, Ha, Binh e Kasbohm (2012) observaram que a atividade bactericida das nanopartículas de prata pode ser ajustada pelo controle do tamanho e da forma no preparo das AgNPs.³⁰ Compararam a atividade bactericida, usando *E. coli*, em duas formas de AgNPs, esférica e nanoprisma triangular, nos tamanhos de 4, 21 e 40 nm e 25 a 400 nm, respectivamente. O estudo mostrou que a forma triangular, contendo principalmente faces $\{111\}$, exibiu propriedades bactericidas maiores quando comparadas com as formas esféricas.³⁰

Agnihotri, Mukherji e Mukherji (2014) estudaram a atividade bactericida frente às bactérias *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, de vários tamanhos de AgNPs, na forma esférica, e perceberam que as AgNPs foram altamente tóxicas às cepas bacterianas e sua eficácia aumentou com a diminuição do tamanho. O efeito ficou mais pronunciado quando usou tamanho de 5 nm, demonstrando uma atividade bactericida mais

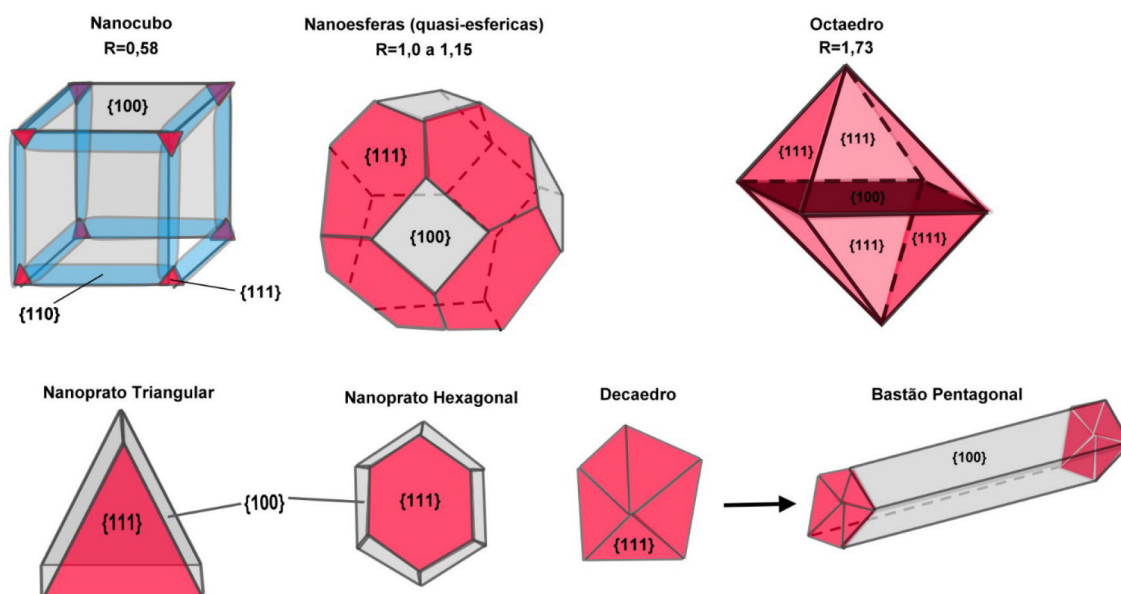


Figura 1. Morfologia de nanocristais com suas faces predominantes em cada estrutura e a razão (R) na proporção das faces $\{111\}$ em relação às $\{100\}$.

Fonte: Formas geométricas de nanocristais com suas superfícies predominantes em cada estrutura e a proporção de superfícies $\{111\}$ em relação a $\{100\}$. Adaptado das ref. 23, 24 e 25; Copyright 2000, American Chemical Society; Copyright 2005, Wiley; Copyright 2009, Wiley, respectivamente.

rápida quando comparada com os tamanhos de 7 e 10 nm. A extensão da atividade bactericida foi a mesma para tamanhos de 5, 7 e 10 nm, independentemente das cepas bacterianas.³¹ Raza e colaboradores (2016) quando compararam a atividade bactericida, frente as bactérias *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, das AgNPs, nas formas esféricas e triangulares, nos respectivos tamanhos de 15 a 90 nm e 150 nm, deduziram que as formas esféricas, de faixa de tamanho 15-50 nm, demonstraram atividade bactericida mais pronunciada contra as duas cepas bacterianas, quando comparadas as formas esféricas maiores e as formas triangulares de aresta de 150 nm. Está claro que formas semelhantes apresentam maior atividade bactericida, à medida que diminui o tamanho.^{15,32} Alshareef, Laird e Cross (2017) referendaram a observação de Pal e colaboradores (2007) quando compararam as formas octaédricas truncadas e às formas esféricas de tamanhos semelhantes, quanto a atividade bactericida.^{15,33} Os autores constataram que as formas octaédricas truncadas apresentavam maiores atividades bactericidas quando comparadas às formas esféricas. Os achados mostraram que, quanto maior a área de superfície das AgNPs, maiores as quantidades de faces ativas e maiores as energias de superfície, acarretando em maior efeito bactericida.³³

E, finalmente, o trabalho de Acharya e colaboradores (2018), que avaliaram a eficiência das nanopartículas de prata esféricas (AgNP-sp) e nanopartículas de prata em bastonete (AgNR), quanto à sua atividade antibacteriana contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A cinética de eliminação das bactérias confirmou que a taxa de mortalidade de *Klebsiella pneumoniae* era maior com as AgNP-sp (maior quantidade de faces {111}) em comparação com as AgNR. Concluiu-se que as faces {111} são responsáveis pelo efeito antibacteriano, fato que foi confirmado por estudo da cinética de eliminação das bactérias e apoiado pelo arranjo de genes resistentes as AgNPs no genoma do organismo de teste.^{29,34}

Além dos tamanhos e formatos diferentes que as AgNPs podem ter, outras camadas metálicas podem ser adicionadas e acrescentadas novas características como, por exemplo, magnetismo com a adição de níquel ou ferro na produção de nanopartículas de prata bimetálica Ag@Ni ou Ag@Fe,³⁵ com potenciais aplicações biomédicas em terapias por manipulação magnética com efeito fototérmico, atividade bactericida localizada, entre outras possibilidades.³⁵⁻³⁸

Devido a atividade bactericida das AgNPs, elas podem ser usadas na tecnologia de polímeros, para expandir o leque de aplicações dessas nanopartículas, na preservação de alimentos, desinfecção de suprimentos e equipamentos médicos, na descontaminação das superfícies, e em várias aplicações biológicas e biomédicas.^{9,16,20} Vários estudos demonstraram o poder antimicrobiano das AgNPs para uma ampla gama de bactérias, Gram-negativas, Gram-positivas, bactérias multirresistentes (MR),^{6,8,39-41} fungos^{19,42,43} e vírus,^{10,29,44,45} além de apresentarem propriedades anti-inflamatórias,⁴⁶⁻⁴⁸ anticancerígenas,^{8,49} antiangiogênicas.^{20,36}

Foi observada uma notável capacidade na cicatrização de feridas ulcerosas e para o tratamento de queimaduras.^{8,50}

Além disso, diversos estudos vêm sinalizando com sucesso do uso das AgNPs no tratamento de doenças negligenciadas.^{51,52} Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a eficácia das AgNPs para Dengue,^{53,54} Leshimaniose,⁵⁵⁻⁵⁸ Malaria,⁵⁵⁻⁵⁸ Esquistossomose^{62,63} e Tripanossomíase (Doença de Chagas).⁶⁴

1.3. Toxicidade do íon Ag⁺ e das AgNPs

A prata é conhecida como um dos agentes antibacterianos mais antigo. Registros referem-se ao seu uso medicinal há mais de 3500 a.C, no Egito pré-dinástico, na medicina tradicional chinesa e na medicina ayurvédica indiana. Porém, o uso inadequado e em altas doses causa uma anomalia, que é uma condição rara em que a pele, partes dela ou alguns órgãos, adquirem uma coloração azul-acinzentada, conhecida como argíria.^{1,65-67} Estes casos ocorrem devido à ingestão de nitrato de prata, ou seja, prata iônica (Ag⁺). A toxicidade das AgNPs está diretamente relacionada com o aumento da dissolução oxidativa (corrosão), que gera maior liberação de prata iônica (Ag⁺).⁶⁸ Greulich e colaboradores (2012)⁶⁹ avaliaram a toxicidade em células-tronco mesenquimais humanas por 24 h em condições de cultura, tratadas com AgNPs recém preparadas e produzidas sem oxigênio (para evitar a oxidação e liberação de íons de prata) na concentração de 30 ppm. Não houve redução da viabilidade celular comparado ao controle. Por outro lado, ao usar acetato de prata em diferentes concentrações de íon prata (Ag⁺), verificou-se a diminuição em 60% a viabilidade celular com 2,5 ppm e com 5,0 ppm diminuiu em 100% comparados ao controle.⁶⁹

Quando os íons Ag⁺ entram na corrente sanguínea, seu transporte ocorre por meio de interações com albumina, cisteína, metionina, e formação de pontes dissulfeto, originando os complexos tiol.⁷⁰ Os íons de prata têm alta afinidade pelos grupos tiol de proteínas; no entanto, ao entrarem em contato com sulfetos e selenetos, são facilmente permutáveis, pois possuem uma maior afinidade de ligação e formam sais insolúveis, como o sulfeto de prata, que diminuem a mobilidade biomolecular, e podem ficar acumulados sob a pele, causando argíria.⁷¹

O Ag⁺, que atinge a região próxima da pele em áreas afetadas pela luz pode ser facilmente fotorreduzida para formação de AgNPs, que imobilizam efetivamente a prata. A imobilização é tanto física, devido à baixa difusividade das partículas, quanto química, uma vez que as reações de troca do tiol com Ag⁺ não ocorrem com a prata elementar. Dessa forma, fica claro perceber que a condição, conhecida por argíria, é causada pela ingestão de Ag⁺, que é conduzida pelos grupos tióis até a periferia da pele que, ao ser atingida pelos raios solares, é convertida em AgNPs dentro da pele, ficando imobilizada. A ingestão das AgNPs, por não sofrer esta interação com os grupos tióis acaba tendo outros processos de eliminação e não causa argíria.^{1,72}

Por outro lado, as AgNPs, ao entrarem em contato com o plasma humano, adsorvem biomoléculas, como albumina sérica humana (HSA), fibrinogênio, imunoglobulina (IgG), metalotioneína (MT) e ceruloplasmina (CP), formando uma proteína corona (PC) ao redor das AgNPs.⁷³⁻⁷⁵ A PC é um sistema dinâmico formado por biomoléculas que revestem as NPs, e sua composição ao longo do tempo até que a composição do PC alcance equilíbrio.⁷⁶ Está “coroa biomolecular” interage com as NPs e confere uma nova identidade biológica,^{75,77} conforme apresentado na Figura 2.

Melo (2011) e Marcato (2015) realizaram estudo *in vitro* e *in vivo* no tratamento de queimaduras em ratos.^{50,78} Não houve diferenças significativas nos níveis de ureia, creatinina e aminotransferases e nos parâmetros hematológicos, entre os grupos controle e queimados (AgNPs) e grupos tratados e queimados. Além disso, não houve diferenças significativas na peroxidação lipídica, proteínas carbonílicas e glutatona reduzida (GSH), entre os grupos. Uma pequena resposta celular inflamatória, vascularização da derme papilar, fibroblastos diferenciados em miofibroblastos contráteis e, a presença de uma grande quantidade de matriz extracelular, pode ser evidenciada nos grupos tratados, após lesão cutânea.^{50,78}

Munger e colaboradores (2014) realizaram estudo da exposição oral *in vivo* de AgNPs administradas oralmente (15 mL/dia) de soluções comerciais de AgNPs (10 e 32 mg L⁻¹) em 60 indivíduos saudáveis. Eles realizaram exames metabólicos e sanguíneos, urinálise, ressonância magnética de tórax e abdome. O conteúdo de prata no soro e na urina foi determinado e nenhuma alteração clinicamente importante foi identificada, bem como nenhuma alteração morfológica foi detectada nos pulmões, coração ou órgãos abdominais. Além disso, não foram observadas alterações significativas nas espécies reativas de oxigênio pulmonar

ou na geração de citocinas próinflamatórias. É necessário um estudo mais aprofundado sobre o aumento da exposição no tempo, dosagem de AgNP e observação de sistemas orgânicos adicionais para afirmar os limiares de toxicidade humana.⁷⁹

A agência de saúde da Austrália informa sobre a toxicidade oral das AgNPs:

‘Estudos relatam baixa toxicidade em ratos, camundongos e porquinhos-da-índia após ingestão (deglutição). Nestes estudos com roedores, o grau de toxicidade dependia do tamanho das partículas e da dose administrada.’⁸⁰

Cada AgNP é única em função da sua rota de preparação, tamanho, estado de agregação, síntese físico-química ou biológica, natureza química do revestimento, carga superficial e teor de Ag⁺ livre. O controle nos parâmetros de síntese das AgNPs é necessário para garantir a reprodutibilidade de sua produção para avaliar de forma correta a sua toxicidade.⁸¹ Uma AgNP esférica de 20 nm produzida por síntese biológica, tem maior compatibilidade para uso biológico (menor toxicidade) que uma AgNP de mesmo tamanho e morfologia produzida por síntese química, assim como, uma AgNP que possua alto teor de íon prata livre, possui sua citotoxicidade aumentada em função do teor de Ag⁺ livre.³

1.4. Mecanismo de ação das AgNPs nas bactérias

Vários estudos têm demonstrado que as AgNPs possuem atividade bactericida e viral em baixas concentrações, e não causam efeitos tóxicos agudos nas células humanas.^{82,83} O mecanismo de ação das AgNPs é fundamental para melhor compreensão de seus efeitos, potencialidades e toxicidade.^{3,4,9}

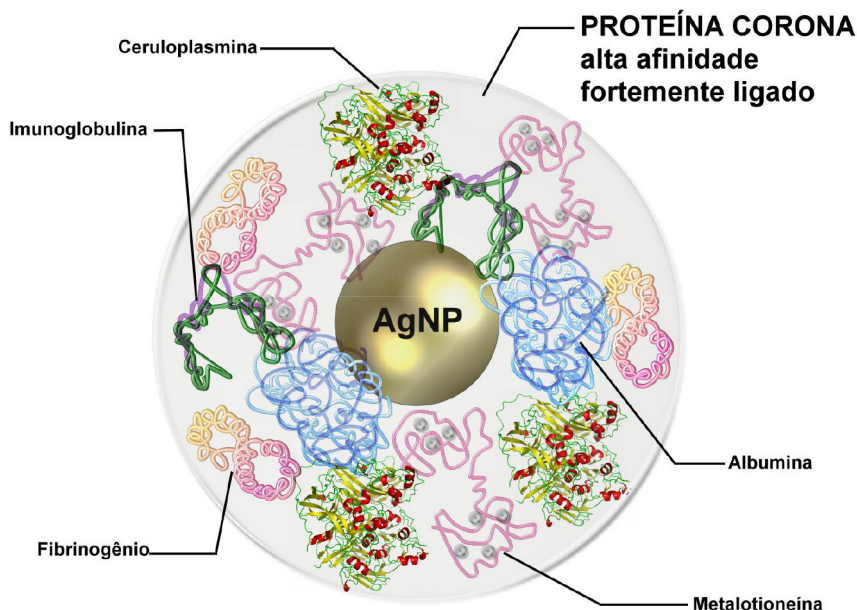
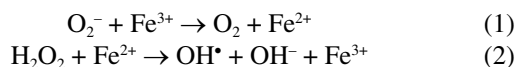


Figura 2. Representação proteína corona com nanopartículas de prata (AgNPs).

Foi demonstrado que as AgNPs não causam resistência bacteriana, pois, ao contrário dos antibióticos, as AgNPs não exercem seus efeitos antibacterianos em um único sítio específico, mas em vários níveis, como: parede bacteriana, bloqueio de transferência de elétrons, respiração celular e replicação devido a danos a proteínas, RNA e ADN.^{29,84} Além disso, há evidências substanciais de que AgNPs produzem espécies reativas de oxigênio (ROS). O acúmulo de ROS intracelulares é amplamente conhecido como um importante regulador da apoptose.^{4,19} A produção de espécies oxidativas pode ser devido aos elétrons envolvidos na cadeia respiratória. É improvável que as enzimas antioxidantes detoxifiquem as ROS, a partir da cadeia respiratória danificada, uma vez que dependem de grupos tióis, que foram ocupados por íons de prata. O aumento dos ânions superóxido e peróxido de hidrogênio na reação com o ferro (reação de Fenton), conforme equações 1 e 2 e Figura 3, causa destruição da estrutura interna da célula, proteínas, RNA, ADN e consequente dano celular por apoptose.^{2-4,72,85,86}



As AgNPs destroem a camada de biofilme e passam através da mesma. Devido à grande densidade eletrônica, as AgNPs interagem eletrostaticamente com a camada de fosfolípidos da membrana plasmática, atravessando-a e internalizando-se no interior da célula, onde dependendo de seu tamanho e da química de superfície são translocadas para organelas alvo, como a mitocôndria e o núcleo. No interior da célula as AgNPs interagem com proteínas da membrana plasmática e provocam uma série de efeitos biológicos,

incluindo alteração da morfologia celular, estresse oxidativo, dano ao ADN, disfunção mitocondrial, e consequente morte celular por apoptose.⁸³ O íon prata liberado intracelularmente interagem com grupos tióis, como glutatona, superóxido dismutase e tioredoxina, levando ao aumento de peroxidação dos lipídios, estresse oxidativo, dano ao ADN e subsequente morte celular apoptótica.

Um mecanismo recente, proposto por Wakshlak, Pedahzur e Avnir (2015) sugere que as AgNPs interagem com os componentes celulares da bactéria morta (RNA, polissacarídeo, fosfolípidos, proteínas e ADN) e são estabilizadas e envolvidas pelo próprio material genético da bactéria (AgNP-bac).⁸⁷ Este novo mecanismo para a ação da prata foi chamado de “efeito zumbi”. Devido ao princípio de Le-Chatelier, AgNPs são redirecionadas para bactérias vivas com um potencial ainda maior de letalidade de acordo com a Figura 3.⁸⁷

1.5. Mecanismo de ação das AgNPs nos vírus

As AgNPs podem atuar em uma ampla gama de alvos no vírus e inibir a replicação do capsídeo viral. Além disso, há menos chance de desenvolver resistência em comparação aos antivirais convencionais. O surgimento de cepas virais resistentes e a falta de terapias antivirais eficazes torna as AgNPs atrativas, para futuros medicamentos antivirais.^{4,9,10}

O principal mecanismo antiviral das AgNPs é provavelmente a inibição física da ligação entre o vírus e a célula hospedeira.⁸⁸⁻⁹¹ A infecção viral começa com a adesão do vírus ou ligação aos receptores do hospedeiro, seguida de penetração, replicação e brotamento. As principais estratégias antivirais são bloquear efetivamente a fixação

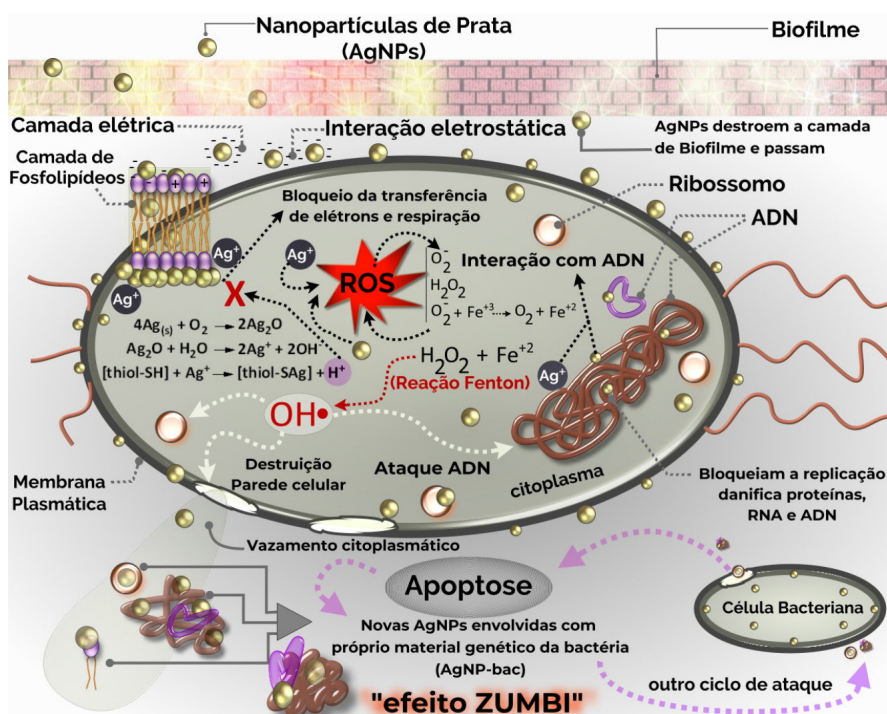


Figura 3. Mecanismo de ação das nanopartículas de prata (AgNPs) na célula bacteriana.

viral nos receptores do hospedeiro (efeito profilático), e inibir a replicação e brotamento viral (efeito terapêutico).^{10,44,92} Estudos *in vitro* revelam que as AgNPs podem atuar como inibidores da entrada viral,⁸⁸⁻⁹¹ bloqueadores do botão de glicoproteína (gp120),^{89,93} inibidores da síntese de RNA viral de fita negativa e brotamento viral^{44,94} e competição com vírus, para se ligar à célula de sulfato de heparan.⁹³ Estudos indicam que AgNPs não afetaram a viabilidade da célula, em testes de citotoxicidade mitocondrial ou integridade da membrana plasmática, e exibiram capacidade potente de ativar macrófagos para a produção de genes estimuladores de interferon (IFN) ativados (ISG-20, ISG-54) e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL-6, IL-8),^{44,91,95,96} conforme apresentado na Figura 4.

Vários estudos demonstraram a eficácia das AgNPs frente aos vírus: da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1),^{89,93} vírus da diarreia epidêmica suína (PEDV) – vírus da família dos Coronavírus,⁴⁴ vírus Tacaribe (TCRV),⁹⁴ além de vírus respiratórios, como adenovírus, parainfluenza e influenza (H1N1, H3N2),^{91,97} entre outros. Morris e colaboradores (2019) usaram modelos *in vitro* e *in vivo*, em camundongos infectados experimentalmente, e concluíram que as AgNPs reduziram efetivamente a replicação do vírus sincicial respiratório (RSV), e a produção de citocinas pró-inflamatórias em linhagens de células epiteliais e nos pulmões dos camundongos.⁹¹

Estudos recentes mostram que roupas, tecidos e máscaras revestidos com AgNPs, impedem o crescimento bacteriano e viral mesmo após lavagem e uso constante.⁹⁸ Fato relevante, principalmente, neste momento atual da pandemia por síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2 (Sar-Cov-2).

2. Fatores para Garantia da Estabilidade Química das AgNPs

A estabilidade é a amplitude de tempo na qual um produto mantém, dentro de limites especificados e durante seu período de armazenamento e uso, as mesmas propriedades e características que possuía quando fabricado. Semelhante aos insumos farmacêuticos ativos convencionais, a estabilidade das AgNPs pode ser afetada por um ou mais fatores, como temperatura, pH, exposição à luz, teor de oxigênio dissolvido, e até a presença de outros excipientes e impurezas.⁹⁹

As propriedades físico-químicas das nanopartículas são importantes para a segurança e a eficácia. Estudos envolvendo as AgNPs, tanto em nível químico, farmacológico, biológico e toxicológico, mostram comportamentos e mecanismos distintos em seus tamanhos e morfologias diferentes e, principalmente, em comparação com o íon prata (Ag^+). Do ponto de vista do controle de qualidade, incluindo todos os estudos envolvendo AgNPs, deve-se considerar a identificação e quantificação dessas espécies.^{9,16,20,100}

2.1. Fatores Extrínsecos que afetam a estabilidade das AgNPs

São considerados fatores extrínsecos todos os fatores externos aos quais o produto está exposto.¹⁰¹ Para as AgNPs, a temperatura e a exposição a luz são fatores críticos fundamentais para garantir a estabilidade durante o transporte e armazenamento das AgNPs.^{65,102,103}

A temperatura de armazenamento é um fator crítico que controla o percentual de dissolução oxidativa das AgNPs.

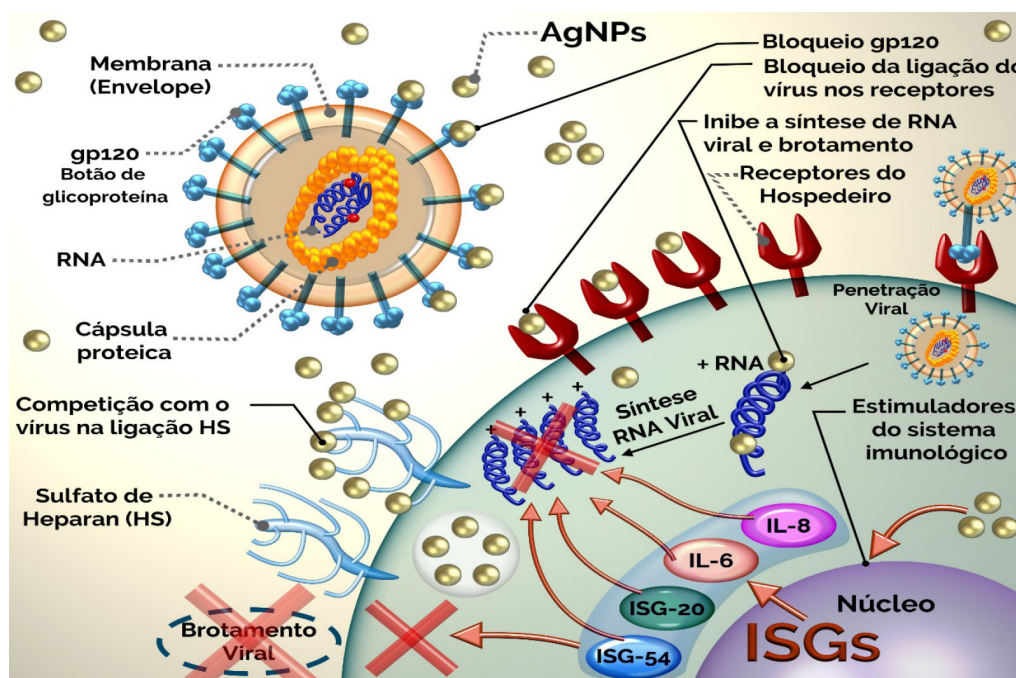


Figura 4. Mecanismo de ação dos AgNPs em células virais.

Quanto maior a temperatura, maior será a velocidade de uma reação de dissolução.^{65,103} Kittler e colaboradores (2010) estudaram a dissolução de AgNPs com tamanho de 50 nm dispersas em água, nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C, durante 125 dias, e observaram um aumento na liberação de Ag⁺, com o aumento da temperatura, variando de 5% a 5 °C para 50% a 25 °C e de 90% a 37 °C.⁶⁵ A estabilidade das AgNPs, armazenadas a 4 °C por 5 meses, também foi confirmada por Liu e Hurt (2010), por meio de espectrofotometria no ultravioleta visível.¹⁰³

Já o efeito da irradiação luminosa foi observado por Jin (2001), na conversão de nanoesferas em nanoprismas, quando irradiou uma solução aquosa de AgNPs esféricas com luz fluorescente de 40 W durante 70 h.¹⁰⁴ Cheng e colaboradores (2011) examinaram o efeito da luz solar sobre a estabilidade e toxicidade de AgNPs de tamanhos de 6 e 25 nm, recobertas com goma arábica e polivinilpirrolidona (PVP).¹⁰⁵ Eles observaram a agregação irreversível das AgNPs devido à interação forte dipolo-dipolo, que daria origem à desestabilização, e que esta agregação tinha como força motriz o teor de luz ultravioleta da luz solar.¹⁰⁵ Grillet e colaboradores (2013) estudaram o efeito da irradiação de luz em AgNPs com morfologia esférica e cúbica, em condições ambientais. Em ambos os casos, o efeito do fotoenvelhecimento foi estudado, avaliando o impacto da incidência de luz artificial (filamento de tungstênio, temperatura de luz de 3200 Kelvin) com uma potência de 1 μW focada em uma área de 1 μm². A formação perceptível de NPs ainda menores de Ag₂O em torno das AgNPs esféricas, após a exposição à luz, observada na micrografia

da microscopia eletrônica de transmissão (TEM), mostrada na Figura 5a, confirmou o rápido processo de foto-oxidação.^{102,106} Após 40 h de irradiação de luz, o nível de oxidação em AgNPs cúbicas foi de cerca de 30%, enquanto levaram apenas 9 h de irradiação de luz no caso de AgNPs esféricas, confirmando que o processo de oxidação foi muito mais lento no caso de AgNPs cúbicas como observada a partir das micrografias da TEM representadas na Figura 5b.

2.2. Fatores Intrínsecos que afetam a estabilidade das AgNPs

Fatores intrínsecos são fatores relacionados à própria natureza da formulação e, sobretudo, à interação de suas substâncias entre si e/ou com a embalagem.¹⁰¹ No caso das AgNPs, respeitando suas características físico-químicas, foram observados que os parâmetros de controle da estabilidade química das AgNPs como: pH, oxigênio dissolvido, potencial zeta (PZ) e a viscosidade do meio, proporcionam maior estabilidade as AgNPs.^{65,103}

A solubilização das AgNPs em água torna-se maior com o aumento da quantidade de oxigênio dissolvido (dissolução oxidativa). A dissolução oxidativa de AgNPs ocorre por oxidação da prata em óxido de prata (Ag₂O), com liberação do Ag⁺ em solução e exposição da prata metálica não oxidada, que pode sofrer oxidação adicional; trata-se de uma corrosão das AgNPs.^{103,107} Essa formação e dissolução do ciclo Ag₂O ocorre simultaneamente, resultando em um processo de dissolução contínuo, e também pode ser influenciada por fatores extrínsecos, como luz artificial

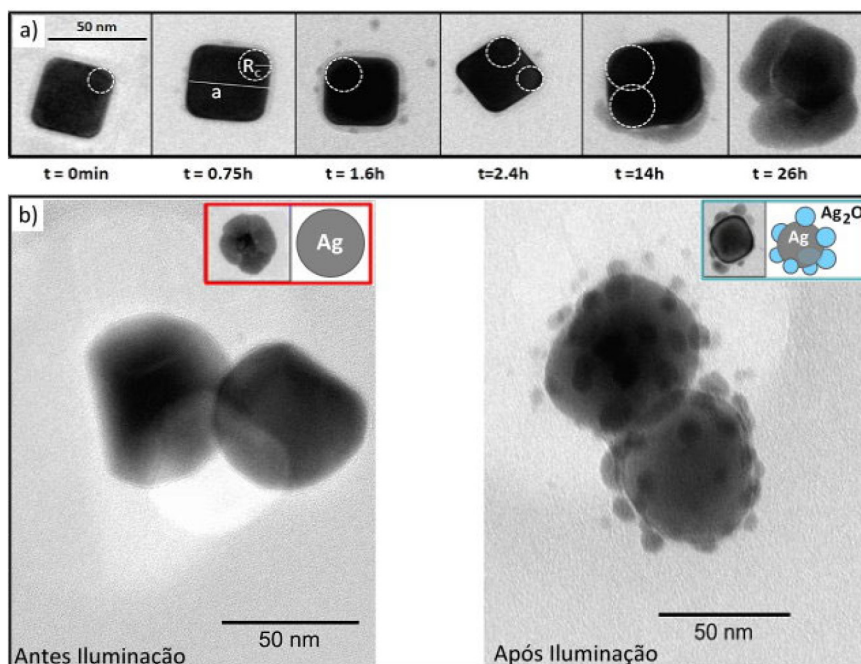
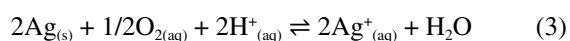


Figura 5. Foto-oxidação das nanopartículas de prata (AgNPs), a) Micrografias TEM que representam as AgNPs cúbicas que foram continuamente irradiadas com luz durante o tempo de 0; 0,75; 1,6; 2,4; 14 e 26 h, com formação de pequenas NPs de óxido de prata (Ag₂O) evidenciando a foto-oxidação das AgNPs. b) Micrografias comparativas de TEM de AgNPs esféricas antes e depois da irradiação de luz. Fonte: Adaptado com autorização da ref. 102

e solar, temperatura de armazenamento; e por fatores intrínsecos, como pH, oxigênio dissolvido, potencial zeta (PZ).^{102,108,109}

Estudos experimentais mostraram que em baixo pH, em geral, há o aumento da cinética de liberação de Ag⁺ no meio.^{68,103,108} Liu e Hurt (2010) estudaram a dissolução de AgNPs, em soluções tamponadas (tampão acetato e borato) em uma faixa de pH de 4 a 9, e observaram que o aumento do pH de 4 para 9 resultou em 10 vezes menos liberação de Ag⁺.¹⁰³ A formação de uma camada protetora, envolvendo as AgNPs, ocorre com a formação da espécie Ag₃OH⁰, que é iniciada a partir de pH 9,0. Esta camada atua como uma blindagem do processo dissolutivo das AgNPs.^{68,110} A dissolução de AgNPs é maximizada em meio ácido e na presença de oxigênio dissolvido conforme equação 3.¹⁰³



Liu e Hurt (2010) verificaram a extensão da liberação de prata dissolvida de AgNPs em função do oxigênio dissolvido e do pH. Várias medições de quantificação de Ag⁺ foram realizadas em função do tempo. As AgNPs foram produzidas de duas formas: Na primeira, a água utilizada estava em soluções saturadas de ar (9,1 ppm O₂ dissolvido). Por outro lado, na segunda forma de preparo, foi utilizado uma água com baixo teor de oxigênio dissolvido (purgada) (0,1 ppm O₂ dissolvido). Concluiu-se que a remoção do oxigênio dissolvido inibe completamente a liberação de prata dissolvida, indicando que o controle do teor de oxigênio dissolvido é essencial para evitar a oxidação das AgNPs, iniciada pelo O₂.¹⁰³ Zhang e colaboradores (2011) verificaram que as taxas de dissolução oxidativa das AgNPs dependem do tamanho e concentração das partículas primárias, quando outros fatores ambientais (por exemplo, oxigênio dissolvido e prótons) eram mantidos constantes.¹¹⁰

O potencial Zeta (PZ), também denominado potencial eletrocinético, é o potencial no plano de deslizamento/cisalhamento de uma partícula que se move sob um campo elétrico. O PZ reflete a diferença potencial entre a dupla camada elétrica de partículas eletroforicamente móveis e a camada de dispersante em torno deles no plano de cisalhamento.¹¹¹ AgNPs com PZ superior a |30| mV são estáveis por natureza, uma vez que as partículas têm força repulsiva suficientemente alta, há menos aglomeração. Portanto, para garantir a estabilidade a longo prazo das nanopartículas, é essencial ter alto potencial repulsivo, alto PZ.¹¹²

Outro ponto importante de estudo é a velocidade de sedimentação das AgNPs em suspensão. A sedimentação é o resultado da interação entre as partículas devido ao movimento browniano e à ação da força de gravidade sobre elas. O comportamento de sedimentação das nanopartículas é significativamente alterado pelo tamanho das partículas e a viscosidade do meio.¹¹³ Para elucidar a influência do tamanho da partícula e sua correlação com a viscosidade do meio, realizamos uma simulação matemática da velocidade

de sedimentação de AgNPs com formato esférico, considerando o meio dispersante água com variação da viscosidade do meio (ver material suplementar), utilizando a Lei de Stokes conforme equação 4.¹¹³

$$S = \frac{2}{9} \frac{r^2(\rho - \rho_A)}{\eta} \quad (4)$$

onde r é o diâmetro das AgNPs, ρ a densidade das AgNPs, ρ_A a densidade da fase dispersante, η a viscosidade e S é o coeficiente de sedimentação.

A velocidade de sedimentação de uma partícula influenciada pela força gravitacional (g) em um líquido viscoso, na ausência de movimento browniano, é dada pelo coeficiente de sedimentação (S) multiplicado pela constante de gravidade (g) conforme equação 5.¹¹³

$$V = S \times g \quad (5)$$

Aplicando-se a equação 4 e 5 e considerando a densidade de Ag de 10,49 g cm⁻³, da água de 0,997 g cm⁻³, a gravidade 980,665 cm s⁻² e a viscosidade da água a 25 °C de 0,890 cP, foi relacionado o tamanho das AgNP e a viscosidade dos meios de 0,89; 5; 10; 15 e 20 cP, com o tempo para sedimentação de 1 cm da AgNPs (em meses) conforme apresentado na Figura 6.

Quanto menor o tamanho da partícula, menor será sua massa e, conseqüentemente, menor será a ação da gravidade sobre as partículas. Na Figura 6 é possível visualizar um aumento significativo na estabilidade no aspecto da sedimentação das AgNPs com tamanho de 40 nm, pela simulação, uma viscosidade de 20 cP seria capaz de diminuir o tempo de sedimentação para 9 meses aproximadamente, comparado com aproximadamente 10 dias para a mesma partícula na viscosidade da água, que é 0,89 cP (25 °C).

2.3. Experimento da influência do tamanho das AgNPs com sedimentação

MISIRLI (2021) realizou experimento para verificar a influência da viscosidade do meio na velocidade de sedimentação das AgNPs. Foram adicionadas, em cada tubo de ensaio com tampa, 3,50 ml de padrão de AgNPs (com rastreabilidade descrita na Tabela 1) nos tamanhos de 20, 40 e 60 nm (viscosidade média medida 0,9 cP a 25 °C). Ao mesmo tempo, foram repetidas as mesmas adições, em tubos de ensaio com tampa, adicionando-se em cada tubo 0,35 ml de solução a 3% de carboximetil celulose (CMC) com conseqüente homogeneização (viscosidade média medida de 6 cP a 25 °C), conforme Figura 7. E adicionalmente um tubo com 3,5 mL de água ultrapura tipo 1. Os tubos ficaram em local estático, protegidos da luz e em temperatura ambiente. Eles foram fotografados digitalmente nos tempos: t = 0 dias, t = 15 dias, t = 30 dias e t = 60 dias.¹⁰⁰

A Figura 8 apresenta as fotos das sedimentações nos tempos: t = 0, 15, 30 e 60 dias. Observa-se que para AgNPs

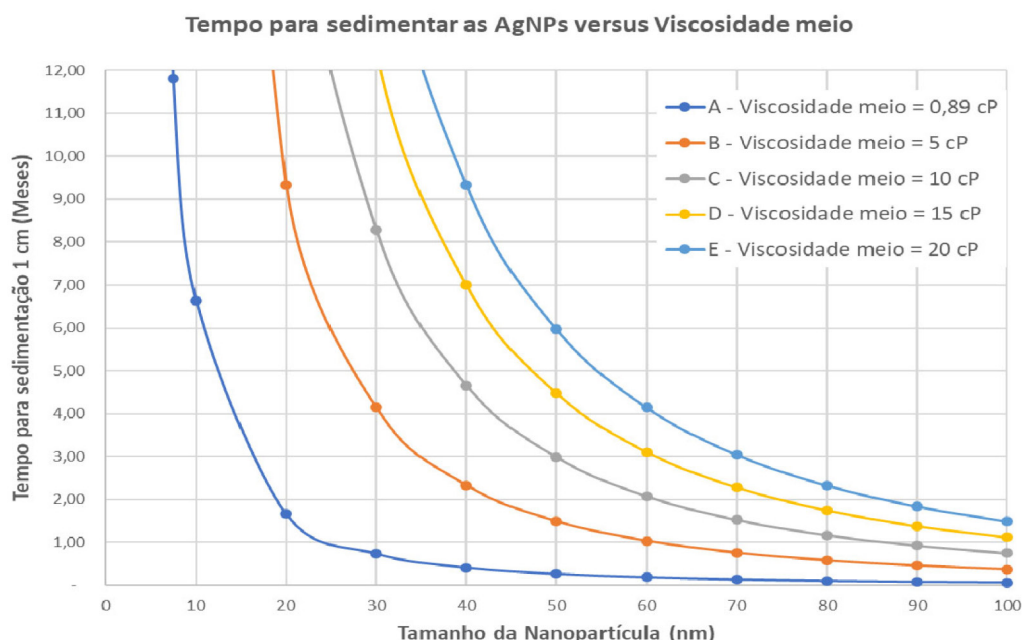


Figura 6. Mostra tempo de sedimentação de 1 cm da AgNPs (em meses) de acordo com tamanho e viscosidade do meio.

Tabela 1. Amostras de Padrão AgNP para experimento de sedimentação

Padrão de AgNPs	Código	Fabricante/ Código	Lote
Padrão 20 nm	PD20	Sigma / 730793	MKCK5339
Padrão 40 nm	PD40	Sigma / 730807	MKCK3883
Padrão 60 nm	PD60	Sigma / 730815	MKCK7323

Fonte: Reprodução da ref. 100 com autorização

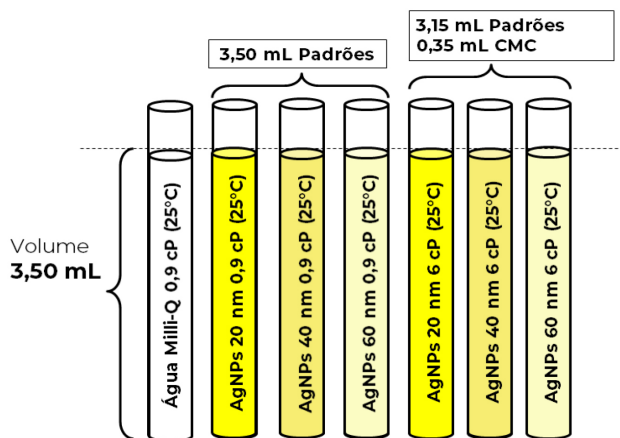


Figura 7. Estudo experimental de estabilidade da sedimentação das AgNPs. Onde: cP, viscosidade a 25 °C em centipoise; CMC, solução de carboxi metil celulose 3%. Após a adição de CMC a viscosidade final das soluções de padrão de AgNPs passou de 0,9 cP para 6 cP.

Fonte: Reprodução da ref. 100 com autorização.

de tamanho de 20 nm a sedimentação é imperceptível para os períodos estudados, tanto em água como em CMC. Entretanto, com o aumento do tempo a sedimentação começa a se formar com visualização expressiva no tempo de 60 dias, principalmente para os tamanhos de AgNPs de 40 e 60 nm. Também vale a pena mencionar que, conforme o tamanho das AgNPs aumenta a sedimentação apresenta-

se mais pronunciada e pelo experimento o aumento da viscosidade de 0,9 cP para 6 cP atenuou muito pouco a sedimentação.

3. Considerações Finais

Esta revisão elucida as propriedades biológicas notáveis das AgNPs, as quais destacamos as antibacterianas. Estudos indicam sua atividade e eficácia também nas bactérias como *P. aeruginosa* multirresistente, *E. coli* resistente à ampicilina e *S. pyogenes* resistente à eritromicina. Trata-se de uma alternativa promissora para novos agentes antimicrobianos de alta eficiência para bactérias. Estudos indicam o uso seguro *in vivo* e no corpo humano.

Diversos estudos sobre a forma de atuação das AgNPs têm mostrado que sua eficácia bactericida está relacionada com a faces {111} e, por isso, morfologias que possuem maior quantidade desta, como os nanopratos triangulares, têm maior atividade antibacteriana em comparação com as nanopartículas esféricas do mesmo tamanho.

Na análise dos estudos envolvendo as AgNPs, tanto em nível químico, farmacológico, biológico e toxicológico, observou-se que as AgNPs apresentam comportamentos e mecanismos distintos do íon prata (Ag^+). Do ponto de vista do controle de qualidade, incluindo todos os estudos

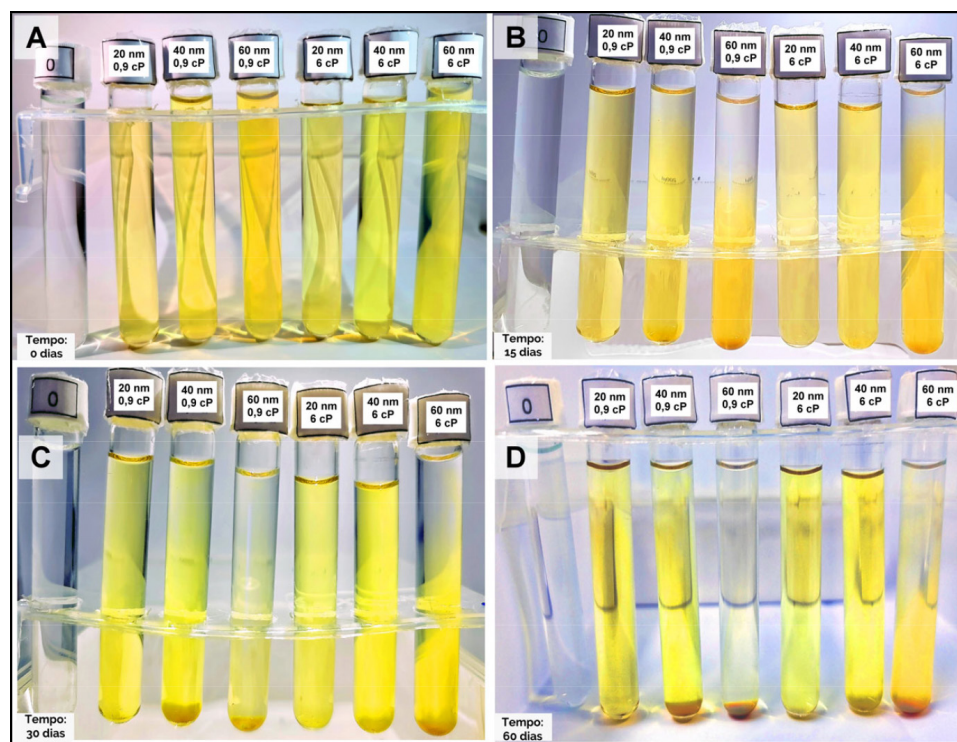


Figura 8. Observação experimental da sedimentação ao longo do tempo de AgNPs (20, 40, 60 nm) em água (viscosidade 0,9 cP) e solução aquosa com CMC (viscosidade 6 cP) usando fotografia digital quantitativa. A Figura 8A representa todas as soluções no tempo zero ($t = 0$ dias). As Figuras 8B, 8C e 8D representam os tempos: $t = 15, 30$ e 60 dias, respectivamente. O primeiro, segundo e terceiro tubos contêm as AgNPs em água ultrapura tipo 1, com viscosidade de 0,9 cP a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os três últimos tubos à direita contêm as mesmas AgNPs, em um meio com viscosidade de 6 cP a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, e os tubos de numeração 0 contêm água ultrapura tipo 1.

Fonte: Reprodução da ref. 100 com autorização.

envolvendo AgNPs, deve-se considerar a identificação e quantificação dessas espécies.

Com relação às propriedades físico-químicas das AgNPs, esta revisão abordou fatores extrínsecos e intrínsecos que afetam a estabilidade das AgNPs e algumas premissas foram alcançadas. A temperatura ideal de armazenamento é $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e longe da luz. O pH ideal é alcalino entre 9,0 a 10,0, PZ > |30| mV e viscosidade do meio a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em torno de 20 cP seriam fatores que contribuiriam, sem dúvida, para a melhor estabilização das AgNPs.

Assim, a escala nanométrica abre caminho para o desenvolvimento de novos fármacos e biofármacos de última geração, e a estabilidade das AgNPs é um fator imprescindível para as suas diversas aplicações.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências Bibliográficas

- Russell, A. D.; Hugo, W. B.; 7 Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medicinal Chemistry* **1994**, 31, 351. [Crossref] [PubMed]
- Markowska, K.; Grudniak, A. M.; Wolska, K. I.; Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochimica Polonica* **2013**, 60, 523. [Crossref] [PubMed]
- Pareek, V.; Gupta, R.; Panwar, J.; Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A Review. *Materials Science and Engineering: C* **2018**, 90, 739. [Crossref]
- Zheng, K.; Setyawati, M. I.; Leong, D. T.; Xie, J.; Antimicrobial silver nanomaterials. *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, 357, 1. [Crossref]
- Jeremiah, S. S.; Miyakawa, K.; Morita, T.; Yamaoka, Y.; Ryo, A.; Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2020**, 533, 195. [Crossref]
- Saeed, S.; Iqbal, A.; Ashraf, M. A.; Bacterial-mediated synthesis of silver nanoparticles and their significant effect against pathogens. *Environmental Science and Pollution Research* **2020**, 27, 37347. [Crossref]
- Silva, M. M. P.; Aguiar, M. I. F. de; Rodrigues, A. B.; Miranda, M. D. C.; Araújo, M. Â. M.; Rolim, I. L. T. P.; Souza, A. M. A.; Utilização de nanopartículas no tratamento de feridas: Revisão sistemática. *Revista da Escola de Enfermagem da USP* **2018**, 51, 1. [Crossref]
- Mathur, P.; Jha, S.; Ramteke, S.; Jain, N. K.; Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2018**, 46, 115. [Crossref]

9. Koduru, J. R.; Kailasa, S. K.; Bhamore, J. R.; Kim, K.-H.; Dutta, T.; Vellingiri, K.; Phytochemical-assisted synthetic approaches for silver nanoparticles antimicrobial applications: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2018**, *256*, 326. [Crossref]
10. Galdiero, S.; Falanga, A.; Vitiello, M.; Cantisani, M.; Marra, V.; Galdiero, M.; Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules* **2011**, *16*, 8894. [Crossref] [PubMed]
11. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K. M.; Wertheim, H. F. L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H.; Greko, C.; So, A. D.; Bigdeli, M.; Tomson, G.; Woodhouse, W.; Ombaka, E.; Peralta, A. Q.; Qamar, F. N.; Mir, F.; Kariuki, S.; Bhutta, Z. A.; Coates, A.; Bergstrom, R.; Wright, G. D.; Brown, E. D.; Cars, O.; Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases* **2013**, *13*, 1057. [Crossref] [PubMed]
12. Barker, K. F.; Antibiotic resistance: a current perspective. *British Journal of Clinical Pharmacology* **1999**, *48*, 109. [Crossref] [PubMed]
13. Stewart, P. S.; Costerton, J. W.; Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **2001**, *358*, 135. [Crossref] [PubMed]
14. World Health Organization: No time to wait. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7_6&download=true. Acesso em: 02 novembro 2020.
15. Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M.; Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73*, 1712. [Crossref]
16. Tang, S.; Zheng, J.; Antibacterial activity of silver nanoparticles: Structural effects. *Advanced Healthcare Materials* **2018**, *7*, 1701503. [Crossref] [PubMed]
17. Riaz Ahmed, K. B.; Nagy, A. M.; Brown, R. P.; Zhang, Q.; Malghan, S. G.; Goering, P. L.; Silver nanoparticles: significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicology in Vitro* **2017**, *38*, 179. [Crossref] [PubMed]
18. Morones, J. R.; Gallegos, S.; Plata, Metal con brillante futuro en la medicina. *Ciencia y Desarrollo* **2014**, *18*. [Link]
19. Hwang, I.; Lee, J.; Hwang, J. H.; Kim, K.-J.; Lee, D. G.; Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS Journal* **2012**, *279*, 1327. [Crossref]
20. Zhang, X.-F.; Liu, Z.-G.; Shen, W.; Gurunathan, S.; Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17*, 1534. [Crossref] [PubMed]
21. Jortner, J.; Cluster size effects. *Zeitschrift Fr Physik D Atoms, Molecules and Clusters* **1992**, *24*, 247. [Crossref]
22. Roduner, E.; Size Matters: Why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 583. [Crossref]
23. Wang, Z. L.; Transmission electron microscopy of shape-controlled nanocrystals and their assemblies. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 1153. [Crossref]
24. Wiley, B.; Sun, Y.; Mayers, B.; Xia, Y.; Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The Case of Silver. *Chemistry - A European Journal* **2005**, *11*, 454. [Crossref]
25. Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E.; Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics? *Angewandte Chemie International* **2009**, *48*, 60. [Crossref] [PubMed]
26. Bragg, P. W. H.; Bragg, W. L.; The reflection of X-rays by crystals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **1913**, *88*, 428. [Crossref]
27. Ajayan, P. M.; Marks, L. D.; Quasimelting and phases of small particles. *Physical Review Letters* **1988**, *60*, 585. [Crossref]
28. Hatchett, D. W.; White, H. S.; Electrochemistry of sulfur adlayers on the low-index faces of silver. *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 9854. [Crossref].
29. Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramirez, J. T.; Yacaman, M. J.; The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346. [Crossref]
30. Van Dong, P.; Ha, C. H.; Binh, L. T.; Kasbohm, J.; Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. *International Nano Letters* **2012**, *2*, 9. [Crossref]
31. Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S.; Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances* **2014**, *4*, 3974. [Crossref]
32. Raza, M.; Kanwal, Z.; Rauf, A.; Sabri, A.; Riaz, S.; Naseem, S.; Size- and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes. *Nanomaterials* **2016**, *6*, 74. [Crossref]
33. Alshareef, A.; Laird, K.; Cross, R. B. M.; Shape-dependent antibacterial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* bacterium. *Applied Surface Science* **2017**, *424*, 310. [Crossref]
34. Acharya, D.; Singha, K. M.; Pandey, P.; Mohanta, B.; Rajkumari, J.; Singha, L. P.; Shape dependent physical mutilation and lethal effects of silver nanoparticles on bacteria. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 201. [Crossref]
35. Sridharan, K.; Endo, T.; Cho, S.-G.; Kim, J.; Park, T. J.; Philip, R.; Single step synthesis and optical limiting properties of Ni–Ag and Fe–Ag bimetallic nanoparticles. *Optical Materials* **2013**, *35*, 860. [Crossref]
36. Wang, M.; Liang, Y.; Zhang, Z.; Ren, G.; Liu, Y.; Wu, S.; Shen, J.; Ag@Fe₃O₄@C nanoparticles for multi-modal imaging-guided chemo-photothermal synergistic targeting for cancer therapy. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1086*, 122. [Crossref]
37. Rihn, B. H.; Biomedical Application of Nanoparticles, 1a. ed., CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2018.
38. Thomas, A.; Torres Tapia, E. C.; Ramirez, A.; Las nanopartículas – nanomateriales de tantas aplicaciones asombrosas en nanomedicina y nanotecnología biomédica. *Internet Electronic Journal Nanociencia et Moletrónica* **2015**, *13*, 2315. [Link]
39. Rai, M. K.; Deshmukh, S. D.; Ingle, A. P.; Gade, A. K.; Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **2012**, *112*, 841. [Crossref] [PubMed]

40. Monowar, T.; Rahman, M.; Bhore, S.; Raju, G.; Sathasivam, K.; Silver nanoparticles synthesized by using the endophytic bacterium *Pantoea ananatis* are promising antimicrobial agents against multidrug resistant bacteria. *Molecules* **2018**, *23*, 3220. [Crossref] [PubMed]
41. Das, B.; Dash, S. K.; Mandal, D.; Ghosh, T.; Chattopadhyay, S.; Tripathy, S.; Das, S.; Dey, S. K.; Das, D.; Roy, S.; Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *10*, 862. [Crossref]
42. Figueiredo, A.; Misirli, G.; Rodrigues, M.; Conte, F.; In *Anais do IV International Symposium on Immunobiological e VII Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos*, 2019. [Crossref]
43. Bocate, K. P.; Reis, G. F.; de Souza, P. C.; Oliveira Junior, A. G.; Durán, N.; Nakazato, G.; Furlaneto, M. C.; de Almeida, R. S.; Panagio, L. A.; Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. *International Journal of Food Microbiology* **2019**, *291*, 79. [Crossref] [PubMed]
44. Du, T.; Liang, J.; Dong, N.; Lu, J.; Fu, Y.; Fang, L.; Xiao, S.; Han, H.; Glutathione-capped Ag₂S nanoclusters inhibit coronavirus proliferation through blockage of viral RNA synthesis and budding. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10*, 4369. [Crossref]
45. Jeremiah, S. S.; Miyakawa, K.; Morita, T.; Yamaoka, Y.; Ryo, A.; Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2020**, *533*, 195. [Crossref] [PubMed]
46. Wong, K. K. Y.; Cheung, S. O. F.; Huang, L.; Niu, J.; Tao, C.; Ho, C.-M.; Che, C.-M.; Tam, P. K. H.; Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1129. [Crossref]
47. Hebeish, A.; El-Rafie, M. H.; EL-Sheikh, M. A.; Seleem, A. A.; El-Naggar, M. E.; Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* **2014**, *65*, 509. [Crossref] [PubMed]
48. Mohamed El-Rafie, H.; Abdel-Aziz Hamed, M.; Antioxidant and anti-inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four terminalia species. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2014**, *5*, 035008. [Crossref]
49. Sabaratnam, V.; Gurunathan, S.; Raman, J.; Abd Malek, S. N.; John, P.; Green synthesis of silver nanoparticles using *ganoderma neo-japonicum imazeki*: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine* **2013**, *8*, 4399. [Crossref]
50. Marcato, P. D.; De Paula, L. B.; Melo, P. S.; Ferreira, I. R.; Almeida, A. B. A.; Torsoni, A. S.; Alves, O. L.; In vivo evaluation of complex biogenic silver nanoparticle and enoxaparin in wound healing. *Journal of Nanomaterials* **2015**, *2015*, 1. [Crossref]
51. Rao, C. N. R.; Kulkarni, G. U.; Thomas, P. J.; Edwards, P. P.; Metal nanoparticles and their assemblies. *Chemical Society Reviews* **2000**, *29*, 27. [Crossref]
52. Duran, N.; Marcato, P.; Teixeira, Z.; Duran, M.; Costa, F.; Brocchi, M.; State of the art of nanobiotechnology applications in neglected diseases. *Current Nanoscience* **2009**, *5*, 396. [Crossref]
53. Soni, N.; Prakash, S.; Possible mosquito control by silver nanoparticles synthesized by soil fungus (*Aspergillus niger* 2587). *Advances in Nanoparticles* **2013**, *2*, 125. [Crossref].
54. Sujitha, V.; Murugan, K.; Paulpandi, M.; Panneerselvam, C.; Suresh, U.; Roni, M.; Nicoletti, M.; Higuchi, A.; Madhiyazhagan, P.; Subramaniam, J.; Dinesh, D.; Vadivalagan, C.; Chandramohan, B.; Alarfaj, A. A.; Munusamy, M. A.; Barnard, D. R.; Benelli, G.; Green-synthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector *Aedes aegypti*. *Parasitology research* **2015**, *114*, 3315. [Crossref] [PubMed]
55. Rossi-Bergmann, B.; Pacienza-Lima, W.; Marcato, P. D.; de Conti, R.; Durán, N.; Therapeutic potential of biogenic silver nanoparticles in murine cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Nano Research* **2012**, *20*, 89. [Crossref]
56. Javed, B.; Raja, N. I.; Nadhman, A.; Mashwani, Z.-R.; Understanding the potential of bio-fabricated non-oxidative silver nanoparticles to eradicate *Leishmania* and plant bacterial pathogens. *Applied Nanoscience* **2020**, *10*, 2057. [Crossref]
57. Taher Mohammed, O.; Jamal Abdulkhalq, R.; Taher Mohammed, S.; The effects of fusarium graminearum silver nanoparticles on *Leishmania tropica*. *Journal of Physics: Conference Series* **2019**, *1294*, 062075. [Crossref]
58. Fanti, J. R.; Tomiotto-Pellissier, F.; Miranda-Sapla, M. M.; Cataneo, A. H. D.; Andrade, C. G. T. de J.; Panis, C.; Rodrigues, J. H. da S.; Wowk, P. F.; Kuczera, D.; Costa, I. N.; Nakamura, C. V.; Nakazato, G.; Durán, N.; Pavanelli, W. R.; Conchon-Costa, I.; Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. *Acta tropica* **2018**, *178*, 46. [Crossref] [PubMed]
59. Soni, N.; Prakash, S.; Silver nanoparticles: a possibility for malarial and filarial vector control technology. *Parasitology Research* **2014**, *113*, 4015. [Crossref]
60. Neves Borgheti-Cardoso, L.; San Anselmo, M.; Lantero, E.; Lancelot, A.; Serrano, J. L.; Hernández-Ainsa, S.; Fernández-Busquets, X.; Sierra, T.; Promising nanomaterials in the fight against Malaria. *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, *8*, 9428. [Crossref]
61. Borase, H. P.; D Patil, C.; Phyto-synthesized silver nanoparticles: a potent mosquito biolarvicidal agent. *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery* **2013**, *03*, 1. [Crossref]
62. Neves, B. J.; Andrade, C. H.; Cravo, P. V. L.; Natural products as leads in schistosome drug discovery. *Molecules* **2015**, *20*, 1872. [Crossref]
63. Moustafa, M. A.; Mossalem, H. S.; Sarhan, R. M.; Abdel-Rahman, A. A.; Hassan, E. M.; The potential effects of silver and gold nanoparticles as molluscicides and cercaricides on *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* **2018**, *117*, 3867. [Crossref]
64. Adeyemi, O. S.; Whiteley, C. G.; Interaction of metal nanoparticles with recombinant arginine kinase from *Trypanosoma brucei*: thermodynamic and spectrofluorimetric evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, *1840*, 701. [Crossref]

65. Kittler, S.; Greulich, C.; Diendorf, J.; Köller, M.; Epple, M.; Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials* **2010**, *22*, 4548. [Crossref]
66. Singh, M.; Singh, S.; Prasad, S.; Gambhir, I. S.; Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2008**, *3*, 115. [Link]
67. Barnes, J.; Aristotle: A Very Short Introduction; Oxford University Press: Cambridge, 2000. [Crossref].
68. Molleman, B.; Hiemstra, T.; Surface structure of silver nanoparticles as a model for understanding the oxidative dissolution of silver ions. *Langmuir* **2015**, *31*, 13361. [Crossref]
69. Greulich, C.; Braun, D.; Peetsch, A.; Diendorf, J.; Siebers, B.; Epple, M.; Köller, M.; The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. *RSC Advances* **2012**, *2*, 6981. [Crossref]
70. Liu, J.; Wang, Z.; Liu, F. D.; Kane, A. B.; Hurt, R. H.; chemical transformations of nanosilver in biological environments. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9887. [Crossref].
71. Jonas, L.; Bloch, C.; Zimmermann, R.; Stadie, V.; Gross, G. E.; Schäd, S. G.; Detection of silver sulfide deposits in the skin of patients with argyria after long-term use of silver-containing drugs. *Ultrastructural Pathology* **2007**, *31*, 379. [Crossref] [PubMed]
72. Gordon, O.; Vig Slenters, T.; Brunetto, P. S.; Villaruz, A. E.; Sturdevant, D. E.; Otto, M.; Landmann, R.; Fromm, K. M.; Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54*, 4208. [Crossref]
73. Neagu, M.; Piperigkou, Z.; Karamanou, K.; Engin, A. B.; Docea, A. O.; Constantin, C.; Negrei, C.; Nikitovic, D.; Tsatsakis, A.; Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. *Archives of Toxicology* **2017**, *91*, 1031. [Crossref]
74. Liu, W.; Worms, I. A. M.; Herlin-Boime, N.; Truffier-Boutry, D.; Michaud-Soret, I.; Mintz, E.; Vidaud, C.; Rollin-Genetet, F.; Interaction of silver nanoparticles with metallothionein and ceruloplasmin: impact on metal substitution by Ag(I), corona formation and enzymatic activity. *Nanoscale* **2017**, *9*, 6581. [Crossref] [PubMed]
75. Cai, R.; Chen, C.; The crown and the scepter: roles of the protein corona in nanomedicine. *Advanced materials* **2019**, *31*, 1805740. [Crossref] [PubMed]
76. Huang, H.; Lai, W.; Cui, M.; Liang, L.; Lin, Y.; Fang, Q.; Liu, Y.; Xie, L.; An evaluation of blood compatibility of silver nanoparticles. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 25518. [Crossref]
77. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S.; Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 2050. [Crossref]
78. Melo, P. S.; Marcato, P. D.; Huber, S. C.; Ferreira, I. R.; Paula, L. B. D.; Almeida, A. B. A.; Durán, N.; Torsoni, S.; Seabra, A. B.; Alves, O. L.; Nanoparticles in treatment of thermal injured rats: is it safe? *Journal of Physics: Conference Series* **2011**, *304*, 012027. [Crossref]
79. Munger, M. A.; Radwanski, P.; Hadlock, G. C.; Stoddard, G.; Shaaban, A.; Falconer, J.; Grainger, D. W.; Deering-Rice, C. E.; In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2014**, *10*, 1. [Crossref]
80. NICNAS. Nano Silver - NICNAS Nanomaterial health hazard review: health effects of silver nanoparticles Disponível em: <<https://www.nicnas.gov.au/chemical-information/factsheets/chemical-name/Nano-Silver>> . Acesso em: 09 outubro 2019.
81. Durán, N.; Rolim, W.; Durán, M.; Fávoro, W.; Seabra, A.; Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. *Química Nova* **2018**, *42*, 206. [Crossref]
82. Carlson, C.; Hussain, S. M.; Schrand, A. M.; K. Braydich-Stolle, L.; Hess, K. L.; Jones, R. L.; Schlager, J. J.; Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 13608. [Crossref] [PubMed]
83. AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S.; Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279. [Crossref]
84. Gogoi, S. K.; Gopinath, P.; Paul, A.; Ramesh, A.; Ghosh, S. S.; Chattopadhyay, A.; Green fluorescent protein-expressing escherichia coli as a model system for Investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir* **2006**, *22*, 9322. [Crossref]
85. Keyer, K.; Imlay, J. A.; Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 13635. [Crossref] [PubMed]
86. Todar, K.; Structure and function of bacterial cells. Disponível em: http://www.textbookofbacteriology.net/structure_7.html. Acesso em: 21 agosto 2020.
87. Wakshlak, R. B.-K.; Pedahzur, R.; Avnir, D.; Antibacterial activity of silver-killed bacteria: The “Zombies” Effect. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 9555. [Crossref]
88. Mori, Y.; Ono, T.; Miyahira, Y.; Nguyen, V. Q.; Matsui, T.; Ishihara, M.; Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A Virus. *Nanoscale Research Letters* **2013**, *8*, 93. [Crossref]
89. Elechiguerra, J. L.; Burt, J. L.; Morones, J. R.; Camacho-Bragado, A.; Gao, X.; Lara, H. H.; Yacaman, M. J.; Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology* **2005**, *3*, 6. [Crossref]
90. Rogers, J. V.; Parkinson, C. V.; Choi, Y. W.; Speshock, J. L.; Hussain, S. M.; A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation. *Nanoscale Research Letters* **2008**, *3*, 129. [Crossref]
91. Morris, D.; Ansar, M.; Speshock, J.; Ivancic, T.; Qu, Y.; Casola, A.; Garofalo, R.; Antiviral and immunomodulatory activity of silver nanoparticles in experimental RSV infection. *Viruses* **2019**, *11*, 732. [Crossref] [PubMed]
92. Khandelwal, N.; Kaur, G.; Kumar, N.; Tiwari, A.; Application of silver nanoparticles in viral inhibition: A New Hope for

- Antivirals. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **2014**, *9*, 175.
93. Baram-Pinto, D.; Shukla, S.; Perkas, N.; Gedanken, A.; Sarid, R.; Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 1497. [Crossref]
 94. Speshock, J. L.; Murdock, R. C.; Braydich-Stolle, L. K.; Schrand, A. M.; Hussain, S. M.; Interaction of silver nanoparticles with tacaribe virus. *Journal of Nanobiotechnology* **2010**, *8*, 1. [Crossref]
 95. Castillo, P. M.; Herrera, J. L.; Fernandez-Montesinos, R.; Caro, C.; Zaderenko, A. P.; Mejías, J. A.; Pozo, D.; Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by toll-like receptor ligands. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 627. [Crossref] [PubMed]
 96. Luo, Y.-H.; Chang, L. W.; Lin, P.; Metal-based nanoparticles and the immune system: activation, inflammation, and potential applications. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, 1. [Crossref]
 97. Xiang, D.; Zheng, Y.; Duan, W.; Li, X.; Yin, J.; Shigdar, S.; O'Connor, M. L.; Marappan, M.; Zhao, X.; Miao, Y.; Xiang, B.; Zheng, C.; Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine* **2013**, *8*, 4103. [Crossref] [PubMed]
 98. Balagna, C.; Perero, S.; Percivalle, E.; Nepita, E. V.; Ferraris, M.; Virucidal effect against coronavirus SARS-CoV-2 of a silver nanocluster/silica composite sputtered coating. *Open Ceramics* **2020**, *1*, 100006. [Crossref]
 99. Hall, J. B.; Dobrovolskaia, M. A.; Patri, A. K.; McNeil, S. E.; Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 789. [Crossref]
 100. Misirli, G. M.; Dissertação de Mestrado: Produção e controle sanitário de nanopartículas de prata (prata coloidal), INCQS/FIOCRUZ, 2021. [[Link](#)]
 101. Souza, J. N.; *Trabalho de Conclusão de Curso*, Farmanguinhos/FIOCRUZ, 2014. [[Link](#)]
 102. Grillet, N.; Manchon, D.; Cottancin, E.; Bertorelle, F.; Bonnet, C.; Broyer, M.; Lermé, J.; Pellarin, M.; Photo-oxidation of individual silver nanoparticles: a real-time tracking of optical and morphological changes. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 2274. [Crossref]
 103. Liu, J.; Hurt, R. H.; Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science & Technology* **2010**, *44*, 2169. [Crossref]
 104. Jin, R.; Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *Science* **2001**, *294*, 1901. [Crossref] [PubMed]
 105. Cheng, Y.; Yin, L.; Lin, S.; Wiesner, M.; Bernhardt, E.; Liu, J.; Toxicity reduction of polymer-stabilized silver nanoparticles by sunlight. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 4425. [Crossref]
 106. Grillet, N.; Réponse optique de nano-objets uniques d'argent: couplage plasmonique et photooxydation, Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. [[Link](#)]
 107. Meng, E.; Zhang, Q.; Liu, F.; Peretyazhko, T. S.; *Em Silver nanoparticles for antibacterial devices: biocompatibility and toxicity*; Cao, H., Org.; 1^a ed, CRC Press: Boca Raton, 2017.
 108. Peretyazhko, T. S.; Zhang, Q.; Colvin, V. L.; Size-controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: kinetics and size changes. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, 11954. [Crossref]
 109. Sharma, V. K.; Siskova, K. M.; Zboril, R.; Gardea-Torresdey, J. L.; Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, *204*, 15. [Crossref] [PubMed]
 110. Zhang, W.; Yao, Y.; Sullivan, N.; Chen, Y.; Modeling the primary size effects of citrate-coated silver nanoparticles on their ion release kinetics. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, 4422. [Crossref]
 111. Bhattacharjee, S.; DLS and zeta potential – what they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 337. [Crossref] [PubMed]
 112. Chakraborty, S.; Panigrahi, P. K.; Stability of Nanofluid: A Review. *Applied Thermal Engineering* **2020**, *174*, 115259. [Crossref]
 113. Midelet, J.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T.; Kanaras, A. G.; Werts, M. H. V.; The sedimentation of colloidal nanoparticles in solution and its study using quantitative digital photography. *Particle & Particle Systems Characterization* **2017**, *34*, 1700095. [Crossref]