UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA CENTRO UNIVERSITÁRIO ESTADUAL DA ZONA OESTE PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA TRANSLACIONAL

Yuri Komatsu Damas Abud

Avaliação do efeito de nanopartículas de cloreto de prata e de prata na estrutura celular de bactérias e células de mamíferos

> DUQUE DE CAXIAS 2021

Yuri Komatsu Damas Abud

Avaliação do efeito de nanopartículas de cloreto de prata e de prata na estrutura celular de bactérias e células de mamíferos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Biomedicina Translacional -Biotrans, Universidade do Grande Rio -Unigranrio, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Inmetro, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - Uezo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biomedicina.

Orientador: Dr. Celso Sant'Anna de Barbosa Filho

DUQUE DE CAXIAS 2021

YURI KOMATSU DAMAS ABUD

Avaliação do efeito de nanopartículas de cloreto de prata e de prata na estrutura celular de bactérias e células de mamíferos

Tese de doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Biomedicina Translacional
Biotrans, Universidade do Grande Rio - Unigranrio, Instituto Nacional de Metrologia,
Qualidade e Tecnologia, Inmetro, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - Uezo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biomedicina.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Leandro Lemgruber Universidade de Glasgow

Dr^a. Emile Santos Barrias Inmetro

> Dr. Sérgio Seabra UEZO

Dr Luiz Maurício Trambaioli

UFRJ

Agradecimentos

Agradeço a toda minha família e, em especial, à minha mãe Ludmila que, por toda minha vida, foi minha referência. Em você, mãe, pude encontrar todo o apoio e afeto que acalmaram meu ímpeto melancólico e autodestrutivo.

Ao meu orientador Celso por ter sido muito mais do que somente um orientador em toda minha carreira científica. Nosso relacionamento de mais de dez anos é de longe o mais duradouro de minha vida. Ao seu lado, pude crescer como pessoa e como cientista. Nossas divergências científicas e ideológicas formaram um ambiente fértil para conversas e debates, sendo tudo isso essencial à minha formação.

Aos membros do meu laboratório que proporcionaram uma agradável e produtiva rotina diária.

A todo meu grupo de pesquisa, vocês foram extremamente essenciais em todo o meu trabalho.

Em especial, agradeço: (1) à Nathália Muller e sua aluna Fernanda por todo o apoio com a cultura de células, por toda nossa amizade e principalmente por nossas conversas regadas a café em nossa copinha; (2) a Mateus Eugênio por todo apoio em experimentos e pela nossa amizade de muitos anos; (3) à Thais e Michele por todo apoio com a cultura de células.

Ao Inmetro e à Capes pelo apoio financeiro.

Epígrafe

"Para criaturas pequenas como nós, a vastidão é suportável somente através do amor." Carl Sagan

Resumo

As nanopartículas à base de prata apresentam potencial na indústria, principalmente devido a seu enorme potencial antimicrobiano. No presente trabalho, duas nanopartículas à base de prata, a de cloreto de prata (AgCl-NPs) e a de prata metálica (AgNPs), foram utilizadas. As AgCl-NPs foram usadas não só para a avaliação de efeito morfológico em bactérias, mas para também estudar sua interação com células de mamífero (tumorais e não tumorais). Não só a interação de NPs com células é pouco estudada como a forma de entrada em células também se mostra de forma nebulosa. Trabalhos apontam para a captação por endocitose, no entanto estima-se que as NPs entrem também de outras formas como difusão ou por meio de poros. Tendo em vista esse cenário, foi investigado por microscopia óptica, eletrônica e força atômica o efeito do tratamento com AgCl-NPs e AgNPs em bactérias e células tumorais e não tumorais, tendo como foco modificações morfológicas e ultraestruturais. Nossos dados mostram AgCl-NPs interagindo com o DNA bacteriano, causando o surgimento de regiões eletrolucentes no interior da bactéria, e parede celular causando a formação de poros. Em células de mamíferos, as AgCl-NPs causaram danos à integridade da membrana plasmática, vacuolização elevada no citoplasma e indução de morte celular. Modificações morfológicas foram observadas após tratamento com NPs indicando uma possível reorganização do citoesqueleto. Nas análises ultraestruturais, as AgCl-NPs foram vistas no interior de células tratadas dentro de possíveis vesículas endocíticas. AgNPs sintetizadas quimicamente foram utilizadas para aprimorar o entendimento do efeito do tratamento em células tumorais e não tumorais. Foi visto que as AgNPs diminuíram a viabilidade e proliferação de células não tumorais (HFF-1) e tumorais (U87), no entanto apresentaram IC₅₀ consideravelmente menor em células tumorais se apresentando como um tratamento seletivo. As AgNPs causaram também mudanças nanomecânicas e morfológicas na superfície das células estudadas mostrando que afetam diretamente estruturas mecânicas das células e suas propriedades físicas. Em conclusão, os dados obtidos indicam que as AgCl-NPs e AgNPs são consideravelmente tóxicas para microrganismos e células de mamíferos, apresentando uma maior toxicidade e mudanças morfológicas mais extensas em células tumorais. Esses fatos demonstram a necessidade de um amplo estudo da interação das NPs à base de prata com células, levando em consideração seus vários mecanismos toxicológicos e suas formas de entrada.

Abstract

Silver-based nanoparticles have potential in the industry, mainly due to their enormous antimicrobial potential. In the present work, two silver-based nanoparticles, the silver chloride (AgCl-NPs) and the metallic silver (AgNPs), were used. AgCl-NPs were used not only to evaluate the morphological effect in bacteria, but also to study their interaction with mammalian cells (tumoral and non-tumoral). Not only is the interaction of NPs with cells poorly studied, but the way in which cells enter is also nebulous. Studies point to uptake by endocytosis, however it is estimated that NPs also enter in other ways such as diffusion or through pores. In view of this scenario, the effect of treatment with AgCl-NPs and AgNPs on tumoral and non-tumoral cells and bacteria was investigated by optical microscopy, electron microscopy and atomic force microscopy, focusing on morphological and ultrastructural changes. Our data show AgCl-NPs interacting with bacterial DNA, causing the appearance of electrolucent regions inside the bacteria, and cell wall causing the formation of pores. In mammalian cells, AgCl-NPs caused damage to the integrity of the plasma membrane, high vacuolization in the cytoplasm and induction of cell death. Morphological changes were observed after treatment with NPs indicating a possible reorganization of the cytoskeleton. In ultrastructural analyzes, AgCl-NPs were seen inside treated cells within possible endocytic vesicles. Chemically synthesized AgNPs were used to improve the understanding of the treatment effect on tumor and non-tumor cells. It was seen that AgNPs decreased the viability and proliferation of non-tumor cells (HFF-1) and tumor cells (U87), however they presented considerably lower IC 50 in tumor cells presenting themselves as a selective treatment. AgNPs also caused nanomechanical and morphological changes on the surface of the studied cells, showing that they directly affect the mechanical structures of the cells and their physical properties. In conclusion, the data obtained indicate that AgCl-NPs and AgNPs are considerably toxic to microorganisms and mammalian cells, presenting greater toxicity and more extensive morphological changes in tumor cells. These facts demonstrate the need for a broad study of the interaction of silver-based NPs with cells, taking into account their various toxicological mechanisms and their forms of entry.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura1: Esquema representando áreas da nanotecnologia14
Figura 2: Esquema representando os fatores determinantes das propriedades das nanopartículas
Figura 3: Esquema apresentando os tipos de nanopartículas metálicas17
Figura 4: Esquema representativo dos métodos de síntese de nanopartículas18
Figura 5: Esquema mostrando redução de íon metálico19
Figura 6: Esquema mostrando possíveis ações de nanopartículas e íons20
Figura 7: Esquema mostrando mecanismos de resistência bacteriana21
Figura 8: Mecanismo de toxicidade proposto para nanopartículas de prata em células eucariotas
Figura 9: Imagem representativa da morfologia de nanopartículas de cloreto de prata40
Figura 10: Análises de diâmetro de partículas e fator de forma (circularidade) por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das AgCl-NPs40
Figura 11: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de bactérias Pseudomonas41
Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras (bactérias Pseudomonas Aerugiosa)43
Figura 13: Imagem representativa mostrando a segmentação dos poros encontrados na superfície de bactérias P. Aerugiosa44
Figura 14: Histograma de percentual de frequência de áreas de poros encontrados em superfícies de bactérias44
Figura 15: Concentração (eixo x) de AgNPs em relação a atividade, viabilidade (eixo y)44
Figura 16: Imagens de microscopia de contraste interferencial (A-D) de células (HFF-1)
Figura 17: Imagens de microscopia óptica de fluorescência e eletrônica de varredura de células (HFF-1) de microscopia48
Figura 18: Imagens de microscopia de força atômica de células (LLC-MK2)50
Figura 19: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células LLC- MK ₂
Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células LLC- MK ₂

Figura 21: Micrografias de MET de células LLC-MK254
Figura 22: Espectroscopia de Raio-X por dispersão em energia no microscópio eletrônico de varredura (MEV)55
Figura 23: AgNps depositadas em alça de náilon, padrão de difração de raios-X da amostra e difgratograma de raio-x56
Figura 24: Gráficos de tamanho de AgNPs dispersas em água e meios58
Figura 25: Imagens representativas da análise de alto conteúdo em células HFF-1 e U8759
Figura 26: Gráficos de proliferação das células HFF-161
Figura 27: Gráficos de proliferação das células U8761
Figura 28: Gráfico mostrando o IC50 de células HFF-1 e U87 em função do tempo
Figura 29: Inibição da proliferação de células HFF-163
Figura 30: Inibição da proliferação de células U8763
Figura 31: Gráficos de Taxa de crescimento e tempo de duplicação referentes às células HFF-1 e U8765
Figura 32: Gráficos de área de Núcleo e intensidade de fluorescência de células HFF- 1
Figura 33: Gráficos de área de Núcleo e intensidade de fluorescência de células U8769
Figura 34: Gráficos de viabilidade (concentração x viabilidade) de células HFF-1 e U8770
Figura 35: Microscopia óptica de células HFF-171
Figura 36: Gráfico da área de células HFF-1 e U8772
Figura 37: imagens de microscopia eletrônica de varredura de células HFF-174
Figura 38: Imagens de microscopia eletrônica de varredura utilizando o sinal retroespalhado de células HFF-175
Figura 39: Imagens de microscopia eletrônica de varredura utilizando o sinal retroespalhado de células U8776
Figura 40: Imagens de células HFF-1 de microscopia de força atômica78
Figura 41: Imagens de células U87 de microscopia de força atômica79
Figura 42: Imagens de topografia de imagens de células HFF-1 e U8780
Figura 43: Medida do diâmetro dos poros das células HFF-1 e U8781

Figura 44: Imagem representativa de AFM mostrando regiões perinucleares periféricas	e 2
Figura 45: Gráficos de viabilidade e rugosidade média em função de tempo d	e
células HFF-1 e U878	2
Figura 46: Mapas de força de AFM de células HFF-18	4
Figura 47: Gráficos de adesão e rigidez de células HFF-1 com AgNPs e imagens d	e
topografia de células HFF-18	6
Figura 48: Prancha contendo imagens de AFM de células U87 nas regiõe	S
perinucleares	8
Figura 49: Gráficos de adesão e rigidez de células HFF-19	0
Tabela 1: Tabela mostrando os valores calculados de IC50 para as células HFF-1 e	
U8761	l
Tabela 2: Área dos núcleos de células HFF-1 e U876	6
Tabela 3: Intensidade de fluorescência de células HFF-1 e U87	5

Lista de Abreviações

NPs - Nanopartículas

AgCl-NPs - Nanopartículas de cloreto de prata

AgNPs – Nanopartículas de prata

AuNPs - Nanopartículas de ouro

CuNPs - Nanopartículas de cobre

IC50 - do inglês, Inibitory Concentration of 50%, concentração inbitória de 50%

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

DIC – Do inglês, *Differential Interference Contrast*, microscopia de contraste interferencial

AFM- Do inglês, Atomic Force Microscopy, microscopia de força atômica

DLS - Do inglês, Dynamic Light Scatterinng, espalhamento de luz dinâmico

IC50 - do inglês, Inibitory Concentration of 50%, concentração inbitória de 50%

DMEM- do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, meio modificado Eagle Dulbecco

DMSO- Dimetilsulfóxido

MTT- (4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-Brometo de Difeniltetrazólio

RPMI- do inglês, Roswell Park Memorial Institute, Instituto Memorial Roswell Park

DNA – Do inglês, *Deoxyribonucleic A cid*, Ácido desoxirribonucleico.

GBM - Glioblastoma multiforme

1- Introdução14								
1.1-Nanotecnologia14								
1.2- Nanobiotecnologia15								
1.3- Nanopartículas1								
1.4- Síntese de Nanopartículas Metálicas1.5- Aplicações Biomédicas de Nanopartículas Metálicas								
								1.6- Mecanismos propostos de ação antimicrobiana de nanopartículas metálicas
1.7- Mecanismos de resistência bacteriana21								
1.8– Mecanismos propostos de ação em células eucariotas de nanopartículas metálicas								
1.9- Nanopartículas de prata e nanopartículas de cloreto de prata23								
1.10- Neoplasias e potencial antitumoral de AgNPs24								
1.11- Glioblastoma multiforme25								
2- Justificativa								
3- Objetivos Caraia								
3.1- Objetivos Gerais								
5.2- Objetivos Especificos20								
4- Metodologia								
4- Metodologia29 4.1- Cultivo de células								
 4- Metodologia								
 4- Metodologia								
 4- Metodologia								
 4- Metodologia								
 4- Metodologia								

Sumário

	4.3-	Avaliação	de	efeito	antitumoral	de	AgNPs	quimicamente
	sinter	tizadas	••••••	••••••		•••••		
6- Dis	scussão		•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	91
7- Co	nclusõ	es	•••••			•••••	•••••	97
8- Re	ferênci	as Bibliográf	icas	••••••	••••••	•••••	•••••	

1- Introdução

1.1 - Nanotecnologia

Nanotecnologia se caracteriza como um campo multidisciplinar teórico e experimental aplicado a ciências e tecnologia. Na prática, ela se caracteriza como o controle e exploração da matéria em uma escala de magnitude abaixo de 100 nanômetros (CRUZ, 2010). A ideia inicial de nanotecnologia foi posta em evidência em 1961 através de Richard Feynman, físico do Caltech, que em seu trabalho descreveu a ideia de criar matéria de maior magnitude através de pequenas porções (átomo por átomo) (DREXLER, 2004). Desde o sécuçlo 17 até o atual momento, a nanotecnologia muito se desenvolveu e nanomateriais (materiais na escala nanométrica) vêm sendo aplicados em diversas áreas (Fig.1) de conhecimento. Essa expansão deu origens a novas áreas como, por exemplo, a nanomedicina, ou seja, o uso de nanomateriais com finalidade médica.



Figura 1: Esquema representando alguma das possíveis áreas de aplicação de nanomateriais. (Fonte: Elaborado pelo au**t**or)

Muitos foram os nanomateriais desenvolvidos com o advento da nanotecnologia, podendo ser divididos de acordo com o número de dimensões que não estão na escala nanométrica, são eles: zero dimensões, nanopartículas e quantum dots; uma dimensão, nanotubos, nanobastões e nanocamadas; duas dimensões, nanofilmes e nanocamadas (KOLAHALAM *et al.*, 2019).

Apesar da Nanotecnologia ser uma ciência recente, essa área tem atraído muitos pesquisadores de todo o mundo, esse fato se deve principalmente aos nanomateriais e suas mais diversas propriedades que, muitas vezes, não podem ser encontradas em materiais na escala macrométrica. Devido a essas características, a Nanotecnologia é considerada a ciência do futuro (BUZEA *et al.*, 2007).

1.2 - Nanobiotecnologia

A biotecnologia e a nanotecnologia são duas das tecnologias mais promissoras do século 21. Nanotecnologia é definida como o *design*, desenvolvimento e aplicação de materiais e dispositivos cuja composição está em escala nanométrica. Geralmente, a nanotecnologia lida com o desenvolvimento de materiais, dispositivos ou outras estruturas que possuem pelo menos uma dimensão de 1 a 100 nanômetros. Enquanto isso, a Biotecnologia lida com processos metabólicos e outros processos fisiológicos de assuntos biológicos, incluindo microrganismos. A associação dessas duas tecnologias, ou seja, a nanobiotecnologia, pode desempenhar um papel vital no desenvolvimento e implementação de muitas ferramentas úteis nas ciências da saúde (FAKRUDIN et al., 2012). O termo nanobiotecnologia é atualmente usado para descrever qualquer aplicação da nanotecnologia na pesquisa biológica e os exemplos dessa aplicação são diversos e podem ser vistos em desenvolvimento e distribuição de fármacos, entrega de genes, diagnóstico de doenças, desenvolvimento de novos tratamentos e desenvolvimento de matérias biocompatíveis e biomateriais (MAJEED et al., 2019).

1.3 - Nanopartículas

Nanopartículas (NPs) são definidas como partículas que apresentam dimensões menores que 100 nanômetros (THAKKAR et *al.*, 2010). Esse tipo de material tem propriedades físicas extremamente ligadas à sua morfologia e composição, seu tamanho diminuto e alta relação superfície/volume por exemplo são tidos como vantagens desse tipo de material (RATYAKSHI & CHAUHAN, 2009). Essas características podem ser divididas em quatro principais grupos: tamanho, material, superfície e formato (Fig.2). Essas características influenciam totalmente a ação dessas NPs e devem ser moduladas

de acordo com o uso pretendido. Dentre os tipos de nanopartículas, as nanopartículas metálicas se destacam pela grande quantidade de aplicações.



Figura 2: Esquema representando os fatores determinantes das propriedades das nanopartículas. (Fonte: WANG, 2016)

As nanopartículas metálicas se caracterizam como estruturas coloidais formadas por diversos tipos de metais e são comumente divididas em três grandes grupos: metais nobres, magnéticas e semicondutoras (Fig.3). Uma característica relevante de NPs metálicas é a absorção de luz na faixa do visível variável de acordo com tamanho e forma (ZHANG & NOGUEZ, 2008). Esse efeito óptico está relacionado ao confinamento quântico das NPs e às mudanças na ressonância plasmônica superficial das mesmas que ocorrem devido ao tamanho diminuto de sua superfície e seus elétrons livres na banda condutora (típico de superfícies de metais). O efeito de ressonância entre os elétrons de metais como ouro e prata e a radiação eletromagnética incidente gera absorções variáveis e específicas (BARNES *et al.*, 2003).



Figura 3: Esquema apresentando os tipos de nanopartículas metálicas. Modificado de KHANNA, (2019)

1.4-Síntese de Nanopartículas Metálicas

A preparação de nanopartículas é realizada através de (i) síntese de nanopartículas ou (ii) processamento de nanomateriais em partículas nanoestruturadas. A síntese pode ainda ser química, física ou biológica (VITHIYA & SEN, 2011). Os tipos de síntese podem ser divididos em duas grandes classificações, são elas: *botton to up* (de baixo para cima) e *top to botton* (de cima pra baixo) (Fig.4). A classificação *botton to up* compreende as sínteses químicas e biológicas que induzem a formação de coloides metálicos e a classificação *top to botton* compreende sínteses químicas e físicas que promovem a degradação de materiais de magnitude menor em nanopartículas.



Figura 4: Esquema representativo dos métodos de síntese de nanopartículas. O processo de síntese é categorizado em dois processos: "Bottom to up" e o "Top to Bottom" (Modificado de AHMED *et al*, 2016).

Dentro da síntese física, a evaporação-condensação e ablação a laser são as abordagens mais utilizadas. A ausência de contaminação do solvente nos filmes finos preparados e a uniformidade de distribuição de NPs são as vantagens dos métodos de síntese físicas, em comparação com os processos químicos e biológicos (IVARANI *et al.*, 2014).

Na síntese química, a abordagem mais comum é a redução química por agentes redutores orgânicos e inorgânicos, agentes esses que são usados para a redução de íons metálicos em soluções aquosas ou não-aquosas (IVARANI *et al.*, 2014). Os agentes redutores reduzem os íons e levam à formação do metal que se aglomera podendo formar colóides, ou seja, NPs (IVARANI *et al.*, 2014).

A síntese biológica é um processo considerado "verde", ambiental e economicamente amigável, que não utiliza produtos químicos nos protocolos de síntese e sim organismos (VIGNESHWARAN *et al.*, 2007). Os organismos usados na síntese produzem biomoléculas como proteínas capazes de reduzir íons metálicos que posteriormente se aglomeram formando um colóide metálico (Fig.5). O potencial de

organismos na síntese de nanopartículas varia de células bacterianas procarióticas simples para fungos e plantas eucarióticas. Existem diversos exemplos de produção de nanopartículas de ouro, prata, cádmio, zinco, magnetita com o uso de bactérias, fungos e algas e até mesmo plantas (DHILON *et al.*, 2011).



Figura 5: Esquema mostrando o íon metálico (M) sendo reduzido por componentes orgânicos como macromoléculas, a nucleação da nanopartícula e sua estabilização formando um colóide metálico. Modificado de MITTAL *et al.*, (2013).

1.5 – Aplicações Biomédicas de Nanopartículas Metálicas

Dentre as aplicações biomédicas das NPs se destacam o uso como nanocarreadores na entrega de drogas, filmes finos e em arcabouços nanoestruturados para implantes de tecidos (KRUMOV *et al.*, 2009). Algumas NPs metálicas têm capacidade antimicrobiana e, portanto, vastamente empregadas na indústria na confecção de roupas, eletrodomésticos, utensílios hospitalares e outros. Algumas das nopartículas mais investigadas são as nanopartículas à base de prata que são amplamente conhecidas por suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas (MIAZEK *et al.*, 2015). Temos inúmeros exemplos de atividade antibacteriana de NPs de prata (PANÁCEK *et al.*, 2006; LOK *et al.*, 2007), de cloreto de prata (GOPINATH *et al.*, 2013; TRINH *et al.*, 2015), de cobre (RUPARELIA *et al.*, 2008) e também de ouro (GEETHALAKSHMI & SARADA, 2013). Nanopartículas de prata (JO *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2014), cobre (WEI *et al.*, 2010) e ouro (GEETHALAKSHMI & SARADA, 2013) também possuem ação antifúngica comprovada.

1.6 - Mecanismos propostos de ação antimicrobiana de nanopartículas metálicas

Até hoje, na literatura, todas as teorias que explicam o mecanismo de ação antibacteriana de NPs metálicas indicam que o processo começa com a interação entre as NPs ou os íons dissociados com a parede celular resultando em um dano na mesma e uma possível via de entrada. O poro causado pela interação das NPs com a parede celular causaria não só a entrada de partículas por influxo como o extravasamento de constituintes intracelulares (SLAVIN *et al.*, 2017). Após a penetração das NPs, elas provocariam danos a estruturas celulares como ribossomos e macromoléculas como DNA e proteínas (DAKAL *et al.*, 2016). O processo toxicológico se iniciaria com a geração de espécies reativas de oxigênio como consequência do mau funcionamento e inibições dos componentes celulares como, por exemplo, desidrogenases respiratórias levando a uma interrupção na cadeia respiratória (THOMBRE *et al.*, 2016).



Figura 6: Esquema mostrando possíveis ações de nanopartículas e íons. (A) Ruptura da parede celular permitindo influxo de NPs e saída de conteúdo celular. (B) Interação com membrana plasmática promovendo descolamento da parede celular. (C) Interação com DNA podendo aumentar a produção de ROS. (D) Formação de novos poros após interação. (E) Interação com ribossomo causando inibição de sua função e levando à má formação, à inibição de proteínas e ao aumento na produção de ROS. (F) Produção de ROS. (G) Interação com proteínas podendo levar a dano estrutural, inibição e perda de função. (Fonte: SLAVIN *et al.*, 2017)

1.7 - Mecanismos de resistência Bacteriana

Resistência a agentes antimicrobianos se tornou a maior causa de morbidade e mortalidade do mundo (REYGAERT, 2018). Com o advento dos antibióticos, o mundo imaginou ter vencido a luta contra bactérias, no entanto, logo foi descoberto que bactérias são capazes de desenvolver resistência aos fármacos. A resistência bacteriana agrava radicalmente a capacidade de sistemas de saúde em combater infecções que podem ser adquiridas de formas convencionais ou fruto de imunodepressões, cirurgias e procedimentos médicos no geral (OLIVEIRA, 2010). Os principais mecanismos de resistência bacteriana são o impedimento da entrada das drogas, a modificação dos alvos das drogas, inativação das drogas e efluxo das drogas (Fig.7). Todos esses mecanismos citados podem ser características inerentes aos microrganismos ou então adquiridos de outros microrganismos.



Figura 7: Esquema mostrando mecanismos de resistência bacteriana. Modificado de REYGAERT, (2018).

1.8 – Mecanismos propostos de ação em células eucariotas de nanopartículas metálicas

Apesar da pesquisa com nanoparticulas e nanomateriais metálicos crescer exponencialmente, os estudos relativos à possível toxicidade desses materiais ainda se mostram muito iniciais carecendo de mais certezas (ELSAESSER & HOWARD, 2012). Muito pouco se sabe relativo aos efeitos desses materiais a nível celular. As vias de entrada na célula e os impactos dessa entrada para a saúde humana precisam ser investigados com devida seriedade.

Temos de evidenciar que a toxicidade de NPs em geral está fortemente associada a suas características como tamanho, estabilidade e possível revestimento; no entanto, nos ateremos a mecanismos gerais ligados a NPs a base de prata não revestidas, o tipo de NPs que será usado em nosso estudo. Quando se trata de NPs à base de prata, ainda é uma difícil tarefa a atribuição ao causador dos efeitos toxicológicos. Muitos dos efeitos podem ser atribuídos tanto ao nanomaterial quanto à dissociação dos íons de prata (MCSHAM *et al.*, 2014).

Apesar de não detalhada, a existência ou não de um mecanismo de mediação já foi constatado em diversos trabalhos que NPs entram em células de mamíferos via endocitose e fagocitose (LIU *et al.*, 2010; GREULICH *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012). As NPs à base de prata foram vistas associadas a organelas ligadas à via endocítica como lisossomos e a outras importantes organelas como complexo de golgi, retículos endoplasmáticos e mitocôndrias dando suporte à teoria dessa via de entrada (GREULICH *et al.*,2011). Após sua entrada, as NPs podem interagir diretamente com diversos componentes celulares ou se dissociar em íons. (MCSHAM *et al.*, 2014)

São muitos os possíveis alvos de interação dos íons e NPs de prata no ambiente intracelular destacando a interação com a membrana plasmática da célula, diversas organelas e como macromoléculas como DNA e Proteínas estruturais (ELSAESSER & HOWARD, 2012).

É proposto que os danos sofridos pelos componentes celulares no geral possam ser divididos em danos por ação direta, liberação de íons ou por oxidação devido a espécies reativas de oxigênio (MCSHAM *et al.*, 2014). Uma vez em contato com a membrana, as NPs e os íons entrariam por endocitose ou difusão (somente íons) e também desencadeariam vias de sinalização (ASHARANI *et al.*, 2009). As NPs e íons adentrados por difusão interagiriam com os componentes celulares já citados; no entanto, acredita-se que os que adentrassem pela via endocítica levariam a uma disfunção mitocondrial (Fig. 8). Essa seria a principal fonte de formação de ROS.



Figura 8: Mecanismo de toxicidade proposto para nanopartículas de prata em células eucariotas. Modificado de ASHARANI *et al.*, (2009).

1.9 - Nanopartículas de prata e nanopartículas de cloreto de prata

Nanopatículas de Prata (AgNPs) são as nanopartículas metálicas mais abundantemente usadas na indústria (XU *et al.*, 2013). As AgNPs possuem ampla aplicação nas áreas da saúde, bem-estar e industrial devido a suas propriedades físicas, químicas e biológicas (ZHANG *et al.*, 2016). O principal motivo do uso de AgNPs se dá devido às suas ações antimicrobianas e a aplicação já pode ser vista em roupas, eletrodomésticos, produtos hospitalares e muitos outros (SYAFIUDDIN *et al.*, 2017). A síntese de AgNPs ocorre basicamente de três formas: física, química e biológica. Os métodos físicos e químicos são numerosos e muitos desses métodos são caros ou usam substâncias tóxicas, e esses fatores os tornam métodos de síntese menos favorecidos (PRABHU *et al.*, 2012). A síntese biológica se caracteriza como uma ótima alternativa.

A ação antibacteriana de AgNps é muito bem conhecida tanto em bactérias grampositivas quanto em gram-negativas e já foi vista em diversos trabalhos como GURUNATHAN *et al.*, (2014), THOMBRE *et al.* e (2016), XU *et al.*, (2013). A Ação antifúngica de AgNPs pode ser vista em (MUÑOZ *et al.*, (2014) e XU *et al.* (2016) mostrando uma efetividade quando testada em diversas espécies de fungos filamentosos e leveduras. Existem poucos trabalhos demonstrando o efeito antiviral (KHALID *et al.* 2017; SUJITHA *et al.* 2015) e antiparasitário (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2011; CAMERON *et al.*, 2016; GAAFAR *et al.* 2014) de AgNPs.

Nanopartículas de Cloreto de Prata (AgCl-NPs) são muito semelhantes a AgNps, porém diferentemente apresentam o elemento cloro em sua composição. A síntese dessas Nps também se assemelha muito a AgNps podendo se encontrar na literatura trabalhos que descrevem sínteses biológicas (HUO *et al*, 2018; FERREIRA et al., 2016; HU *et al.*, 2009), químicas (ZHU *et al.*, 2012; SIDDIQUI *et al.*, 2013) e físicas (MAHMOOD *et al.*, 2016; OSEGUERA-GALINDO *et al.*, 2016)

A ação antibacteriana de AgCl-NPs já foi comprovada em trabalhos como GOPINATH *et al.* (2013), INIYAN *et al.*, (2017) e FERREIRA *et al.*, (2017) onde as NPs foram eficientes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. A ação antifúngica de AgCl-NPs foi demonstrada por PAULKUMAR *et al.* (2013) contra leveduras e fungos filamentosos e somente contra levedura em XIA *et al.*, (2016).

No geral, existem ainda muito poucos estudos referentes ao potencial biomédico de AgCl-NPs e os que existem são relacionados majoritariamente aos seus potenciais antibacterianos e antifúngicos.

1.10 - Neoplasias e potencial antitumoral de AgNPs

As células tumorais são definidas por duas características hereditárias: (1) reproduzem-se sem obedecer aos limites da divisão celular e (2) invadem e se estabelecem em regiões normalmente destinadas a outras células. Uma célula normal que cresce e se prolifera sem controle dará origem a uma massa tumoral. Entretanto se as células tumorais não tiverem a capacidade de se desprender do tecido original, penetrar na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos para formar tumores secundários (metástases), o tumor não é considerado maligno (benigno). Nesse caso, pode haver remissão completa pela destruição ou remoção cirúrgica da massa tumoral. Um tumor é considerado uma neoplasia apenas se for maligno, ou seja, se tiver a capacidade de invadir tecidos e formar metástases. Quanto mais os tumores e suas metástases se dispersarem, mais difícil será erradicá-lo. Em geral, são as metástases e suas consequências que levam o paciente à morte (ALBERTS *et al.*, 2010). Existem diversos tipos diferentes de neoplasias, podendo surgir em qualquer parte do corpo, sendo que alguns órgãos são mais. Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), órgão do Ministério de Saúde, voltado a ações nacionais integradas para a prevenção e controle de neoplasias, os

órgãos mais afetados pelo câncer em território nacional, são: mama, pulmão, útero, cólon, próstata e reto, pele, medula óssea, estômago, cavidade oral e esôfago. Por sua vez, cada um desses órgãos pode ser afetado por tipos diferenciados de tumor de diferenciados níveis de agressividade (INCA, 2015). As causas das neoplasias são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas.

A eficácia de AgNPs como um agente antitumoral foi demonstrada tanto in *vitro* quanto *in vivo*. A indução de danos celulares após a exposição a AgNPs, tais como perda de integridade da membrana celular, estresse oxidativo e apoptose que foram relatados em células de câncer de mama humano (MCF-7) (JEYARAJ *et al.*, 2013). SRIRAM *et al.*, (2010) e revelaram uma citotoxicidade dependente da dose em células de linfoma ascítico de Dalton por indução de apoptose. Além disso, os autores demonstraram a ação protetora durante a administração das AgNPs em camundongos portadores do tumor. Em ensaios de citotoxicidade na linhagem HEp-2 (células de carcinoma da laringe), ROSARIN *et al.*, (2012) demonstraram a morte celular, alterações morfológicas apoptóticas, despolarização mitocondrial, danos no DNA e estresse oxidativo. O uso de AgNPs contra o glioblastoma multiforme tem sido relatado em alguns estudos recentes, apontando as AgNPs como uma ferramenta promissora para a terapia deste agressivo câncer (URBANSKA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2014; LOCATELLI *et al.*, 2014). Além desses, outros tipos de câncer foram estudados e apresentaram sensibilidade ao tratamento com AgNPs (RAI *et al.*, 2014).

1.11 - Glioblastoma multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é o um dos tumores cerebrais primários mais comum e possivelmente o mais agressivo em seres humanos, com uma taxa de incidência de 3,2 novos casos diagnosticados a cada 100.000 pessoas, uma mortalidade de 100% e uma sobrevida média de cerca de 12-15 meses (ARVOLD & REARDON, 2014). É uma neoplasia constituída por células da glia, sendo responsável por 50% de todos os tumores cerebrais de parênquima que, por sua vez, representam 50% dos tumores cerebrais totais (ALVES *et al.*, 2011). Médicos e cientistas tiveram sucesso limitado em prolongar a sobrevivência dos pacientes que sofrem de GBM, desde a introdução da terapia de radiação pós-cirúrgica, no final dos anos 1970 (GOLDLUST *et al.*, 2008). Os gliomas, tumores primários de potencial maligno do cérebro, são divididos em dois tipos: tumores astrogliais e oligodendrogliais, estes são classificados por grau de agressividade, podendo ser considerados de baixo grau (grau II, segundo a OMS) ou de

alto grau (graus III e IV, segundo a OMS) (LOUIS et al., 2007). Os tumores que se originam dos astrócitos, células do cérebro que rodeiam células nervosas e promovem suporte aos neurônios, comumente conhecidos como astrocitomas, são divididos em três tipos: astrocitomas (grau II da OMS), astrocitomas anaplásicos (grau III da OMS), e GBMs (grau IV da OMS) (GOLDLUST et al., 2008). O GBM pode ocorrer como uma neoplasia primária ou secundária: uma neoplasia primária é originada diretamente a partir de mutações em células astrogliais normais, enquanto que uma neoplasia secundária se origina de um tumor com grau de malignidade inferior a IV e evolui até se tornar um GMB com grau IV de agressividade. GBM primário tende a ocorrer em uma população de pacientes mais velhos, com mais de 55 anos, enquanto o GBM secundário tende a ocorrer adultos mais jovens, abaixo dos 45 de idade. em anos Embora fenotipicamente semelhante, estes dois tipos de GBM ocorrem através do cumulo de mutações diferentes (KIM & GLANTZ, 2006). Do ponto de vista etiológico, fatores ambientais, como tabagismo, dieta e ingestão de álcool não foram ligados ao GBM, embora sugere-se que altas doses de irradiação craniana e exposição ocupacional a toxinas da incidência algumas podem estar ligados ao aumento de trinta gliomas. O risco de glioma atribuível à herança foi estimado em 4% e é mais comumente associado com neurofibromatose, esclerose tuberosa, síndrome de Turcot, e síndrome de LiFraumeni (GOLDLUST et al., 2008)

2- Justificativa

Existe no mundo uma crescente necessidade de tratamentos farmacológicos alternativos para patologias como infecções diversas e neoplasias. Essas doenças acometem toda a população mundial e geram numerosas fatalidades diariamente. Existem diversos fatores que influenciam a taxa de mortalidade de infecções bacteriana, no entanto o fator mais importante é o aparecimento constante de cepas bacterianas resistente aos tratamentos farmacológicos tradicionais. Nanopartículas metálicas, principalmente as baseadas em prata, já são amplamente usadas com caráter antibacteriano e o espaço entre o uso na indústria e a implementação de um tratamento seguro e confiável para infecções bacterianas em humanos só vai ser extinguido com muitas pesquisas dedicadas ao entendimento do efeito das NPs, não só em microrganismos como também em células eucarióticas humanas ou análogas.

Neoplasias estão entre as doenças que mais matam no mundo e os tratamentos existentes, além de pouco eficientes, costumam apresentar diversos efeitos adversos inerentes. Apesar de pouco estudado ainda, já existem na literatura alguns trabalhos que mostram potencial antitumoral em nanopartículas de pratas. Apesar de ainda aparentar distante, uma terapia para neoplasias usando NPs sozinhas ou associadas a fármacos existentes pode significar um avanço enorme na qualidade e longevidade da vida humana. Essa terapia não será possível sem um amplo e vasto estudo do efeito de NPs em células tumorais e saudáveis.

No presente estudo, utilizamos técnicas de microscopia com a finalidade de entender através da visualização o efeito de nanopartículas à base de prata (AgCI-NPs e AgNPs) em células de mamífero e bactérias. Avaliamos, além dos efeitos citotóxico e antiproliferativo já comumente analisados em estudos sobre o tema, as consequências do tratamento com as AgNPs e AgCI-NPs na morfologia e ultraestrutura de bactérias e células de mamíferos.

3- Objetivos

2.1 - Geral

- Investigação através da visualização das modificações estruturais causadas por AgCl-NPs biossintetizadas em bactéria e células de mamíferos.
- Avaliação de efeito estrutural de AgNPs quimiossintetizadas em células tumorais e não tumorais

2.2 - Específicos

- Investigação das mudanças morfológicas em bactérias após tratamento com AgCl-NPs.
- Determinação das mudanças ultraestruturais em bactérias após tratamento com AgCl- NPs.
- Análise do efeito de AgCl-NPs na morfologia de células de mamíferos
- Investigação das mudanças na estrutura do citoesqueleto de células de mamíferos após tratamento com AgCl-NPs
- Obtenção de dados sobre a interação das AgCl-NPs com estruturas intracelulares de células de mamíferos
- Caracterização das AgNPs quimicamente sintetizadas
- Determinação do efeito das AgNPs na morfologia de células saudáveis e tumorais
- Avaliação do efeito das AgNPs na proliferação, inibição, taxa de crescimento e taxa de duplicação de células saudáveis e tumorais
- Determinação do efeito das AgNPs nas propriedades biomecânicas de superfície de células saudáveis e tumorais
- Avaliação do efeito de AgNPs na área de núcleos e na quantidade de material genético de células saudáveis e tumorais

4- Metodologia

4.1-Cultivo de Células

4.1.1- Células de mamíferos

As linhagens não tumorais utilizadas neste estudo foram HFF-1 (fibroblasto de pele humano, ATCC® SCRC-1041TM) e LLC-MK₂ (célula epitelial de rim de Macaco Rhesus, ATCC® CCL-7TM). A linhagem tumoral utilizada foi a U87 (glioblastoma humano, ATCC® HTB-14TM). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) para as HFF-1 e U87 e RPMI 1640 para as células LLC-MK₂. As células tiveram o meio suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico Penicilina Streptomicina 10000 U/mL e foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Ao atingirem confluência, as células foram ressuspensas pela ação da solução enzimática tripsina-EDTA 0,05% por 2 a 5 minutos a 37°C. Para a realização dos experimentos, as células em suspensão foram contadas com o auxílio de uma câmara de neubauer e semeadas em placas de 24 poços, a uma densidade celular de 10³ células/poço.

4.1.2- Bactérias

Bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 foram cultivadas em caldo nutriente modificado (1% peptone, 0,5% extrato de carne e 0,5% extrato de levedura) e mantidas em estufa a 37° C sob agitação (150 rpm).

4.2- Efeito de AgCl-NPs na estrutura de bactérias e células de mamíferos

4.2.1 – Biossíntese de AgCl-NPs

Bactérias da espécie *Bacillus megaterium* foram cultivadas em caldo nutriente modificado (1% peptone, 0,5% extrato de carne e 0,5% extrato de levedura) por 24 horas. Para a produção de nanopartículas, a cultura foi mantida na presença do de 3,5mM de nitrato de prata (AgNO₃) (Merck, Brasil) por 7 dias, a 37°C no Shaker a 150 rpm na ausência de luz.

4.2.2- Purificação de AgCl-NPs

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

4.2.3- Morfologia nas AgCl-NPs

A microscopia eletrônica de transmissão foi aplicada para obter informações do diâmetro e morfologia das AgCl-NPs. Alíquotas (5μ L) de nanopartículas purificadas foram depositadas em grades de cobre (300 mesh) revestidas com Formvar e deixadas em temperatura ambiente até secar. As imagens foram obtidas no microscópio Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI Company, ThermoFisher, Oregon. USA) operado a 120 kV. O diâmetro e forma das AgCl-NPs foram estimadas a partir de imagens (n = 1.200 partículas) utilizando o *software* Image J.

4.2.4 – Ensaio de viabilidade celular

As células foram semeadas em uma placa de 96 poços na densidade de 4 x 10^3 células/0,33 cm² encubadas durante 48 horas, na presença ou não (controle) de concentrações de AgCl-NPs em meio DMEM que variavam de 2 até 30 µg/mL por 24 horas. Após as 24 horas, a viabilidade celular foi determinada através de um ensaio com MTS, que mede a redução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) em formazan pelas enzimas desidrogenases das células viáveis. Foi se adicionando em cada poço 20 µl da solução MTS (concentração final de MTS de 0.33 mg/mL). As células foram incubadas com a solução MTS durante 4h em uma estufa a 37°C. Após o período de incubação, a absorbância do MTS foi detectada a 490nm e os dados obtidos foram normalizados de acordo com as células não tratadas. O valor de IC₅₀ foi obtido através da plotagem dos dados obtidos no ensaio de MTS no

software GraphPad Prism (GraphPad Softwares, San Diego, USA) e posterior análise estatística de regressão não linear (*curve fit*) usando a equação EC₅₀.

4.2.5 – Análise de citoesqueleto de células após tratamento com AgCl-NPs por microscopia de fluorescência

As células HFF-1 foram incubadas com AgCl-NPs (18 µg/mL, IC₅₀) em placa de 24 poços contendo lamínulas com densidade de 2 x 10^3 células/ 1,91 cm² durante 24 horas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) em PBS (0,1M pH 7,4) durante 2 horas. Após fixação, as células foram lavadas com PBS (0,1M pH 7,4) e coradas com o corante fluorescente Alexa Fluor 488 Phalloidin (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) na concentração 0,3µM e DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) na concentração 10 µg/mL durante 30 minutos com a finalidade de corar citoesqueleto de actina e DNA respectivamente. As lamínulas coradas foram lavadas em PBS (0,1M pH 7,4) e montadas em uma lâmina de vidro com o meio de montagem ProLong Antifade (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). Imagens digitais das amostras foram obtidas no microscópio óptico Leica DMi8 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha). Foram feitas séries de imagens que posteriormente foram digitalmente transformadas em projeções de máxima intensidade e deconvoluídas usando o método blind em um software LAS X (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha).

4.2.6 – Análise de citoesqueleto de células após tratamento com AgCl-NPs por microscopia eletrônica de varredura

Seguindo as mesmas etapas para incubação em placa de 24 poços para as análises de citoesqueleto por MEV, após a incubação, as células foram lavadas 3 x com PBS (0,1M pH 7,4) incubadas com solução de Triton X-100 1% em água durante 10 minutos, lavadas novamente em PBS (0,1M pH 7,4) e, por fim, fixadas em glutaraldeído (2,5%) durante 2 horas. Após a fixação, as células foram lavadas em água e posteriormente desidratadas de forma seriada utilizando etanol nas concentrações 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (2X). Por fim, as amostras foram secas no aparelho de ponto crítico Leica EM CPD300 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha). As lamínulas secas foram postas em um *Stub,* revistidas com platina na espessura de 10 nm em um metalizador Leica EM ACE600

(Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha) e observadas em um microscópio Quanta FEG 450 (FEI Company, ThermoFisher, Oregon. USA).

4.2.6 – Análise morfológica por Microscopia eletrônica de varredura

Para as análises morfológicas, as células (LLC-MK₂) aderidas em lamínula foram incubadas com e sem a presença de AgCl-NPs (8μ g/mL, IC₅₀) em placa de 24 poços com densidade de 2.10³ células/ 1,91 cm² durante 24h em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) em PBS (0,1M, pH 7,4) durante 2 horas. Após fixação, as células foram lavadas com PBS (0,1M, pH 7,4) e desidratadas de forma seriada utilizando etanol nas concentrações 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (2X). Após a desidratação, as amostras foram secas em secador ponto crítico Leica EM CPD300 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha). As lamínulas secas foram postas em um *Stub*, revestidas com 10 nm de platina em um metalizador Leica EM ACE600 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha) e observadas em um microscópio Quanta FEG 450 (FEI Company, ThermoFisher, Oregon, EUA) operando a 80 kV.

4.2.7- Localização intracelular das AgCl-NPs por microscopia eletrônica de transmissão

Para as análises por MET, as células LLC-MK₂ tratadas (AgCl-NPs 8µg/mL durante 24 horas) e não tratadas foram fixadas com fixador Karnovsky (2,5% glutaraldeído, 4 % paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M) durante 4 horas em uma garrafa de 25 cm² e posteriormente retiradas com um rodinho e postas em um microtubo de 2 mL onde foram lavadas 3X em PBS (0,1M, pH 7,4). Posteriormente as células foram pós fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto 0,8% em água na proporção 1:1 e desidratadas de forma seriada utilizando acetona nas concentrações 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (2X) em água destilada, 20 minutos cada etapa. Após desidratadas, as amostras foram infiltradas em resina epóxi (EMbed 812 Kit) cumprindo as etapas (24h) de diluição em acetona nas proporções 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 e puro. Após a infiltração com resina, as amostras foram polimerizadas em uma estufa a 60C° durante 72 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em um ultramicrótomo Leica EM UC7 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha) em fatias ultrafinas de 70 nm e coletados em grade de cobre (300 mesh). As grades foram secas ao ar e, posteriormente, foram contrastadas usando uma solução de acetato de uranila 5% durante 45 minutos e citrato de chumbo durante 5 minutos. Por fim, as amostras foram visualizadas em um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit BioTwin 120 (FEI Company, ThermoFisher Oregon, EUA).

4.2.8- Microscopias de força atômica de células tratadas

As células foram tratadas com as AgNPs da mesma forma e com a mesma concentração (8 µg/mL) das análises em MEV e MET. As lamínulas, após período de incubação com NPs, foram fixadas com fixador Karnovsky (2,5% glutaraldeído, 4 % paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M) durante 4 horas e, após lavagem com PBS (0,1M pH 7,4), desidratadas de forma seriada utilizando etanol nas concentrações 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (2X) em água destilada e secas em secador ponto crítico Leica EM CPD300 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha). As lamínulas secas foram aderidas em uma lâmina de vidro com fita dupla face e visualizadas em um AFM Bruker Bioscope (Bruker, Massachusetts, EUA), no modo contato intermitente em ar.

4.2.9 - Análise de efeito morfológico em bactérias por MEV

As AgCl-NPs produzidas por *B. megaterium* foram usadas contra a bactéria *P.* Aerugiosa. Inicialmente a solução contendo as AgCl-NPs foi sonicada em banho de ultrasson (SoniClean 2, Sanders Medical) por 30 minutos à temperatura ambiente, com uma frequência de 40 kHz. As bactérias foram crescidas em 1,5 mL de meio Caldo Nutriente (Himedia, Mumbai, India) como condição controle (não tratado) e em meio Caldo Nutriente contendo 50µg/mL de Ag/AgCl-NPs. Com a finalidade de comparação, os experimentos foram realizados em triplicata em microtubos de 2 mL (MCT-200-C, Axygen®) e mantidos por 24 horas a 37°C, com inóculo inicial de 10⁵ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) para os ensaios com bactérias. Ambas as amostras foram lavadas 3X em PBS (0,1M, pH 7,2) e fixadas com fixador "Karnovsky" (glutaraldeído 2,5% + formaldeído 4%) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2). Para análises em MET, as amostras foram desidratadas de forma seriada utilizando acetona nas concentrações 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (2X) em água destilada, 20 minutos cada etapa. Quando desidratadas, as amostras foram infiltradas em resina epóxi (EMbed 812 Kit) cumprindo as etapas (24h) de diluição em acetona nas concentrações 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (2X). As amostras embebidas em resina foram emblocadas

em forma de silicone e postas para polimerizar em uma estufa a 60C° durante 72 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em um ultramicrótomo Leica EM UC7 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha) em fatias ultrafinas de 70 nm e coletados em grade de cobre (300 mesh). As grades foram secas ao ar e, posteriormente, foram contrastadas usando uma solução de acetato de uranila 2% durante 45 minutos e citrato de chumbo durante 5 minutos. Por fim, as amostras foram visualizadas em um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit BioTwin 120 (FEI Company, ThermoFisher Oregon, EUA) operando a 80 kV.

4.2.9 - Análise de efeito ultraestrutural em bactérias por MET

Para análises em MEV, as amostras foram lavadas 3X em PBS (0,1M, pH 7,2) e fixadas com fixador "Karnovsky" (glutaraldeído 2,5% + formaldeído 4%) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2). Posteriormente foram desidratadas de forma seriada utilizando etanol nas concentrações 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (2X) em água destilada e secas em um aparelho de ponto crítico Leica EM CPD300 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha). As lamínulas secas foram postas em um *Stub*, metalizadas com cromo na espessura de 10nm em um metalizador *Leica EM ACE600* (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha) e observadas em um microscópio Quanta FEG 450 (FEI Company, ThermoFisher Oregon, EUA). Após a aquisição das imagens, foram feitas medidas (poros) usando o *software* ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, EUA).

4.3 - Avaliação de efeito antitumoral de AgNPs quimicamente sintetizadas

4.3.1 - Quimiossíntese de AgNPs:

As AgNPs foram sintetizadas pelo método de redução química segundo MENG *et al.* (2015). Primeiramente, água destilada foi aquecida a 100°C sob agitação vigorosa. Após a ebulição, foram adicionados nitrato de prata 0,1 mol/L e citrato de sódio 1% para iniciar a reação de síntese de AgNPs. A solução foi mantida sob agitação durante 40 minutos e depois deixada arrefecer à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

4.3.2 - Caracterização das AgNPs Microanálise de raio X

As AgNPs produzidas foram analisadas utilizando a técnica de espectroscopia de raio X por dispersão em energia (EDS) em um MEV. As AgNPs (1,19 mg/mL) em água foram depositadas em um microtubo de 2mL e postas para secagem em

um Speedvac Vacufuge Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany) durante 24 horas. Após secagem, o *pellet* obtido como consequência do processo de secagem contendo as AgNPs foi depositado em um stub previamente recoberto fita dupla face de carbono. A amostra foi observada em um MEV 450 Quanta FEG (FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA) operando a 15kV e utilizando detector para emissão de raio X.

4.3.3 - Caracterização das AgNPs por difração de raio X

O *pellet* de AgNPs foi montado em suportes de alça de náilon (Hampton Research, EUA) e submetidos à análise de difração de pó em difratômetro SuperNova (Rigaku, EUA), à temperatura ambiente, operando a 40 W (50 kV e 0,8 mA), com radiação CuK α (1,5416 Å) e rotação phi-scan, com detecção na faixa de 20 ° –90 ° (ângulos 2 θ). As imagens de difração foram processadas com CrysAlisPro® (Agilent).

4.3.4- Caracterização das AgNPs por espalhamento de luz dinâmico

As AgNPs dispersas em Meio de Cultura (DMEN-HIGH, DMEM-LOW, RPMI) ou Água foram depositadas em uma cubeta de quartzo e analisadas em um DLS ZetaSizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Os dados obtidos foram analisados e tratados usando o *software* Microsoft Excel (Microsoft, Washington, EUA).

4.3.5 – Estudo da viabilidade por método colorimétrico (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada através da metabolização dos componentes do MTT (sais 4,5-dimetiltriazol) pelas mitocôndrias de células metabolicamente ativas das seguintes linhagens celulares: HFF-1 (não tumoral) e U-87 (tumoral). As células cultivadas na placa de 96 poços foram expostas a diferentes concentrações de AgNPs (1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 μ g/mL) em triplicata por 48 horas. Após este período, foram adicionados 100 μ L de PBS estéril por poço. Posteriormente, adicionaram-se 10 μ L da solução de MTT em cada poço e a placa foi incubada por 4 horas na estufa a 37°C a 5% de CO2. Em seguida, a solução dos poços foi retirada e adicionaram-se 50 μ L de DMSO por poço. Após isso, a placa foi posta na estufa para incubação de 10 minutos. Por fim, a análise colorimétrica de viabilidade celular foi realizada pelo Espectrofotômetro Tecan Infinite 200 Pro (Tecan Trading AG, Switzerland) com um comprimento de onda de 540 nm.

4.3.6 – Cálculo do IC₅₀ e índice de seletividade

O cálculo de IC_{50} foi feito utilizando os valores de viabilidade obtidos no experimento com MTT no *software* Graphpad Prism (GraphPad Softwares, San Diego, USA) usando a função de regressão não linear (*curve fit*) usando a equação EC₅₀. O cálculo de índice de seletividade foi feito dividindo o valor do IC_{50} dá célula controle pelo dá célula alvo (tumoral). Valores maiores que 1 indicam tratamentos seletivos.

4.3.7- Avaliação do efeito antitumoral por AFM

As amostras de células (HFF-1 e U87) foram fixadas com Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + formaldeído 4%) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) e posteriormente desidratadas em Etanol de forma seriada (25%/ 50%/75%/100%) e por fim secas em um aparelho de ponto crítico Leica EM CPD300 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha). As amostras foram analisadas em um AFM Bruker Bioscope (Bruker, Massachusetts, EUA) usando o modo de imageamento *Tapping in Air* usando o cantiléver Bruker Oltespa R3 (240 μ m, 70 KHz). As imagens foram processadas e as medidas de rugosidade foram feitas usando o *software* Nanoscope Analisys (Bruker, Massachusetts, EUA). Os dados de rugosidade foram tratados em *software* Graphpad Prism (GraphPad Softwares, San Diego, USA) utilizando teste estatístico Anova *one way* com pós teste Tukey.

4.3.8 – Análises biomecânicas em AFM

As amostras de células (HFF-1 e U87) foram fixadas com Glutaraldeiro 0,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) como visto (Cascione *et al.*, 2016) para análises nanomecânicas e posteriormente desidratadas em Etanol de forma seriada (25%/ 50%/75%/100%) e por fim secas em um secador ponto crítico Leica EM CPD300 (Leica Microsystens, Wetzlar, Alemanha). As amostras foram analisadas em um AFM Bruker Bioscope (Bruker, Massachusetts, EUA) usando o modo de imageamento *Peak Force in Air* utilizando o cantiléver Bruker Scanassyst-Air (115 µm, 70KHz) e com o auxílio do módulo de mapeamento mecânico quantitativo. Os mapas de força foram analisados usando o *software* Nanoscope Analisys (Bruker, Massachusetts, EUA) e os dados extraídos foram analisados e tratados usando o *software* Graphpad Prism (GraphPad Softwares, San Diego, USA).
4.3.9 - Estudo da proliferação através da análise de alto conteúdo

Para a análise de proliferação celular, células da linhagem HFF-1 e U87 foram semeadas a uma densidade de 10^4 células/poço em placas de 96 poços preta de fundo plano (Corning Incorporated Costar®), em 300 µL DMEM HIGH e suplementado com SFB a 10% contendo 0,5 µg/mL do corante Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich).

Após a adesão das células no fundo da placa, elas foram incubadas na presença de diferentes concentrações de AgNPs (10, 20, 40 e 80 μg/mL) durante 24, 48 e 72 horas a 37°C, a 5% de CO₂. O controle não tratado foi realizado na ausência das AgNPs. Foram realizados três experimentos independentes para a obtenção dos resultados.

Imagens foram adquiridas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas de cultivo nas condições controle e tratados utilizando o sistema de imagens IN Cell Analyzer 2000. Foram escolhidos nove diferentes campos dentro de cada poço para aquisição das imagens de fluorescência, usando o filtro DAPI (região espectral entre 410-480 nm), com objetiva de 20x. A contagem do número de núcleos marcados foi realizada através do *software* IN Cell Invastigation (GE HealthCare Life Sciences). Para o acompanhamento da curva de crescimento, a quantidade de núcleos contados no dia 0 (antes de adicionar os tratamentos) foi normalizada para 100% e os núcleos contados nos tempos posteriores (após colocar os tratamentos) foram convertidos em percentual de proliferação com relação ao dia 0.

5– Resultados

5.1- Investigação dos efeitos do tratamento com AgCl-NPs na estrutura de microrganismos e células de mamíferos

5.1.1- Morfometria das AgCl-NPs

As AgCl-NPs oriundas de *B. megaterium* usadas em nosso trabalho foram sintetizadas usando protocolo já publicado pelo grupo e previamente caracterizadas em Charelli *et al.*, (2018). As nossas análises das NPs utilizaram imagens de MET e medidas em *software* ImageJ. Vemos em Fig.9 NPs apresentando dispersão e tamanho aparentemente heterogêneo e circularidade elevada. Nas medidas de diâmetro feitas no *software* ImageJ (Fig. 10A) foram constatadas uma distribuição de tamanhos heterogênea que variou entre 6 e 31 nm. Acima de 40% das Nps apresentaram um diâmetro em torno de 13 nm, enquanto cerca de 20 % apresentou um diâmetro em torno de 8 nm e 10 % em torno de 26 nm. A média calculada do diâmetro das NPs foi de 14,22nm com um desvio padrão de 8,42 nm. Os dados de circularidade das NPs (Fig.10B) demonstram partículas predominantemente circulares, sendo cerca de 95% com circularidade acima de 0,8 e cerca de 70% com circularidade acima de 0,9.



Figura 9: Imagem representativa da morfologia de nanopartículas de cloreto de prata produzidas por *B. megaterium* e adquiridas em microscópio eletrônico de transmissão.



Figura 10: Análises de diâmetro de partículas e fator de forma (circularidade) por elétrons de transmissão microscopia (TEM) das AgCl-NPs. Histogramas de distribuições de tamanho de partícula (A) e circularidade (B). Em (B), o valor 1 representa a circularidade perfeita.

5.1.2- Efeito estrutural do tratamento em bactérias

Com finalidade de compreender mudanças ultraestruturais causadas pelo tratamento com AgCl-NPs, foram feitas imagens por MET (Fig. 11) de bactérias (*P. Aerugiosa*) não tratadas (Fig. 11A, 11B) e tratadas (Fig. 11C, 11D). Podem ser observadas representações esféricas que correspondem a secções transversais das bactérias e representações na forma clássica de bastão que correspondem a secções parciais ou totalmente longitudinais. As bactérias não tratadas (Fig. 11A, 11B) mostram bactérias com a parede celular bem definida e íntegra e em contato com as membranas plasmáticas internas e externas (bactéria gram-negativa) com conteúdo interno (DNA) homogêneo predominantemente eletrondenso. Em contrapartida, nas imagens com amostras tratadas (Fig. 11C, 11D), podemos observar bactérias com parede celular pouco definida e conteúdo interno heterogêneo apresentando áreas menos e mais eletrondensas sugerindo degradação do material genético.



Figura 11: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de bactérias *Pseudomonas Aerugiosa* não tratadas (A, B) e tratadas (C, D) com AgCl –NPs.

5.1.3- Efeito morfológico do tratamento em bactérias

Com a finalidade de compreender mudanças causadas nas superfícies das bactérias pelo tratamento com AgCl-NPs, foram feitas análises de MEV (Fig. 12) de *P*. *Aerugiosa* não tratadas (Fig. 12A, 12B) e tratadas (Fig. 12C, 12D). As imagens representativas de bactérias não tratadas mostram bactérias alongadas em forma de bastão sem deformação aparente em sua superfície. Em contrapartida, o tratamento com AgCl-NPs causou deformações superficiais nas bactérias alterando o clássico formato em "bastão" de bacilos (Fig. 12D). Pode ser notado que o tratamento gerou poros na parede celular (setas amarelas). Com o intuito de medir poros encontrados na maioria das bactérias oriundos do tratamento com AgCl-NPs, foram feitas medidas (Fig. 13A, 13B) de área utilizando o *software* ImageJ. Os poros causados pelo tratamento apresentaram áreas que variam de 60 até 300 nm², com uma área média de 156,34 nm² com desvio padrão de 91,9 nm² (Fig.14).



Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras (bactérias *Pseudomonas Aerugiosa*) não tratadas (A, B) e tratadas (C, D) com AgCl –NPs. As setas amarelas indicam os poros presentes na parede celular de bactérias tratadas.



Figura 13: Imagem representativa mostrando a segmentação dos poros encontrados na superfície de bactérias de bactérias *P. Aerugiosa* tratadas com AgCl-NPs feita em *software* ImageJ (A), a imagem evidencia limites e área dos mesmos. Imagem representativa de MEV contendo bactérias com poros causados pelo tratamento usada para a segmentação contida na figura (B).



Figura 14: Histograma de percentual de frequência de áreas de poros encontrados em superfícies de bactérias tratadas com AgCl-NPs.

5.1.4 – Viabilidade de células de mamíferos e obtenção de IC50

Com a finalidade de obter o IC50 de AgCl-NPs e usá-lo em tratamentos de células HFF-1 (fibroblasto de pelo humano), foi usado o método colorimétrico MTS. Os dados obtidos no ensaio foram expostos em um gráfico de atividade/concetração (Fig.15), em

que foi possível observar atividades distintas em concentrações variando de 0 a 30 μ g/mL. A partir desse gráfico, foi feita uma análise de regressão não linear no *software* GraphPad Prism (GraphPad Software) e o valor de IC₅₀ foi obtido usando a equação EC₅₀ no *software* foi 18,89 μ g/mL.



Figura 15: Concentração (eixo x) em relação à atividade (eixo y). Reta em preto representando resultado de teste estatístico de regressão não linear.

5.1.5 – Efeito de tratamento com AgCl-NPs na área celular

Com a finalidade de analisar o efeito do tratamento com AgCl-NPs na área celular, um importante indicativo de alterações em componentes estruturais da célula foram feitas imagens usando a técnica DIC e medidas usando *software* de pós processamento.

As análises em DIC (Fig. 16A-16D) detalham morfologia e superfície celular das células HFF-1 controle (Fig.16A,16B) e tratadas (Fig.16C,16D). Vemos o tratamento causando uma ligeira diminuição no tamanho das células, diminuição essa que viria a ser confirmada pela morfometria. A morfometria (Fig.16E) mostrou amostras não tratadas (controle) apresentando uma área média de 4.796 μ m² com desvio padrão de 290,8 μ m² e amostras tratadas com AgCl-NPs apresentando uma área média de 3.603 μ m² com um desvio padrão de 407.7 μ m². Esses conjuntos de valores correspondentes a amostras

tratadas e não tratadas foram comparados com um teste estatístico (teste T não pareado) que determinou sua diferença estatística.



Figura 16: Imagens de microscopia de contraste interferencial (A-D) de células (HFF-1) não tratadas (A, B) e tratadas com AgCl-NPs (C, D) e morfometria (E) da área celular em células não tratadas (controle) e tratadas (AgCl-NPs). São expostos para cada amostra os dados de média e desvio padrão. O asterisco evidencia uma diferença estatística entre as amostras segundo teste T (p<0,05).

5.1.6 – Efeito de tratamento com AgCl-NPs no citoesqueleto de células de mamíferos

Com a finalidade de estudar o citoesqueleto (estrutura diretamente relacionada com a forma das células) de células humanas (HFF-1) antes e após tratamento com AgCl-NPs, usamos técnicas de microscopia óptica e eletrônica associado a métodos de extração de membrana celular e colorações fluorescentes. Em ambas as amostras (tratadas e não tratada), a análise de fluorescência (Fig. 17A- 17D) mostrou células espraiadas aderidas às lamínulas e espalhadas de forma regular. Ao analisarmos as imagens de fluorescência (Fig. 17A, 17B) de células tratadas (Fig. 17B) e não tratadas (Fig. 17A) coradas com faloidina (verde, citoesqueleto) e DAPI (azul, DNA), vemos que o citoesqueleto se apresentou aparentemente íntegro em ambos os casos, não podendo ser constatado em nível de resolução da microscopia de fluorescência qualquer mudança conformacional.

As análises relativas ao citoesqueleto, desta vez usando microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (Fig. 17E-17H) com células após extração de membrana plasmática usando detergentes, mostram células controle (Fig. 17E, 17F) com um citoesqueleto bem definido e detalhado mostrando formato celular espraiado e projeções de adesão celular. Já em amostras tratadas (Fig. 17G, 17H), podemos ver que não houve preservação do citoesqueleto, a estrutura celular se apresentou degradada. Esse resultado mostra dados que não foram vistos com o uso de outras técnicas de microscopia e sugere uma interação das AgCl-NPs com o citoesqueleto e consequente fragilidade gerada na estrutura.



Figura 17: Imagens de microscopia óptica de fluorescência (após deconvolução) de células (HFF-1) não tratadas (A, B) e tratadas com AgCl-Nps (C, D) e de microscopia eletrônica de varredura após extração de membrana de células não tratadas (E, F) e tratadas (G, H)

5.1.7 - Efeito morfológico e ultraestrutural do tratamento com AgCl-NPs em células de mamífero

Usamos a célula LLC-MK₂ como modelo de estudo de morfologia e fizemos análises em AFM, MEV (morfologia) e MET (ultraestrutura) em células antes e após tratamento.

A análise feita em microscopia de força atómica (Fig. 18) mostrou células controle (Fig. 18A, 18C) íntegras em formato espraiado e apresentando diversos prolongamentos no corpo celular que correspondem a áreas de adesão com a lamínula ao substrato. No entanto, as células tratadas com AgCl-NPs (concentração = IC50) (Fig. 18B, 18D) apresentaram perda de integridade da membrana plasmática com rompimento (indicado com estrela) e aparente extravasamento de conteúdo celular. A morfologia celular se mostrou ligeiramente alterada não apresentando muitos prolongamentos para a lamínula. Foi possível também observar o aparecimento das AgCl-NPs (setas pretas) nas imagens de células tratadas.



Figura 18: Imagens de microscopia de força atômica de células (LLC-MK₂) controle (A, C) e tratadas com AgCl-NPs (B, D) em concentrações subletais. Imagens de sinalo de topografia (A, B) e deflexão do cantiléver (C, D). Setas pretas indicando AgCl-NPs e estrela indicando rompimento na membrana plasmática.

As imagens de MEV (Fig. 19) representam o resultado obtido em amostras não tratadas (Fig.19A, 19B) e tratadas com AgCl-NPs (Fig. 19C, 19D) em menor (Fig. 19A, 19C) e maior (Fig. 19B, 19D) aumentos. As células controle (Fig.19A, 19B) apresentaram morfologia ligeiramente alongadas e espraiadas. Já as células presentes nas micrografias de amostras tratadas (Fig. 19C, 19D) apresentam morfologia heterogênea variando entre formas espraiadas e, de forma mais predominante, formas arredondadas (Fig. 19D). Em algumas células, foi possível ver (seta preta e área ampliada em destaque) uma morfologia

que indica estado de morte por processo apoptótico. O tratamento com as NPs causou também uma visível diminuição no número de células.



Figura 19: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células LLC-MK₂ controle (A, B) e tratadas com AgCl-NPs (C, D) em menor (A, C) e maior (B, D) aumento. Seta indicando célula exposta em ampliação, quadrado preto indicando célula ampliada.

Com a finalidade de estudar o efeito ultraestrutural do tratamento com AgCl-NPs em células LLC-MK₂, foram feitas análises usando o MET em células tratadas e não tratadas. Os dados expostos Fig.20 representam os resultados obtidos em amostras controle (Fig.20A, 20B) e tratadas (Fig.20C - 20F). Nas Fig.20A, 20B, podemos observar secções transversais das células apresentando membrana plasmática e envoltório nuclear íntegros e ausência de vacúolos. Já nas imagens representativas de amostras tratadas (Fig. 20C, 20D, 20E, 20F), vemos células com membranas plasmáticas rompidas, apresentando diversos vacúolos no interior e diversas áreas com presença de (AgCl-NPs) indicadas por setas amarelas. Vemos a presença das NPs no citoplasma e em estruturas vesiculares (estrela amarela) que indicam que as NPs entram nas células por via endocítica.



Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células (LLC-MK₂) controle (A, B) e tratadas com AgCl-NPs (C, D, E, F). Setas amarelas indicando AgCl-NPs.

5.1.8- Estudo da captação de AgCl-NPs cm células de mamífero

Com a finalidade estudar a entrada das AgCl-NPs nas células LLC-MK₂, realizamos imagens de MET em amostras após 10 minutos de interação. Vemos na Fig. 21, células apresentando membranas bem preservadas e íntegras possuindo em seu interior diversos pontos eletrondensos (AgCl-NPs) abundando em regiões próximas ou até mesmo associadas à membrana plasmática. As NPs foram observadas predominantemente em vesículas (setas amarelas em Fig. 21B, 21C) indicando que as NPs seguiram via endocítica.



Figura 21: Micrografias de MET de células LLC-MK₂ tratadas por 10 minutos com AgCl-NPs em maiores (A, C) e menor (B) aumentos.

5.2- Avaliação de efeito antitumoral de AgNPs quimicamente sintetizadas5.2.1 - Determinação da composição elementar de AgNPs por microanálise de RaioX

Com a finalidade de obter a composição elementar do produto obtido pelo método de síntese de AgNPs, foram feitas análises utilizando a técnica de EDS acoplado ao MEV. As análises foram realizadas a partir do *pellet* desse produto (Fig. 22A) na região de interesse (Fig. 22C) representada por uma cruz vermelha. As análises resultaram em um espectro relacionando intensidade e energia (keV) (Fig. 22B). No espectro, pode-se observar a presença dos elementos Carbono (C), Oxigênio (O), Sódio (Na), Prata (Ag). O carbono presente é provavelmente oriundo da fita de carbono usada para a fixação das amostras enquanto os elementos oxigênio e nitrogênio possivelmente provêm dos sais usados na produção das nanopartículas. Esses dados ratificam a ideia de que o produto obtido pela síntese se trata realmente de AgNPs.



Figura 22: Espectroscopia de Raio-X por dispersão em energia no microscópio eletrônico de varredura (MEV). A) Imagem obtida pelo MEV por sinal elétron secundário do *pellet*.
B) Espectro de dispersão de Raio-x C) Imagem obtida pelo MEV por sinal retroespalhado com cruz vermelha indicando o lugar onde foi obtido o espectro.

5.2.2- Caracterização da estrutura cristalina das AgNPs sintetizadas quimicamente

Com o intuito de confirmar a identidade das supostas AgNPs, foram feitas análises usando a técnica de difração de raio X em pó. Após a secagem, o *pellet* das AgNPs foi depositado em alça de náilon, conforme apresentado na Fig. 23A. A análise resultou na

obtenção de um padrão de difração (Fig. 23B) e um difratograma (Fig. 23C) que relaciona intensidade e ângulo de difração (ângulos 2θ).

No difratograma de raio X, pode-se observar que os picos de difração mostraram considerável alargamento, indicando, assim, a característica nanométrica das partículas do pó de AgNPs. O padrão de DRX (Fig.20C) confirmou a identidade das AgNPs e o difratogrma obtido mostrou picos a 2 θ de cerca de 38°, 44°, 64° e 77°, compatível com planos de cristalino (111), (200), (220) e (311), respectivamente, sugerindo uma natureza cristalina cúbica das AgNPs, correspondente aos encontrados na literatura relacionados a AgNPs (JCPDS N°. 89-3722).



Figura 23: AgNps depositadas em alça de náilon (A), padrão de difração de raios-X da amostra (B) e difgratograma de raio-x (C).

5.2.3 - Dirspersão em meio de cultura das AgNPs por espalhamento de luz

Com a finalidade de estudar a dispersão das AgNPs em meio de cultura pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), os resultados mostraram no geral tamanhos hidrodinâmicos que variam muito de acordo com o meio onde as nanopartículas estão suspensas, sendo eles: água e meios de cultura diversos (DMEM HIGH/LOW e RPMI). O tamanho hidrodinâmico das AgNPs em água (Fig. 24A) apresentou dois picos: o primeiro (maior) no intervalo de 10 a 100 nm e o segundo (menor) no intervalo de 120 nm a 1100 nm e um tamanho médio de 38,9 nm. Esses valores demonstram a presença de agregação das AgNPs que teriam o valor teórico de 20 nm e ratificam que, mesmo em água, a estabilidade das AgNPs não é perfeita. O segundo pico citado corresponde a aglomerados de AgNPs. Podemos ver nas análises do tamanho hidrodinâmico no meio DMEN-HIGH (Fig. 24B), a presença de dois picos distintos, o primeiro deles (consideravelmente menor) apresenta os intervalos e 8 nm a 80 nm condizendo em grande parte com os valores do primeiro pico das análises em água. O segundo pico (consideravelmente maior) apresenta valores correspondentes ao intervalo aproximado de 500 nm a 1200 nm e os valores dos dois picos analisados levaram a uma média de 298,7 nm. Os dados relativos ao meio RPMI (Fig. 24C), por sua vez, apresentaram três picos de tamanhos: dois picos menores (8-10nm, 20 - 70nm, respectivamente) condizentes novamente com o primeiro pico das análises em água e um terceiro grande pico que apresenta tamanhos no intervalo de 120 nm a 1100 nm. Esses valores levaram a uma média de 140 nm. Por fim, o gráfico referente ao meio DEMEN-LOW (Fig. 24D) apresentou apenas um grande pico com um intervalo de tamanho de 100nm a aproximadamente 5000 nm e uma média de tamanho de 343,4 nm.

Todas as análises no geral demonstraram bastante aglomeração AgNPs, sendo que as análises feitas em meios de cultura mostraram tamanhos muitos maiores indicando um maior nível de aglomeração provavelmente consequente de uma menos estabilidade das NPs no meio.



Figura 24: Gráficos de tamanho de AgNPs dispersas em água (A), meio DMEN- HIGH (B), meio RPMI (C) e DMEN-LOW (D).

5.2.4- Estudo proliferativo do efeito de AgNPs em células tumorais e não tumorais

As AgNPs produzidas quimicamente foram avaliadas quanto ao efeito antiproriferativo contra cultura de células não tumorais (HFF-1) e tumorais (U87). A proliferação foi avaliada por meio de análise celular de alto conteúdo. As imagens representativas (Fig. 25) do experimento de 48 horas nas condições controle, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 40 μ g/mL, 80 μ g/mL mostram imagens semelhantes onde não é possível distinguir visualmente qualquer mudança devido aos tratamentos. Qualquer dado a ser extraído delas depende de uma análise usando *software* específico.



Figura 25: Imagens representativas da análise de alto conteúdo em células HFF-1 (A-E) e U87 (F-J) no tempo de 48 h.oras Sinal azul referente a DNA corado com Hoescht. Barra (200µm) se aplica a todas as imagens.

Os percentuais de proliferação de células HFF-1 (Fig. 26A) após 24 horas de tratamento com as concentrações 10, 20, 40 e 80 µg/mL de AgNPs foram de 98,30%, 84,26%, 16,01% e 24,32% respectivamente. Após 48 horas (Fig. 26B) de tratamento, os percentuais de proliferação mantiveram padrão semelhante, decrescendo de acordo com a concentração de AgNPs e tendo um leve aumento na concentração (80 µg/mL) mais alta. Os valores percentuais para o intervalo de concentrações foram 87,28, 80,56, 5,48, 10,49. No tempo final do tratamento (72H, Fig. 26C), os percentuais de proliferação foram 72,8 para a concentração de 10 µg/mL e 64,99 para a concentração de 20 µg/mL. As duas últimas concentrações (40, 80 µg/mL) apresentaram valores de proliferação negativos (-4,2% e -14,9%) indicando que, no final do experimento, havia menos células que no começo. Por outro lado, os dados de proliferação relativos às células u87 (Fig. 27) mostram o tratamento com AgNPs, após 27h (Fig. 27A) induzindo um aumento da proliferação na concentração mais baixa (10 µg/mL) com o percentual de 138,65% e diminuindo a proliferação a partir da concentração 20 µg/mL até chegar na concentração de 80 µg/mL com os valores de proliferação respectivos de 97,50%, 39,81% e 35,30%. Após 48 horas (Fig. 27B) de tratamento com as células U87, os valores de proliferação seguiram o mesmo padrão, sendo eles 120,06% para 10 µg/m, 71,21 para 20 µg/mL, 30,60 para 40 µg/mL e, por fim, 36031% para 80 µg/mL. No tempo final de tratamento (72H, Fig. 27C) dessas células, a concentração mais baixa de AgNPs (10 µg/mL) continuou induzindo aumento da proliferação com 113,53%. A partir dessa concentração, os valores de proliferação decrescem progressivamente com valores de 67,85% para a concentração de 20 µg/mL e 22,68 para a concentração de 40 µg/mL. A maior concentração de AgNPs (80 µg/mL) neste tempo de tratamento causou uma proliferação negativa (-9,04%) indicando que, após 72 horas do tratamento com a concentração de 80 µg/mL, restou uma quantidade de células menor do que no começo do experimento. No geral, os dados obtidos no experimento de proliferação mostram as AgNPs diminuindo a proliferação de células não tumorais (HFF-1) e tumorais (U87).



Figura 26: Gráficos de proliferação das células HFF-1 nos tempos de 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de tratamento com AgNPs.



Figura 27: Gráficos de proliferação das células U87 nos tempos de 24(A), 48 (B) e 72h (C) de tratamento com AgNPs.

Os dados de proliferação foram usados para calcular os valores de IC₅₀ em função do tempo de tratamento (tabela 1 e Fig. 28). Os valores de IC₅₀ obtidos para a célula HFF-1 decresceram em função do tempo de tratamento apresentando os valores 27,3, 21,7 e 12,6 μ g/mL para os tempos de 24, 48 e 72h, respectivamente. Já para as células U87, os valores decresceram do tempo 24 para o 48h e depois se mantiveram similares. Os valores achados foram 12,06, 5,11 e 5,4 μ g/mL para os tempos 24, 48 e 72h respectivamente. Se comparados, esses dados mostram as AgNPs inibindo a proliferação de forma mais eficiente em células U87.

Tempo Tratamento	IC50 HFF-1	IC50 U87
24h	27,3	12,061
48h	21,702	5,11
72h	12,625	5,399

Tabela 1: Tabela mostrando os valores calculados de IC_{50} para as células HFF-1 e U87 nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento.



Figura 28: Gráfico mostrando o IC₅₀ de células HFF-1 (eixo y esquerda, círculos pretos) e U87 (eixo y direita, quadrados pretos) em função do tempo de tratamento (eixo x).

Os valores obtidos de proliferação possibilitaram o cálculo dos valores de inibição em função da concentração de AgNPs para os tempos 24, 48 e 72h (Fig. 29, 30). Os valores de inibição para a célula HFF-1 (Fig. 29) nos tempos de 24 (Fig. 29A) e 48h (Fig. 29B) crescem em função do aumento da concentração de AgNPs apresentando apenas um pequeno decréscimo na última concentração (80 μ g/mL). No tempo de 24 horas, temos uma inibição que varia de 1,69% a 75,67 % e, no de 48 horas, temos uma inibição que varia de 12,7 a 89,05 %. Os valores de inibição para o tempo de 72 horas (Fig. 29C) cresceram novamente em função do aumento da concentração apresentando uma variação 26,4 a 117,9%. Esses dados mostram as AgNPs influindo diretamente na inibição da proliferação das células HFF-1. Em todos os gráficos referentes aos tempos de tratamento (24, 48, 72h) para a célula U87 (Fig. 30A, 30B e 30C), foram observados o mesmo padrão onde o percentual de inibição cresce em função da concentração de AgNPs. Os gráficos de 24, 48, e 72h apresentam valores percentuais de inibição que variam de -28,6% a 64,7%, 20,06% a 73,6% e -13,5% a 109,0% respectivamente. Esses valores mostram as AgNPs inibindo diretamente a proliferação das células U87 e aumentando a inibição em função da concentração usada no tratamento.



Figura 29: Inibição da proliferação de células HFF-1 referentes aos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72h (C) de tratamento com AgNPs.



Figura 30: Inibição da proliferação de células U87 referentes aos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72h (C) de tratamento com AgNPs.

5.2.5 - Taxa de crescimento e tempo de duplicação de células tumorais e não tumorais tratadas com AgNPs

Com o objetivo de analisar em mais detalhe o efeito do tratamento com AgNPs nas células não tumorais (HFF-1) e tumorais (U87), foi realizada a quantificação da capacidade proliferativa das células tratadas e não tratadas. Para isso, estimou-se a taxa, de crescimento (Fig. 31A, 31B) e tempo de duplicação (Fig. 31C, 31D) da população. O tratamento com as concentrações 10 e 20 µg/mL nas células HFF-1 (Fig. 31A) levaram a uma diminuição aproximada de 40% da taxa de crescimento (em comparação com células não tratadas) e, para as concentrações restantes (40 e 80 µg/mL), não foi possível o cálculo da taxa de crescimento, visto que nenhuma proliferação foi detectada, o que evidencia a agressividade do tratamento. Em contraste, para as células U87 (Fig. 31B), a concentração de 10 µg/mL levou a um aumento de aproximadamente 30% na taxa de crescimento, enquanto as concentrações 20 e 40 µg/mL levaram a uma grande diminuição da taxa de crescimento (~40% e ~80% respectivamente). Novamente, pelos mesmos motivos, não foi possível o cálculo da taxa de crescimento para a concentração de 80 µg/mL. Os tempos de duplicação para as células HFF-1 (Fig. 31C) aumentaram em torno de 20% nas concentrações de AgNPs de 10 e 20 µg/mL, enquanto os tempos para as concentrações 40 e 80 µg/mL não foram possíveis de ser calculados. Por sua vez, os tempos de duplicação para a células U87 (Fig. 31D) diminuíram em torno de 10% para a concentração de 10 µg/mL e aumentaram levemente (~10%) para a concentração de 20 µg/mL. O tempo de duplicação aproximadamente dobrou para a concentração de 40 µg/mL e, para a concentração de 80 µg/mL, não foi possível o cálculo do tempo de duplicação. Esses dados mostran as AgNPs interferindo de forma mais acentuada no tempo de duplicação e na taxa de crescimento em concentrações iguais ou acima de 20 μg/mL.



Figura 31: Gráficos de Taxa de crescimento (A, B) e tempo de duplicação (C, D) referentes às células HFF-1 (A, C) e U87 (B, D no tempo de tratamento de 72h.

5.2.6- Quantificação da área dos Núcleos e quantidade de DNA de células tumorais e não tumorais tratadas com AgNPs

Usando todo o potencial da técnica de análises de alto conteúdo, resolvemos captar e analisar os dados referentes à área do núcleo e intensidade de fluorescência do sinal de DNA (marcador DNA Hoechst), valor que está diretamente ligado à quantidade de moléculas de DNA.

No gráfico referente à célula HFF-1 com o tempo de 24h (Fig. 32A), os valores de área de núcleo e intensidade de fluorescência progridem de acordo com a concentração de AgNPs. Temos ambos os valores decrescendo em função da concentração chegando ao seu menor valor (130 μ m²/662 u.a.) na concentração 40 μ g/mL. Após o decréscimo, ocorre um aumento nesses valores que, ao alcançar a concentração 80 μ g/mL, atingem os valores de 161,6 μ m² e 684,3 u.a.. Já nos valores referentes ao tempo 48h (Fig. 32B), as áreas dos núcleos crescem até a concentração 20 μ g/mL, enquanto a intensidade de

fluorescência decresce. Ambos os valores chegam ao seu pico e ao vale, atingindo respectivamente 144,1 μ m² e 738,4 u.a.. Após esse acréscimo e decréscimo proporcionais, temos os dois valores convergindo para um valor mediano de 1335,8 μ m² e 761,3 u.a. Por fim, o gráfico referente ao tempo 48h (Fig. 32C) apresenta um padrão semelhante ao do tempo 48 horas, tendo novamente valores máximo e mínimo (144,4 μ m², 560,2 u.a.) na concentração de 20 μ g/mL e novamente voltam a convergir de forma a atingir os valores de 142,8 μ m² e 607,8u.a.

Nos gráficos referentes à célula U87 (Fig. 33), temos valores que oscilam muito em função da concentração não apresentando padrões aparentes como nos gráficos das células HFF-1. No gráfico relativo ao tempo de 24 horas, temos valores de área de núcleo que chegam ao seu máximo (139,9 µm²) na concentração 10 µg/mL e, após isso, um decaimento constante culminando no valor 161,6 µm² ligeiramente maior que o referente ao controle (sem AgNPs, 0 µg/mL). Já os valores de intensidade de fluorescência decrescem de forma constante até atingir seu valor mais baixo (657,7 u.a.) na concentração 40 µg/mL e posteriormente sobe até um valor semelhante ao da amostra controle atingindo, sendo ele 684,3 u.a.. Os valores de área e intensidade vistos no gráfico de 48 horas, por sua vez, apresentam padrão semelhante. Ambos os valores decrescem a um mínimo, 138,2 µm² em 10 µg/mL e 831,9 em 20 µg/mL. A partir daí, os valores de área somem chegando ao seu máximo em 146,2 µm² na concentração 80 µg/mL. Por outro lado, os valores de intensidade também sobem até a concentração 80 µg/mL, entretanto o valor atingido (847,5 u.a.) é bem menor que o das amostras controle. Por fim, o tempo de 72 horas referente à célula U87 apresenta valores que decrescem e aumentam mais de uma vez até chegar ao valor referente à concentração 80 µg/mL. Apesar de apresentar valores difusos, ressaltamos que os valores, apesar de oscilarem bastante, chegam à maior concentração com valores bem discrepantes ao controle: a área começa com o valor 144,1 μ m² e termina com um valor muito maior (154,1 μ m²), e por sua vez, a intensidade começa com o valor 731,4 u.a. e termina com um valor muito menor (656,1 u.a.).

		CNT	10	20	40	80
			µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
	Oh	112,9	115,7	114,4	116,3	115,5
HFF-1	24h	159,2	158,5	156,5	161,0	161,6
	48h	133,7	140,6	144,1	143,4	135,8
	72h	131,1	137,8	144,4	142,3	142,8
	Oh	104,4	107,2	107,4	106,2	104,1
U87	24h	136,1	139,9	137,9	137,7	137,2
	48h	139,4	138,2	139,5	141,5	146,2
	72h	144,1	148,9	144,2	143,6	154,1

Tabela 2: Área dos núcleos de células HFF-1 e U87 nas diferentes concentrações (10, 20, 40 e $80 \mu g/mL$) e tempos de experimento (24, 48 e 72 horas).

Tabela 3: Intensidade de fluorescência de células HFF-1 e U87 nas diferentes concentrações (10, 20, 40 e 80 μ g/mL) e tempos de experimento (24, 48 e 72 horas).

		CNT	$10 \mu g/mL$	$20\mu g/mL$	$40\mu g/mL$	$80\mu g/mL$
	Oh	983,5	890,1	897,1	884,2	887,1
HFF-1	24h	685,5	675,7	672,3	657,7	684,3
	48h	814,7	748,1	738,4	754,8	761,3
	72h	662,4	589,9	560,2	597,4	607,8
	Oh	1299,2	1256,9	1218,9	1307,8	1249,9
U87	24h	931,6	890,9	920,1	888,3	934,7
	48h	881,8	861,1	831,9	846,1	847,5
	72h	731,4	711,7	682,9	702,6	656,1



Figura 32: Gráficos de área de Núcleo e intensidade de fluorescência de células HFF-1, referentes aos tempos 24 (A), 48 (B) e 72h (C) de tratamento com AgNPs.



Figura 33: Gráficos de área de Núcleo e intensidade de fluorescência de células U87, referentes aos tempos 24 (A), 48 (B) e 72h (C) de tratamento com AgNPs.

5.2.7- Obtenção de viabilidade, IC50 e índice de seletividade

A relação da concentração de nossa AgNPs com a proliferação das células utilizadas foi estudada por meio de experimentos usando a técnica colorimétrica MTS com o auxílio de um espectrofotômetro. As células controle HFF-1 (Fig. 34A) apresentaram dados de viabilidades que variaram entre 40 e 100% no range de

concentrações de AgNPs escolhido $(0 - 100 \ \mu g/mL)$ e apresentam um IC₅₀ calculado (dose capaz de matar 50% das células) com o valor de 28,16 $\mu g/mL$. Por outro lado, as células tumorais U87 (Fig. 34B) apresentaram uma viabilidade que varia em torno de 10 – 100 % no intervalo de concentrações de AgNPs e um valor de IC₅₀ de 18,39 $\mu g/mL$. Quando comparamos os dois gráficos, vemos claramente que o mesmo intervalo de concentrações de AgNPs levou a viabilidades menores quando se trata da célula U87, esse fato é corroborado pelos valores de IC₅₀ encontrados. O valor de IC₅₀ obtido para as células U87 é aproximadamente 40% menor se comparado ao valor encontrado para a célula HFF-1.

Com os dados obtidos através do cálculo de IC_{50} , foi medido o índice de seletividade do tratamento e o valor obtido foi de 1,531. O valor obtido (>1) indica um tratamento seletivo.



Figura 34: Gráficos de viabilidade (concentração x viabilidade) de células HFF-1 (A) e U87 (B).

5.2.8 - Morfometria de células tumorais e não tumorais utilizando microscopia óptica

Com a finalidade de analisar mudanças no corpo celular após tratamento com AgNPs, realizamos medidas de área das células usando imagens de microscopia óptica de contraste interferencial (DIC). As células HFF-1 (Fig. 35A, 35B) apresentaram um tamanho aproximado três vezes maior que as células U87 (Fig. 35C, 35D). As mudanças morfológicas não foram constatáveis visualmente entre amostras tratadas (Fig. 35B, 35D) e não tratadas (Fig. 35A, 35C). Mais informações só foram obtidas perante à morfometria exposta a seguir. Com a morfometria (Fig. 36), podemos ver células HFF-1 controle apresentando uma área média de 5200 µm² e as células tratadas, uma área média de 4300

 μ m². Esses dados mostram que o tratamento com AgNPs resultou em uma diminuição (10%) estatisticamente significativa na área das células HFF-1. Já as células U87 controle e tratadas apresentaram áreas médias semelhantes estatisticamente com valores em torno de 1000 μ m² e 800 μ m² respectivamente.



Figura 35: Microscopia óptica de células HFF-1 (A, B) e U87 (C, D) tratadas (B, D) e não tratadas (A, C) com AgNPs.



Figura 36: Gráfico da área de células HFF-1 e U87 controle e tratadas com AgNPs. * indica diferença estatística obtida através de teste estatístico T (p<0,05).

5.2.9 - Morfometria de células tumorais e não tumorais utilizando MEV

As imagens de elétron secundário de célula HFF-1 controle em menor (Fig. 37A) e maior (Fig. 37B) aumento apresentaram células espraiadas com membranas bem definidas e estrutura microfibrilar do citoesqueleto visível sob a membrana plasmática na imagem em maior aumento. O tratamento com AgNPs (Fig. 37C, 37D) não causou diferenças aparentes na forma das células apresentando células também espraiadas, no entanto as membranas não aparecem de forma íntegra, podendo observar o aparecimento de diversos poros. As células U87 (Fig. 37E-37H) apresentaram resultado semelhante: novamente as células tratadas com AgNPs (Fig. 37G, 37H) apresentaram morfologia semelhante às não tratadas (Fig. 37E, 37F) e novamente vemos o aparecimento de poros na membrana plasmática. As imagens de células HFF-1 (Fig. 35) e U87 (Fig. 39) contêm amostras controle (Fig. 38A, 38B; Fig. 39A, 39B) e tratadas (Fig. 38C, 38D; Fig. 39C, 39D) e regiões de interesse (Fig. 38 E; Fig. 39 E) usadas em microanálise (espectro mostrando a presença de prata metálica) (Fig. 38F; Fig. 39F). Podemos ver nas imagens controle de células HFF-1 a ausência de pontos brancos correspondentes às AgNPs, pontos esses que são vistos nas imagens relativas a células tratadas (Fig. 38C, 38D) localizados predominantemente nas periferias das células (setas amarelas). O espectro (Fig. 38F) apresentou pico relativo à prata metálica com energia em torno de 3keV. Por outro lado, as células U87 (Fig. 39) apresentaram novamente resultado similar às com o aparecimento de pontos claros (setas amarelas) dispersos na superfície das células

tratadas (Fig. 39C, 39D) e predominantemente na periferia das células. O espectro extraído do aglomerado visto em Fig. 39D pode ser visto na Fig. 39E contendo o pico relativo à prata metálica (~3,2 keV).



Figura 37: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células HFF-1 (A - D) e U87 (G-H) de amostras controle (A, B, E, F) e tratadas com AgNPs (C, D, G, H).


Figura 38: Imagens de microscopia eletrônica de varredura utilizando o sinal retroespalhado de células HFF-1 controle (A, B) e tratadas com AgNPs (C, D). Imagem mostrando em vermelho região de interesse (círculo vermelho) para microanálise (E) e espectro obtido (F).



Figura 39: Imagens de microscopia eletrônica de varredura utilizando o sinal retroespalhado de células U87 controle (A, B) e tratadas com AgNPs (C, D). Imagem mostrando em vermelho região de interesse para microanálise (E) e espectro obtido (F).

5.2.10- Análise da morfologia da superfície de células tumorais e não tumorais por AFM

A análise morfológica (Fig. 40) de células HFF-1 antes (Fig. 40A, 40C, 40E) e após tratamento (Fig. 40B, 40D, 40F) apresentaram no geral células (Fig. 40A, 40B) bem espraiadas e aderidas ao substrato. No entanto, podemos observar nas células não tratadas uma melhor organização microfribrilar e uma orientação direcional aparente. Nas amostras tratadas, foi observada uma menor organização microfibrilar não podendo se

determinar uma orientação única e o aparecimento de poros (setas amarelas), vistos em destaque na Fig. 40F, foi observado. Já a análise morfológica das células U87 (Fig. 41) de células antes (Fig. 41A, 41C, 41E) e após tratamento (41B, 41D, 41F) também apresentou no geral células bem espraiadas; no entanto, diferente das células HFF-1, não foi possível uma boa observação da estrutura microfibrilar do citoesqueleto. O tratamento com AgNPs (Fig. 41B, 41D, 41E) causou nas células o aparecimento de poros (setas amarelas).



Figura 40: Imagens de células HFF-1 de microscopia de força atômica (sinal topografia) de amostras controle (A, C, E) e tratadas com AgNPs.



Figura 41: Imagens de células U87 de microscopia de força atômica (sinal topografia) de amostras controle (A, C, E) e tratadas com AgNPs.

Os poros observados nas imagens de AFM foram medidos e os resultados estão expostos em Fig.42. Podemos ver, em Fig. 42A, D, as imagens de topografia mostrando área onde foi feita a secção transversal e, nas Fig. 43B, E, as reconstruções tridimensionais dessas imagens. Nas Fig. 42C, F, podemos observar os gráficos mostrando a secção transversal em si com o diâmetro do poro exposto nas imagens. As

Fig. 42A, 42B, 42C são relativas às células HFF-1 e Fig. 42D, 42E, 42F são relativas às células U87. Os dados obtidos nas medidas vistas foram sumarizados no gráfico exposto em Fig. 43. O tratamento com AgNPs causou em células HFF-1 poros com diâmetro médio em torno de 150 nm e variando entre 100 e 220 nm de diâmetro. Por outro lado, os poros causados nas células U87 apresentaram um diâmetro com média em torno de 130 nm e variando entre 50 e 220 nm de diâmetro.



Figura 42: Imagens de topografia de células HFF-1 (A) e U87 (D) e suas respectivas reconstruções tridimensionais (B, E) e gráficos de secções transversais (sinal de topografia na linha selecionada, na região de interesse) (C, F).



Figura 43: Medida do diâmetro dos poros das células HFF-1 e U87 tratadas com AgNPs.

Realizamos medidas de rugosidade média quadrática (Rq) em regiões perinucleares e periféricas (Fig. 44A) de células saudáveis (HFF-1) e cancerígenas (U87) tratadas (24h, 48h) e não tratadas com AgNPs. A célula U87 (Fig.44C) apresentou rugosidades muito mais altas se comparadas à célula HFF-1 (Fig.44B). A rugosidade aumentou consideravelmente em amostras tratadas com AgNPs em função do tempo. Em todos os casos, não foi possível observar diferenças estatísticas entre as regiões periféricas e perinucleares; no entanto, todas as diferenças foram significativas entre as células tratadas e controle, incluindo a diferença entre amostras tratadas 24h e 48.

A relação entre a rugosidade obtida em imagens de microscopia de força atômica e a viabilidade medida no método colorimétrico (MTT) (Fig.45) aumentou em ambos os gráficos de forma inversamente proporcional à viabilidade. No gráfico (Fig. 45A) relativo à célula HFF-1, temos a viabilidade diminuindo à metade em 48 horas e a rugosidade aumentando de aproximadamente 80 nm para aproximadamente 130 nm. Já no gráfico da célula U87 (Fig. 45B), temos a viabilidade reduzindo para a metade em 48h e a rugosidade aumentando de aproximadamente 180 nm até em torno de 280 nm.



Figura 44: Imagem representativa de AFM mostrando regiões (quadrados vermelhos) perinucleares e periféricas (A) e gráficos de rugosidade de células HFF-1 (B) e U87(C). Letras iguais indicam ausência de diferença significativa segundo teste anova (one way, com pós teste Tukey)



Figura 45: Gráficos de viabilidade e rugosidade média em função de tempo de células HFF-1 (A) e U87 (B) tratadas com AgNPs na concentração do IC50.

5.2.11- Análises biomecânicas em AFM de células tumorais e não tumorais

Consequente aos resultados já expostos, realizamos análises em AFM com intuito de estudar diferenças biomecânicas entre células HFF-1 e U87 tratadas e não tratadas.

Vemos na Fig. 46 mapas de força representativos das células HFF-1 controle e tratadas com AgNPs. As análises foram feitas usando o módulo de nedidas quantitativas de força. O tratamento com AgNPs causou na topografia de células HFF-1 (Fig. 46A, 46B, 46I, 46J) alterações na organização do citoesqueleto. Vemos organizações microfibrilares semelhantes nas regiões perinucleares (Fig. 46A, 46I) e periféricas (Fig. 46B, 46J) apresentando organização coesa e ordenada nas células não tratadas (Fig. 46A, 46B) e difusa nas células tratadas (Fig. 30I, 30J). Podemos ver novamente na topografia o aparecimento de poros nas células tratadas com AgNPs. As imagens dos sinais a seguir seguem com valor informativo visual: cada ponto dessas imagens são representações de curvas de forças e, a partir dessas curvas, pode se extrair dados de pico de força (Fig. 46C, 46D, 46L, 46M), deformação (elasticidade) (Fig. 46E, 46F, 46N, 46O) e adesão (Fig. 46G, 46H, 46P, 46Q). Esses dados foram extraídos e posteriormente plotados e analisados numericamente. O tratamento causou nas células HFF-1 mudanças biomecânicas que podem ser observadas nas imagens de pico de força de células tratadas (Fig. 46L, 46M) que apresentam escala de cor mais escura que as imagens de células controle (Fig. 46C, 46D). O sinal de pico de força compreende os sinais de adesão e deformação e uma mudança na escala de cor indica uma alteração nas magnitudes das forças medidas nas amostras. A deformação das células HFF-1 se mostrou maior em células tratadas (Fig. 46N, 46O) do que em não tratadas (Fig. 46E, 46F), e esse fato pode ser observado pela maior presença de áreas (amarelo claro) nas imagens). Uma maior quantidade de deformações indica que o tratamento tornou as células menos rígidas, tanto na região perinuclear quanto periférica. Por fim, o tratamento causou um aumento de adesão de superfície em células tratadas (Fig. 46P, 46Q) se comparada a células não tratadas (Fig. 46G, 46H), e esse aumento é constatado pelas imagens mais claras em regiões de células tratadas.



Figura 46: Mapas de força de AFM de células HFF-1 nas regiões perinucleares (A, C, E, G, I, L, N, P) e periféricas (B, D, F, H, J, M, O, Q) sem tratamento (A-H) e tratadas com AgNPs (I-Q).

Os dados mecânicos extraídos dos mapas de forças podem ser observados em Fig.47. As imagens representativas (Fig.47C-47D) contêm as regiões de interesse (quadrado amarelo) e as curvas de força (gráfico em branco no superior da imagem) extraídas nas regiões perinucleares de células controle (Fig. 47C) e tratadas (Fig. 47D) e periferia de células controle (Fig. 47E) e tratadas (Fig. 47F). A adesão obtida a partir das curvas de força (Fig. 47A) das células HFF-1 apresentou valores médios de: 1,2 μ N para amostras controle periferia não apresentando

diferença estatística entre esses valores. A adesão das regiões perinuclear e periférica de células tratadas apresentaram valores estatisticamente diferentes de 1,25 μ N e 1,4 μ N, respectivamente. Os valores de adesão da periferia de células tratadas são estatisticamente maiores que os valores de todas as outras amostras mostrando que a região foi mais suscetível ao tratamento. Os dados relativos à rigidez (Fig. 44B) expuseram valores médios de 15 kPa para amostras controle perinuclear, 13 kPA para amostras controle periferia. Foram constatadas em teste estatístico somente diferenças significativas entre os valores de rigidez de amostras controle e tratadas sendo que, dentro desses grupos, não foram observadas diferenças significativas. Esses dados mostram o tratamento diminuindo a rigidez da superfície das células.



Figura 47: Gráficos de adesão (A) e rigidez (B) de células HFF-1 com AgNPs e imagens de topografia de células HFF-1 controle (C, E) e tratadas (D, F) das regiões perinucleares (C, D) e periféricas (E, F) contendo as regiões de interesse (quadrado pontilhado) onde foram extraídas as curvas de força (gráfico branco na parte superior das imagens). * indica presença de diferença significativa segundo teste Anova (*one way*, pós teste Tukey).

Os mapas de força (Fig. 48) representativos das células U87 controle e tratadas com AgNPs mostraram que o tratamento com AgNPs não causou mudança aparente na topografia de células U87 (Fig. 48A, 48B, 48I, 48J); no entanto, podemos ver novamente o aparecimento de poros nas células tratadas com AgNPs (Fig. 48I, 48J). O tratamento com AgNPs causou nas células U87 mudanças biomecânicas que podem ser observadas nas imagens de pico de força de células tratadas (Fig. 48L, 48M) que apresentam novamente escala de cor mais escura que as imagens de células controle (Fig. 48C, 48D). A deformação das células U87 desta vez se mostrou também maior em células tratadas (Fig. 48N, 48O) do que em não tratadas (Fig. 48E, 48F), e esse fato é evidenciado pela cor mais clara das imagens. Esse resultado indica que o tratamento tornou as células menos rígidas, tanto na região perinuclear quanto periférica. Por fim, o tratamento também causou nas células U87 um aumento de adesão de superfície em células tratadas (Fig. 48P, 48Q) se comparado a células não tratadas (Fig. 48G, 48H), e esse aumento também é constatado pelas imagens mais claras em regiões de células tratadas.



Figura 48: Prancha contendo imagens de AFM de células U87 nas regiões perinucleares (A, C, E, G, I, L, N, P) e periféricas (B, D, F, H, J, M, O, Q) sem tratamento (A-H) e tratadas com AgNPs (I-Q).

Os dados mecânicos extraídos dos mapas de forças (Fig. 49) contêm as imagens representativas (Fig. 49C -49D) das regiões perinucleares de células controle (Fig. 49C) e tratadas (Fig. 49D) e as regiões de interesse (quadrado amarelo) onde as curvas de força (gráfico em branco no superior da imagem) foram extraídas. A adesão (Fig. 49A) das células U87 apresentou valores médios estatisticamente diferentes: de 11,2 μ N para amostras controle perinuclear e 18,5 μ N para amostras controle periferia. A adesão das regiões perinuclear e periférica de células tratadas seguiram o mesmo padrão, apresentando valores estatisticamente diferentes: 42,1 μ N e 46,1 μ N, respectivamente. Os valores de adesão obtidos de células U87 são todos significativamente diferentes entre si e evidenciam uma adesão que aumenta nas periferias das células e um tratamento que promove um aumento da adesão das superfícies. A rigidez (Fig. 49B) das células U87 expôs valores médios de 13,8 kPa para amostras controle perinuclear; 14,5 kPA para amostras controle periferia; 10,2 kPa para amostras AgNPs perinuclear; 9,9 kPa para amostras AgNPs periferia. Foram novamente constatadas em teste estatístico diferenças significativas somente entre os valores de rigidez de amostras controle e tratadas, sendo que, dentro desses grupos, não foram observadas diferenças significativas. Esses dados mostram uma rigidez semelhante nas regiões periféricas e perinucleares e o tratamento diminuindo a rigidez da superfície das células.



Figura 49: Gráficos de adesão (A) e rigidez (B) de células U87 com AgNPs e imagens de topografia de células U87 controle (C, E) e tratadas (D, F) das regiões perinucleares (C, D) e periféricas (E, F) contendo as regiões de interesse (quadrado pontilhado) onde foram extraídas as curvas de força (gráfico branco na parte superior das imagens). * indica presença de diferença significativa segundo teste Anova (*one way*, pós teste Tukey).

6 - Discussão

As NPs à base de prata são amplamente usadas em diversos setores da indústria. AgNPs, por exemplo, podem ser encontradas em diversos produtos como eletrodomésticos, roupas e cosméticos. O amplo uso das AgNPs se deve basicamente à sua constatada atividade antimicrobiana (KIM et al., 2007). Nosso grupo, quando começou a enorme caminhada nos estudos relacionados as NPs à base de prata, optou por sintetizar NPs de forma biológica e as razões para isso foram muitas (citar os papers Veronica, Mateus, Nathalia). A biossíntese de NPs estava de acordo com às crescentes preocupações com o meio ambiente e os diversos aspectos econômicos por ser um processo considerado mais barato que a síntese física e menos tóxico do que o método químico. A aplicação de microrganismos como leveduras, bactérias, cianobactérias, microalgas e extratos de plantas (NAVEEN et al., 2010; JAIN & AGGARWAL, 2012; SINGH et al., 2014; JENAA et al., 2013) tem sido amplamente estudada e documentada como um método ecológico para produzir NPs à base de prata. Apesar das enormes vantagens de uma biossíntese de NPs nosso grupo resolveu investir também na síntese química de AgNPs. As AgNPs produzidas quimicamente têm como ponto forte a homogeneidade de tamanho e forma (um ponto fraco de NPs biossintetizada) e, além disso, a funcionalização nas NPs quimossintetizadas é muito facilitada abrindo para o grupo um leque muito grande de estudos relacionados a NPs à base de prata e sua interação com organismos em geral.

O presente utilizou AgCl-NPs sintetizadas por bactérias da espécie *Bacillus megaterium* de acordo com o trabalho CHARELLI *et al*, 2018. Essas AgCl-NPs (partícula previamente caracterizada em outros trabalhos do nosso grupo) foram brevemente caracterizadas usando microscopia eletrônica de transmissão e apresentaram um tamanho médio de 13 nm, que é descrito como ótimo para atividade antimicrobiana em JEONG & LIM, 2014. As AgCl-NPs foram testadas quanto ao seu efeito na ultraestrutura de bactérias e provocaram mudanças morfológicas e estruturais em bactérias *Pseudomonas aerugios*. No presente trabalho, foram constatadas presença de poros e falhas nas paredes celulares das bactérias, além de aparecimento de áreas eletrolucentes internas nas micrografias eletrônicas indicando uma interação e degradação de material genético. A interação de NPs à base de prata com parede celular de bactérias pode ser vista nos trabalhos AHMAD et al, (2016) e JOSHI & MIJAKOVIC, (2020) e a interação com material genético pode ser vista em GOSWAMI *et al.*, (2017) e ALIZADEH et al., (2018). O aparecimento de áreas eletrolucentes após tratamento com AgCl-NPs em bactérias *Staphylococcus aureus* ee *Klebsiella pneumoniae* é descrito em DA SILVA *et al.*, (2017).

Em função do fato de que os tratamentos antimicrobianos precisam também necessariamente interagir com células do organismo tratado de forma não destrutiva, fizemos também nesta parte do trabalho estudos da morfologia após interações entre as AgCl-NPs e células de mamíferos, usando técnicas de microscopia óptica, eletrônica e de força atómica. Com o uso da célula HFF-1 como modelo, analisamos a viabilidade celular após o tratamento com as AgCl-NPs biossintetizadas e o valor calculado de IC₅₀ foi de 18,9 µg/mL. Esse valor de concentração foi usado nos tratamentos dos estudos morfológicos consequentes. Nossos resultados mostraram o tratamento com as AgCl-NPs afetando diretamente a forma das células e possivelmente seu citoesqueleto causando uma diminuição significativa na área das células e também uma provável degradação do citoesqueleto vista em micrografias eletrônicas de varredura com membrana extraída. Na literatura, podemos ver diversos trabalhos sobre a interação de NPs à base de prata e citoesqueletos. Em WHEN et al., (2013), é descrita a ligação de AgNPs com actina e tubulina, em KANG et al., (2016) há a constatação das AgNPs induzindo remodelamento de citoesqueleto e, por fim, em XU et al., (2013) as AgNPs comprovadamente causam degenerações no citoesqueleto.

O próximo passo do estudo foi analisar mais a fundo a interação de AgCl-NPs com as células de mamíferos e, desta vez, o modelo de estudo foi a célula LLC-MK₂. A escolha da LLC-MK₂ foi feita em função de ser uma célula epitelial de mamífero de fácil cultivo e manutenção que pode vir a ser um bom modelo para tratamento com AgCl-NPs, já que é vastamente usada em experimentos com agentes infecciosos e parasitários. A morfologia celular é um importante fator indicativo de saúde da célula e qualquer mudança na forma das células pode indicar uma fuga da homeostase (FORD, 2013). O primeiro experimento feito foi com AFM analisando a morfologia de superfície de células tratadas com as AgCl-NPs (concentração do IC₅₀) e não tratadas. As imagens obtidas mostram células únicas que, no geral, não apresentaram grandes diferenças entre as tratadas e não tratadas. Por outro lado, uma análise com possibilidade de se observar um maior campo (MEV) mostrou células tratadas menos espraiadas e a presença de células aparentando estar no estado morte induzida. Na literatura, podemos ver diversos trabalhos com AgNPs biossintetizadas induzindo apoptose em células HT 29 (SAMPUI *et al.*,

2011), MCF-7 (ULLAH *et al.*, 2020) e HuH-7 (BIN-JUMAH *et al.*, 2020). A nossa hipótese para as células mais arredondadas nas amostras tratadas é a perda de pontos de adesão focal e reorganização do citoesqueleto, entretanto esse fato carece de mais investigações em um futuro próximo.

Posteriormente à análise morfológica, fizemos experimentos visando ao entendimento da atuação das AgCl-NPs na ultraestrutura celular. A ultraestrutura celular pode ser definida pelo estudo de estruturas celulares de uma célula e sua aplicabilidade varia desde a caracterização de organismos até a determinação do seu estado de saúde (HERST *et al.*, 2017). As análises de MET mostraram as NPs aparecendo amplamente no interior das células estudadas, muitas vezes em estruturas possivelmente ligadas à via endocítica. Foi possível ver as AgNPs presentes em grandes áreas eletrolucentes indicando uma degradação no interior das células. Tenho em vista esses resultados, o próximo passo foi realizar um experimento que possibilitasse a observação de fenômenos iniciais de captação e internalização das AgCl-NPs e, para isso, foi realizado um experimento com curta interação (10 minutos) com as NPs. Os resultados mostraram as AgNPs presentes em diversas estruturas vesiculares próximas às membranas e resultados semelhantes podem ser vistos em Panzarini, *et al.*, (2018) utilizando diversas células (hemácias e células endoteliais), assim como em Porter et al., (2020) utilizando osteócitos.

A segunda parte do trabalho teve como objetivo estudar o potencial antitumoral de AgNPs quimicamente sintetizada. Para isso, desafiamos células não tumorais (HFF-1) e tumorais (U87) com as nanopartículas na concentração do IC50. Como as AgNPs usadas nesta parte do trabalho foram recém sintetizadas e fizemos uma caracterização mais extensa utilizando as técnicas de difração de raio X, microanálise de raio X e espalhamento de luz dinâmico, esses métodos foram empregados diversas vezes por nosso grupo para a caracterização de NPs à base de prata, e podem ser vistos em DA SILVA *et al.*, (2017), CHARELLI *et al.*, (2018) e EUGÊNIO et al., (2016). A primeira análise realizada com finalidade de caracterização foi a microanálise de raio X, uma importante ferramenta na determinação de composição elementar. Os resultados obtidos mostraram a presença do pico de energia relativo à prata metálica e outros elementos (C, N e O) que se faziam presentes nas soluções usadas na síntese das NPs (exemplo: nitrato de prata, AgNO₃) e na fita de carbono usada fixação da amostra. Posteriormente realizamos análises de difração de raio X que mostraram um padrão de difração condizente com AgNPs, e o mesmo padrão pode visto em MEHTA *et al.*, (2017), JEMAL

et al., (2017) e ANANDALAKSHMI *et al.*, (2015). Por fim, a última etapa da caracterização foi estudar o tamanho hidrodinâmico das AgNPs em dispersões líquidas, pois é sabido que a estabilidade coloidal e o padrão de agregação é muito modificado quando em meios complexos como meios de cultura repleto de eletrólitos, proteínas e lipídeos (MOORE *et al.*, 2015). Nossos resultados mostraram tamanhos muito maiores (~20x) de NPs em meios de cultura do que em água, e esse fato se dá provavelmente devido a uma maior agregação das AgNPs em meios de cultura. As razões para a menor estabilidade e consequente maior taxa de agregação de NPs em meio de cultura são diversas na literatura e, de certo, estão majoritariamente ligadas ao fato de que meios de cultura apresentam uma enormidade de moléculas orgânicas em sua composição. Esses dados deflagram a necessidade de mais estudos visando a melhorar a dispersão de NPs em meios de cultura.

Após a caracterização das AgNPs, utilizamos as mesmas em um estudo proliferativo com células tumorais (U87) e não tumorais (HFF-1) utilizando a técnica de análise celular de alto conteúdo. A análise de alto conteúdo em microscopista ótica é uma ferramenta importante na busca de novas drogas (ou alternativas a drogas) por conseguir proporcionar muitos dados relativos ao comportamento celular após tratamento com o objeto de estudo em questão. Os dados mostraram nossas AgNPs induzindo uma diminuição na proliferação significativa em ambas as células, excetuando-se o fato de que baixas concentrações de AgNPs pareceram induzir proliferação em células U87. Fato semelhante pode ser visto em Li et al., (2016). Os dados obtidos foram usados para calcular valores de IC₅₀ para cada tempo de tratamento (24, 48 e 72h) e os resultados mostraram um IC₅₀ que diminui em decorrer do aumento do tempo de tratamento e se apresenta muito menor na célula tumoral. A melhor relação dos IC50 de células tumorais e não tumorais foi no tempo de 48 horas, no qual o IC50 em células U87 foi em torno de 5 µg/mL (próximo do mínimo encontrado) e em células HFF-1 foi em torno de 20µg/mL (próximo do máximo encontrado). Todos os dados obtidos serviram para mostrar uma inibição que aumenta em função da concentração de AgNPs e uma taxa de crescimento que diminui. Outra análise possibilitada pelo experimento foi a de área de núcleo e intensidade de fluorescência. Esses dados em nosso estudo se mostraram muito heterogêneos e aparentemente o padrão mais facilmente observado foi o da diminuição da intensidade de fluorescência em função do tempo de tratamento. Tal dado pode ser consequência do corante sendo redistribuído, já que o mesmo se encontra adsorvido em moléculas de DNA que irá se replicar no processo e divisão celular ou até mesmo da

degradação do DNA como efeito do tratamento com as AgNPs. Na literatura, existem estudos (ONODERA, *et al.*, 2015; FU *et al.*, 2014) associando AgNPs com a produção de espécies reativas de oxigênio (em células eucarióticas), moléculas amplamente conhecidas por causar danos a moléculas de DNA e RNA.

Após o estudo proliferativo que nos deu dados importantes relativos aos efeitos antiproliferativos das AgNPs, avaliamos o potencial citotóxico das mesmas através de um ensaio de viabilidade utilizando a técnica colorimétrica MTS. Os dados obtidos no experimento mostraram as AgNPs sendo citotóxicas, tanto para as células tumorais (U87) quanto para as não tumorais (HFF-1); no entanto, o IC₅₀ calculado para as células tumorais (28,16 μ g/mL) foi 35% menor que o IC₅₀ calculado para as células não tumorais (28,16 μ g/mL). Esses dados de IC₅₀ levaram a um Índice de seletividade do tratamento calculado de 1,231, indicando que o tratamento com as AgNPs foi seletivo (índice de seletividade >1).

Após o detalhamento do efeito antiproliferativo e citotóxico das AgNPs, utilizamos as técnicas de microscopia óptica e eletrônica para analisar o efeito do tratamento com AgNPs (IC₅₀) na morfologia das células tumorais e saudáveis. Os resultados de microscopia óptica possibilitaram a observação das AgNPs causanso uma diminuição significativa na área celular de células tumorais, e esses dados reafirmam a ideia de que as nanopartículas afetam estruturas responsáveis pela forma das células como o citoesqueleto. As análises morfológicas em MEV mostraram as AgNPs causando poros na membrana celular de células não tumorais e tumorais. Esses poros virão a ser estudados de forma mais extensa utilizando a técnica de AFM.

Com a finalidade de visualizar e localizar as AgNPs nas células tumorais e não tumorais, utilizamos o sinal de MEV de elétron retroespalhado que é capaz de distinguir na imagem materiais de números atômicos diferentes (metais tem número atômico alto e se apresentam nas imagens com um sinal mais claro). Os resultados de sinal retroespalhado mostraram AgNPs dispersas majoritariamente na superfície das células e próximas às extremidades. Esses dados podem estar ligados ao aparecimento dos diversos poros constatados e carecem de estudos mais aprofundados.

Por fim, a última análise morfológica realizada foi utilizando a técnica de AFM, uma técnica pouco explorada, ainda em estudos de efeitos de tratamento de NPS. Os resultados mostraram células não tumorais (HFF-1) tratadas com uma menor organização de citoesqueleto. A técnica não possibilitou a visualização da estrutura do citoesqueleto das células tumorais (U87) possivelmente devido ao fato de ser uma célula muito menos

esticada e consideravelmente mais espessa. Ambas as células (tumorais e não tumorais) apresentaram diversos poros na membrana celular após tratamento com AgNPs. Os poros encontrados têm média de diâmetro de aproximadamente 155nm em células HFF-1 e 120nm em células U87. Poros de diâmetro semelhante (~150nm) foram observados em células de câncer de mama em LARA-CRUZ et al., (2019) após tratamento com AuNPs. Outra mudança constatada nas células tumorais e não tumorais foi aumento significativo na rugosidade da superfície das células. A rugosidade é um parâmetro quantificável que reflete de forma sensível o *status* da célula e uma maior rugosidade na mesma costuma indicar mudança na conformação do citoesqueleto (Lee *et al.*, 2016). Nosso estudo relacionou uma relação direta com o da rugosidade que aumenta no decorrer que a viabilidade diminui. Em KIM et al., (2012), podemos ver o aumento da rugosidade de superfície celular sendo detalhado como um fator indicativo de processo apoptótico em células HeLa e em LEE et al., (2016) e a rugosidade sendo usada como um parâmetro sensível em células de neuroblastomas.

Após os resultados com o uso de AFM, prosseguimos para análises mais complexas, usando a AFM e aproveitando o potencial da técnica de quantificar propriedades nanomecânicas de superfícies. Quantificamos uma maior adesão e uma menor rigidez em ambas as células tratadas com AgNPs indicando mudanças complexas nas propriedades mecânicas da membrana celular. Apesar de pouquíssimos dados na literatura sobre aumento de adesão em superfície de células após tratamentos, a nossa hipótese é de que o aumento na rugosidade cause uma maior adesão da ponteira. Em relação ao aumento da rigidez, parece estar ele ligado às mudanças causadas pelas AgNPs no citoesqueleto das células, em LEE et al., (2016) e ao aumento da rigidez superficial de células tumorais após tratamento com droga que estimula a translocação de microtúbulos para as membranas celulares.

Os resultados apresentados nesse estudo mostram as AgCl-NPs/AgNPs biossintetizadas com importante potencial antimicrobiano e promissora ação antitumoral. Nossa análise geral, usando sempre a microscopia como ferramenta de entendimento de efeito através da visualização, se mostrou efetiva e promissora. Esperamos que os dados obtidos em nosso estudo sirvam para um melhor entendimento da ação e efeito das NPs à base de prata e que, um dia, culmine em um tratamento antimicrobiano e antitumoral efetivo para infecções e cânceres que possam vir a atingir o ser humano.

7- Conclusões

- As AgCl-NPs biossintetizadas causaram degradação do material genético e o aparecimento de poros na parede celular em bactérias *P. Aeruginosa*.
- Em células HFF-1, o tratamento com AgCl-NPs causou diminuição área celular e degradação de citoesqueleto.
- Em células LLC-MK₂, o tratamento com AgCl-NPs causou perda da integridade da membrana plasmática, mudança na forma das células e em alguns casos induziu morte celular.
- Foram vistas AgCl-NPs presentes em estrutura vesiculares e dispersas no citoplasma de células LLC-MK₂ tratadas.
- O tratamento com tempo reduzido em células LLC-MK₂ mostrou a presença de AgCl-NPs predominantemente em vesículas indicando que as NPS seguem via endocítica.
- As AgNPs quimicamente sintetizadas apresentaram dispersões diferentes em água e meio de cultura. Os tamanhos hidrodinâmicos foram consideravelmente maiores em meios de cultura.
- O tratamento com AgNPs causou a diminuição da proliferação de células HFF-1 e U87, sendo que concentrações menores foram capazes de diminuir de forma mais eficiente a proliferação em células U87.
- O tratamento com AgNPs não causou diferença nas áreas dos núcleos de células HFF-1 e U87, no entanto causaram diminuição da intensidade de fluorescência de corante com afinidade com DNA (Hoeschst) indicando degradação de DNA3.
- As viabilidades de células HFF-1 e U87 diminuíram em função do tratamento com AgNPs, no entanto o IC50 foi consideravelmente menor em células (tumorais) U87 indicando um tratamento seletivo.
- O tratamento com AgNPs causou diminuição da área celular somente em células HFF-1.
- Foi constatada a presença de poros na membrana celular em células HFF-1 e U87 após tratamento com AgNPs.
- As análises mostraram as AgNPs localizadas predominantemente nas periferias e associadas a membranas de células HFF-1 e U87.

- O tratamento com AgNPs causou aumento significativo na rugosidade de células HFF-1 e U87. A rugosidade cresceu proporcionalmente à diminuição da viabilidade.
- O tratamento com AgNPs causou mudanças na biomecânica de superfície de células HFF-1 e U87. Células tratadas apresentaram maior adesão e menor rigidez.

8– Referências Bibliográficas

AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J., 2010. Silver nanoparticle applications and human health. Clinica Chimica Acta, v. 411, n. 23–24, p. 1841–1848.

AHMAD, A., WEI, Y., SYED, F., TAHIR, K., REHMAN, A. U., KHAN, A., ... YUAN, Q. (2017). The effects of bacteria-nanoparticles interface on the antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles. **Microbial Pathogenesis.** v.102, p.133– 142.

ALIZADEH V, GOLESTANI EIMANI B, AMJADY F., 2018. Genomic Effect of Silver Nanoparticles in Staphylococcus aureus Bacteria. J. Water Environ. Nanotechnology., 3(1): 51-57.

ALLAHVERDIYEV A.M., ABAMOR E.S., BAGIROVA M., USTUNDAG /, KAYA C., KAYA F., RAFAILOVICH M., 2011. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. International Journal of Nanomedicine, v.6, p.2705–2714.

ANANDALAKSHMI, K., VENUGOBAL, J., & RAMASAMY, V., 2015. Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using Pedalium murex leaf extract and their antibacterial activity. **Applied Nanoscience,** 6(3), 399–408.

ASHARANI, P. V., LOW KAH MUN, G., HANDE, M. P., & VALIYAVEETTIL, S., 2008. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. ACS

Nano, 3(2):279–290.

BARNES, W. L., DEREUX, A., & EBBESEN, T. W., 2003. Surface plasmon subwavelength optics. **Nature**, 424: 824-830.

BIN-JUMAH, M., AL-ABDAN, M., ALBASHER, G., & ALARIFI, S., 2020. Effects of Green Silver Nanoparticles on Apoptosis and Oxidative Stress in Normal and Cancerous Human Hepatic Cells in vitro. **International Journal of Nanomedicine**, Volume 15, 1537–1548.

CAMERON P., GAISER B.K., BHANDARI B., BARTLEY P.M., KATZER F.,

BRIDLE H., 2016. Silver Nanoparticles Decrease the Viability of Cryptosporidium

parvum Oocysts. Applied and Environmental Microbiology, v.82, n.2, p.431–437.

CHARELLI, L. E., MÜLLER, N., SILVA, K. R., LIMA, L. M. T. R., SANT'ANNA,

C., & BAPTISTA, L. S., 2018. Biologically produced silver chloride nanoparticles from

B. megaterium modulate interleukin secretion by human adipose stem cell spheroids.

Cytotechnology.

BURATTINI, S., & FALCIERI, E.2013. Analysis of Cell Death by Electron Microscopy. Necrosis, 1004: 77–89.

CASCIONE, M., DE MATTEIS, V., RINALDI, R., & LEPORATTI, S., 2016. Atomic force microscopy combined with optical microscopy for cells investigation. Microscopy Research and Technique, 80(1), 109–123.

CHARELLI, L., MÜLLER, N., SILVA, K. R., LIMA, L. M. T. R., SANT'ANNA,

C., & BAPTISTA, L. S. Biologically produced silver chloride nanoparticles from B .

megaterium modulate interleukin secretion by human adipose stem cell spheroids. v.

0123456789, 2018

CRUZ, D.S.M., 2010. Biossíntese e Caracterização de Nanopartículas Metálicas. Dissertação submetida ao Departamento de Química e Bioquímica da Universidade de

Lisboa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

DA SILVA FERREIRA, V., CONZFERREIRA, M. E., LIMA, L. M. T. R., FRASÉS, S., DE SOUZA, W., & SANT'ANNA, C., 2017. Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria. Enzyme and Microbial Technology, 97, 114–121.

DAKAL, T. C., KUMAR, A., MAJUMDAR, R. S., & YADAV, V., 2016. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. Frontiers in Microbiology, 7:1-17.

DHILLON, G. S., BRAR, S. K., KAUR, S., & VERMA, M., 2011. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. Critical Reviews in

Biotechnology, 32(1): 49–73.

DREXLER, ERIC, 2004. Nanotechnology: From Feynman to Funding. Bulletin of Science, Technology & Society. 24: 21-27.

ELSAESSER, A., & HOWARD, C. V., 2012. Toxicology of nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews, 64(2):129–137.

EUGENIO, M., MÜLLER, N., FRASÉS, S., ALMEIDA-PAES, R., LIMA, L. M. T. R., Lemgruber, L., ... Sant'Anna, C., 2016. Yeast-derived biosynthesis of silver/silver chloride nanoparticles and their antiproliferative activity against bacteria. RSC Advances, 6(12), 9893–9904.

FERREIRA V.S., SANT'ANNA C., 2017. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. **World J Microbiol Biotechnol** v.33, n.20. DOI: 10.1007/s11274-016-2181-6.

FORD, J., 2013. Red blood cell morphology. **International Journal of Laboratory Hematology**, 35(3): 351–357.

FAKRUDDIN, M., HOSSAIN, Z., & AFROZ, H., 2012. Prospects and applications of

nanobiotechnology: a medical perspective. Journal of Nanobiotechnology, 10(1), 31.

FU, P. P., XIA, Q., HWANG, H.-M., RAY, P. C., & YU, H., 2014. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. Journal of Food and Drug Analysis, 22(1), 64–75.

GAAFAR M.R., MADY R.F., DIAB R.G, SHALABY TH.I., 2014. Chitosan and silver

nanoparticles: Promising anti-toxoplasma agents. **Experimental Parasitology**, v.143, p.30–38.

G.C. PORTER, W.J. DUNCAN, A. JUDE, D. ABDELMONEIM, R.A. EASINGWOOD, D.E. COATES, 2021. Endocytosed silver nanoparticles degrade in lysosomes to form secondary nanoparticle structures during expression of autophagy genes in osteogenic cells, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Volume 33, 10235

GEETHALAKSHMI R., SARADA D.V.L., 2013. Characterization and antimicrobial activity of gold and silvernanoparticles synthesized using saponin isolated from Trianthema decandra L. **Industrial Crops and Products**, v.51, p.107–115.

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

GOSWAMI, G., BORUAH, H., GAUTOM, T., HAZARIKA, D. J., BAROOAH, M., & BORO, R. C., 2017. Chemically synthesized silver nanoparticles as cell lysis agent for bacterial genomic DNA isolation. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 8(4), 045015

GURUNATHAN, S., HAN, J., KWON, D.-N., & KIM, J.-H., 2014. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Nanoscale Research Letters**, 9(1), 373.

HERST, P. M., ROWE, M. R., CARSON, G. M., & BERRIDGE, M. V., 2017. Functional Mitochondria in Health and Disease. Frontiers in Endocrinology, 8.

IVARANI,S., KORBEKANDI, H., MIRMOHAMMADI,S. V., ZOLFAGHARI, B., 2016. Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods.

Research in Pharmaceutical Sciences, 9(6):385-406.

JEONG, Y., LIM, D. W., & CHOI, J., 2014. Assessment of Size-Dependent Antimicrobial and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. Advances in Materials Science and Engineering. v.1, p.1–6.

JEMAL, K., SANDEEP, B. V., & POLA, S., 2017. Synthesis, Characterization, and Evaluation of the Antibacterial Activity of Allophylus serratusLeaf and Leaf Derived Callus Extracts Mediated Silver Nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, 2017, 1–11.

JO Y.K., KIM B. H., JUNG G., 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. **Plant Dis.** V.93, p.1037-1043.

JOSHI, A. S., SINGH, P., & MIJAKOVIC, I., 2020. Interactions of Gold and Silver

Nanoparticles with Bacterial Biofilms: Molecular Interactions behind Inhibition and

Resistance. International Journal of Molecular Sciences. v.21(20), p.7658-7672.

KANG, Y., LIU, J., SONG, B., FENG, X., OU, L., WEI, L., ... SHAO, L., 2016. Potential Links between Cytoskeletal Disturbances and Electroneurophysiological Dysfunctions Induced in the Central Nervous System by Inorganic Nanoparticles. Cellular Physiology and Biochemistry, 40(6), 1487–1505

KHALID M., KHALID N, AHMED I., HANIF R., ISMAIL M., JANJUA H.A.,

2017. Comparative studies of three novel freshwater microalgae strains for synthesis of

silver nanoparticles: insights of characterization, antibacterial, cytotoxicity and antiviral

activities. J Appl Phycol, v.29, p.1851–1863.

KHANNA, P., KAUR, A., & GOYAL, D., 2019. Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. **Journal of Microbiological Methods**, 105656.

KIM, K. S., CHO, C. H., PARK, E. K., JUNG, M.-H., YOON, K.-S., & PARK, H.-K., 2012. AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. **PLoS ONE**, 7(1), e30066.

KIM, J. S., KUK, E., YU, K. N., KIM, J.-H., PARK, S. J., LEE, H. J., ... CHO, M.-

H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine:Nanotechnology, Biology and Medicine. v.3, p.95–101.

KOLAHALAM, L. A., KASI VISWANATH, I. V., DIWAKAR, B. S., GOVINDH, B., REDDY, V., & MURTHY, Y. L. N., 2019. Review on nanomaterials: Synthesis and applications. Materials Today: Proceedings. v.5, n.7, p.1012–1021

KRUMOV N., PERNER-NOCHTA I., ODER S., GOTCHEVA V., ANGELOV A.,

POSTEN C., 2009. Production of Inorganic Nanoparticles by Microorganisms. Chem.

Eng. Technol., v.32, n.7, p.1026–1035.

LAH, I., KHALIL, A. T., ALI, M., IQBAL, J., ALI, W., ALARIFI, S., & SHINWARI, Z. K., 2020. Green-Synthesized Silver Nanoparticles Induced Apoptotic Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cells by Generating Reactive Oxygen Species and Activating Caspase 3 and 9 Enzyme Activities. Oxidative Medicine and Cellular Longevity,

LEE, C.-W., JANG, L.-L., PAN, H.-J., CHEN, Y.-R., CHEN, C.-C., & LEE, C.-H., 2016. Membrane roughness as a sensitive parameter reflecting the status of neuronal cells

in response to chemical and nanoparticle treatments. **Journal of Nanobiotechnology**, 14(1).

LI, C., LI, Z., WANG, Y., & LIU, H., 2016. Gold Nanoparticles Promote Proliferation of Human Periodontal Ligament Stem Cells and Have Limited Effects on Cells Differentiation. Journal of Nanomaterials, 2016, 1–10.

LIU, W., WU, Y., WANG, C., LI, H. C., WANG, T., LIAO, C. Y., JIANG, G. B.,

2010. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. **Nanotoxicology**, 4(3), 319–330.

LOK, C.-N., HO, C.-M., CHEN, R., HE, Q.-Y., YU, W.-Y., SUN, H., CHE, C., 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 12(4):527-534.

MAHMOODI A., SHOORSHINIE S.Z., DORRANIAN D., 2016. Synthesis and

characterization of AgCl nanoparticles produced by laser ablation of Ag in NaCl solution.

Appl Phys A, v.122, p.452-462.

MAJEED, M. I., BHATTI, H. N., NAWAZ, H., & KASHIF, M., 2019. Nanobiotechnology: Applications of Nanomaterials in Biological Research. Integrating Green Chemistry and Sustainable Engineering, 581–615.

MCSHAN, D., RAY, P. C., & YU, H., 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. Journal of Food and Drug Analysis, 22(1):116–127.

MEHTA, B. K., CHHAJLANI, M., & SHRIVASTAVA, B. D., 2017. Green synthesis of silver nanoparticles and their characterization by XRD. Journal of Physics: Conference Series, 836, 012050.

MITTAL, A. K., CHISTI, Y., & BANERJEE, U. C., 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using:plant extracts. **Biotechnology Advances**, 31(2): 346–356.

MOORE, T. L., RODRIGUEZ-LORENZO, L., HIRSCH, V., BALOG, S., URBAN, D., JUD, C., ... PETRI-FINK, A., 2015. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. Chemical Society Reviews, 44(17), 6287–6305.

MUÑOZ R.V., BORJA M.A., LONGORIA E.C.,2014. Ultrastructural Analysis of

Candida albicans When Exposed to Silver Nanoparticles. **Plos One**, v.9, n.10, p. e108876.

OSEGUERA-GALINDO, D. O., MACHORRO-MEJIA, R., BOGDANCHIKOVA, N., & MOTA-MORALES, J. D., 2016. Silver nanoparticles synthesized by laser ablation confined in urea choline chloride deep-eutectic solvent. Colloid and Interface **Science Communications**, 12, 1–4.

ONODERA, A., NISHIUMI, F., KAKIGUCHI, K., TANAKA, A., TANABE, N., HONMA, A., ... KAWAI, Y., 2015. Short-term changes in intracellular ROS

localisation after the silver nanoparticles exposure depending on particle size. **Toxicology Reports**, 2, 574–579.

PANÁCEK A., KVÍTEK L., PRUCEK R., KOLÁR M., VECEROVÁ R., PIZÚROVÁ N., SHARMA V.K., NEVECNÁ T.,2006. ZBORIL R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. J. Phys. Chem. B, v.110, p.16248-16253.

PANZARINI, E., MARIANO, S., CARATA, E., MURA, F., ROSSI, M., & DINI, L.,
2018. Intracellular Transport of Silver and Gold Nanoparticles and Biological Responses:
An Update. International Journal of Molecular Sciences, 19(5), 1305.

PARK, J. H., & OH, N., 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. International Journal of Nanomedicine, 51: 528-536

PAULKUMAR K., RAJESHKUMAR S., GNANAJOBITHA G., VANAJA M., MALARKODI C., ANNADURAI G., 2013. Eco-friendly Synthesis of Silver Chloride Nanoparticles 96 using Klebsiella planticola (MTCC 2277). International Journal of Green Chemistry and Bioprocess, 3:.12-16.

PRABHU, S., & POULOSE, E. K., 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, 2(1)1-10.

RATYAKSHI AND CHAUHAN, R.P.,2009. Colloidal synthesis of silver nanoparticles, **Asian J Chem.**, 21(10):113-S116.

RUPARELIA J.P., CHATTERJEE A.K., DUTTAGUPTA S.P., MUKHERJI S., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta

Biomaterialia, v.4, p.707–716.

SANPUI, P., CHATTOPADHYAY, A., & GHOSH, S. S., 2011. Induction of Apoptosis in Cancer Cells at Low Silver Nanoparticle Concentrations using Chitosan Nanocarrier. ACS Applied Materials & Interfaces, 3(2), 218–228.

SIDDIQUI M.R.H., ADIL S.F., ASSAL M.E., ALI R., AL-WARTHAN A., 2013. Synthesis and characterization of silver oxide and silver chloride nanoparticles with high thermal stability. **Asian J Chem**, v.25, n.6, p.3405-3409.

SLAVIN, Y. N., ASNIS, J., HÄFELI, U. O., & BACH, H., 2017. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. Journal of Nanobiotechnology, 15(1)16-55.

SUJITHA V., MURUGAN K., PAULPANDI M., PANNEERSELVAM C., SURESH U., RONI M. et al., 2015. Green-synthesized silver nanoparticles as a novel control tool

against dengue virus (DEN-2) and its primary vector Aedes aegypti. **Parasitol Res**, v.114, p.3315–3325.

SYAFIUDDIN, A., SALMIATI, SALIM, M. R., BENG HONG KUEH, A., HADIBARATA, T., & NUR, H., 2017. A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global. Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. Journal of the Chinese Chemical Society, 64(7), 732–756.

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

THOMBRE, R. S., SHINDE, V., THAIPARAMBIL, E., ZENDE, S., & MEHTA, S., 2016. Antimicrobial Activity and Mechanism of Inhibition of Silver Nanoparticles against Extreme Halophilic Archaea. **Frontiers in Microbiology**, 7:1-17.

TRINH, N. D., NGUYEN, T. T. B., & NGUYEN, T. H., 2015. Preparation and characterization of silver chloride nanoparticles as an antibacterial agent. Advances in Natural Sciences: **Nanoscience and Nanotechnology**, 6(4): 1-6.

VITHIYA K., SEN S.,2011. Biosynthesis of nanoparticles. IJPSR, v.2, n.11, p.2781-2785.

WANG, A. Z., LANGER, R., & FAROKHZAD, O. C., 2012. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. Annual Review of Medicine, 63(1):185-198.

WANG, T., ZHANG, D., DAI, L., CHEN, Y., & DAI, X., 2016. Effects of Metal Nanoparticles on Methane Production from Waste-Activated Sludge and Microorganism Community Shift in Anaerobic Granular Sludge. Scientific Reports, 6:1-10.

WEI Y., CHEN S., KOWALCZYK B., HUDA S., GRAY T.P., GRZYBOWSKI B.A., 2010. Synthesis of Stable, Low-Dispersity Copper Nanoparticles and Nanorods and Their Antifungal and Catalytic Properties. J. Phys. Chem. C, v.114, p.15612–15616.

WEN, Y., GEITNER, N. K., CHEN, R., DING, F., CHEN, P., ANDORFER, R. E., ... KE, P. C., 2013. Binding of cytoskeletal proteins with silver nanoparticles. RSC Advances, 3(44), 22002.

VIGNESHWARAN, N., ASHTAPUTRE, N.M., VARADARAJAN, P.V., NACHANE, R.P., PARALIKAR, K.M. & BALASUBRAMANYA, R.H., 2007. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus flavus. Material Letters, 61:1413–1418. XU F., PIETT C., FARKAS S., QAZZAZ M., SYED N.I., 2013. Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical NEURONS. MOLECULAR BRAIN, V.6, N.29.

XU, F., REISER, M., YU, X., GUMMULURU, S., WETZLER, L., & REINHARD,
B. M., 2016. Lipid-Mediated Targeting with Membrane-Wrapped Nanoparticles in the Presence of Corona Formation. ACS Nano, 10(1):a-l.

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

ZHANG, X.-F., LIU, Z.-G., SHEN, W., & GURUNATHAN, S., 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, 17(9):1-34.