Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

Liliane Lima Melo

NANOPARTÍCULA DE PRATA: ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA FRENTE À *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA) E ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS RAW 264.7

Recife, 2015

Liliane Lima Melo

NANOPARTÍCULA DE PRATA: ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA FRENTE À *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA) E ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS RAW 264.7

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador:

Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Co-orientador:

Profa. Dra. Carla Cabral dos Santos Accioly Lins

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Melo, Liliane Lima
Nanopartícula de prata: estudo in vitro da atividade antibacteriana frente à Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) e análise da citotoxicidade em células RAW 264.7/ Liliane Lima Melo– Recife: O Autor, 2015.

57 folhas : il., fig., tab.
Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Coorientadora: Profa. Dra. Carla Cabral dos Santos Accioly Lins
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Biologia Aplicada à Saúde, 2015.
Inclui bibliografia

1. **Nanopartícula de prata 2. Toxicidade 3. Atividade antimicrobiana I. Castro, Célia Maria Machado Barbosa de (orientadora) II. Lins, Carla Cabral dos Santos Accioly (coorientadora) III. Título**

520.5 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2015-149

Universidade Federal de Pernambuco

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Liliane Lima Melo

Título: Nanopartícula de prata: estudo *in vitro* da atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e análise da citotoxicidade em células RAW 264.7

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

APROVADA.

Recife, 28 de Janeiro de 2015

Banca Examinadora

Prof.ª Dr.ª Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Departamento de Medicina Tropical - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos Roberto Weber Sobrinho
Departamento de Medicina Tropical - Universidade Federal de Pernambuco

Prof.Dr. Bruno Henrique Andrade Galvão
Faculdade Integrada de Pernambuco - FACIPE

“Um professor sempre afeta a eternidade. Ele nunca saberá onde sua influência termina.”

Henry Books Adams

Agradecimentos

Tenho aqui minha gratidão por todos que participaram desta etapa profissional e da vida. Sem vocês, certamente nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais pelo ponta pé inicial na minha educação, sobretudo a minha mãe, que tomou conta da minha maior preciosidade, minha filha Lara, para que pudesse concluir a dissertação em uma missão quase impossível, com pausas para mamada e choro que só era acalentado pelo meu colo.

A minha irmã e melhor amiga, Laís Lima.

Agradecimento da alma por aquele que nunca desistiu de mim, sempre presente em minha vida, meu amigo do coração, Fabrício Mendes.

Meu eterno agradecimento pelo voto de confiança, a minha orientadora, Profa. Célia Castro.

E imensa gratidão ao Coordenador da Pós-Graduação, Prof. Luiz de Carvalho e todos os Docentes do Programa.

A minha co-orientadora e parceira, Profa. Carla Cabral. E a IC, Andrelle Cavalcanti, meu grande carinho pelas duas.

Minha imensa gratidão por aquele que sempre me apoiou, e nunca mediu esforços para me ver chegar longe, a meu amigo e meu amor, Chico Marinho, a quem não tenho apenas uma aliança no dedo esquerdo, mas uma

aliança de coração para coração, de um amor que precisava existir para ficar muito maior e se transformar em nossa filha Lara.

Agradecimento a Renata Raele, por dividir o mundo das nanopartículas e das células RAW comigo.

A todos da família LIKA, que me proporcionaram momentos inesquecíveis, em especial a Thacianna Costa e Fátima Diniz. E todos os aqueles que também foram importantíssimos nessa jornada: Bruno Galvão Dani Cantarelli, Carlos Weber, André Galvão, Juliana Melo, Natália Morai, Karla Melo. A todos os funcionários do LIKA, Verinha, Edson, Paulina, Conceição, Ilma, Felipe e Helena.

Resumo

Com o surgimento e crescimento de micro-organismos resistentes a múltiplos antibióticos, bem como a ênfase contínua sobre os cuidados e custos na saúde, muitos pesquisadores vem tentando desenvolver novos antibióticos eficazes, livre de resistência e com baixo custo, de amplo espectro de ação e com menor propensão para induzir a resistência microbiana aos antibióticos. A prata é conhecida pela sua eficácia antimicrobiana, mas sua citotoxicidade ainda não foi bem definida. Atualmente soluções de prata desenvolvidas a partir da nanotecnologia possuem partículas minúsculas, que variam de 0,01 a 0,001 micrômetro de diâmetro, que caracteriza uma maior superfície de contato. Portanto, com a intenção de reduzir micro-organismos de interesse médico, será utilizado nesse estudo o *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA), um importante agente causador de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS). O efeito citotóxico na nanopartícula de prata quando usada em células da linhagem RAW foram testados com o objetivo de simular respostas biológicas, portanto, foi realizados testes *in vitro* da taxa de sobrevivência celular, MTT Assay. Foram testadas nove tamanhos de nanopartículas de prata, onde identificamos que a melhor CMI foi da nanopartícula de 20nM, ,as partículas de 65nM, 70nM e 75nM não apresentaram atividade bactericida, as demais apresentaram atividade moderada e boa. No teste de citotoxicidade, verificou-se que apenas as partículas de 65nM, 70nM e 75nM apresentaram a concentração inibitória efetiva, as demais, a IC_{50} foi maior que 50 µg/mL, indicado uma ausência de atividade citotóxica

Palavra-Chave: Nanopartícula de prata, CMI , Toxicidade

Abstract

With the emergence and growth of micro-organisms resistant to multiple antibiotics, as well as the continued emphasis on the care and health costs, many researchers have been trying to develop new effective antibiotics, free of resistance and low cost, broad spectrum of action and with lower propensity to induce microbial resistance to antibiotics. Silver is known for its antimicrobial efficacy, but its cytotoxicity is not well defined. Currently silver solutions developed on nanotechnology have tiny particles, ranging from 0.01 to 0.001 micrometer in diameter, featuring a larger contact surface. Therefore, with the intention of reducing micro-organisms of medical interest, it will be used in this study the Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), a major causative agent of hospital infections. The cytotoxic effects of silver nanoparticles when used in RAW cell line were tested in order to have biological responses; therefore, in vitro tests of cell survival (MTT assay) were done. Nine sizes of silver nanoparticles were tested , where we identify the best CMI was the nanoparticle 20 nM, the particles 65nm, 70nm and 75nM showed no bactericidal activity, the others showed moderate to good activity. In the cytotoxicity assay, it was found that only particles of 65nM, 70nM and 75nM showed effective inhibitory concentration, the others, the IC_{50} was greater than 50 mg / mL, indicating a lack of cytotoxic activity.

Keyword: silver nanoparticle, CMI, toxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

2. REVISÃO DE LITERATURA 15

2.2 MRSA como agente causador de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) 17

2.3 Nanopartícula de Prata 19

2.4 Macrófagos 22

2.5 Citotoxicidade 25

3. OBJETIVOS 27

3.1 Objetivo Geral 27

3.2 Objetivos Específicos 27

4. METODOLOGIA 28

4.1 Desenho do Estudo 28

4.2 Síntese da Nanopartícula de Prata 29

4.3 Cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 31

4.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) 31

4.5 Cultivo da Célula RAW 264.7 34

4.6 Incubação com Nanopartículas 36

4.7 MTT 37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39

5.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) 39

5.2 Teste de Citotoxicidade: MTT 42

6. CONCLUSÃO 43

7. REFERÊNCIAS 44

1. INTRODUÇÃO

Com o surgimento e rápida disseminação de micro-organismos resistentes a múltiplos antibióticos, bem como a ênfase contínua sobre os cuidados e custos na saúde, muitos pesquisadores vêm tentado desenvolver novos antibióticos eficazes, livres de resistência e de baixo custo. Estes problemas e necessidades levam ao ressurgimento do uso de anti-sépticos a base de prata, os quais se caracterizam pelo amplo espectro de ação e menor propensão em induzir resistência antimicrobiana.

A prata é conhecida pela sua eficácia antimicrobiana desde o início do século XVIII. Os sais de prata, principalmente o nitrato de prata já eram usados nesse período para o tratamento de úlceras, entretanto, a utilização da prata só foi aprovada pela US Food and Drug Administration (FDA) na década de 20. Atualmente soluções de prata desenvolvidas a partir da nanotecnologia possuem partículas minúsculas, que variam de 0,01 a 0,001 micrômetro de diâmetro, o que caracteriza uma maior superfície de contato. Assim, destaca-se o uso rotineiro da nanopartícula de prata em curativos, cateteres vasculares e urinários, cirurgias dentárias e em outros dispositivos como máscaras cirúrgicas, sistema de purificação de água, ataduras para queimaduras, dentre outros.

Nesse sentido, com o intuito de buscar alternativas para reduzir os índices de Infecções Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS), bem como minimizar as taxas de resistência antimicrobiana, foi utilizado nesse estudo o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), um importante agente causador de infecção hospitalar. Este micro-organismo se destaca dentro dessa problemática, porque é resistente a maioria dos antimicrobianos disponíveis no comercio, tornando difícil o tratamento e controle de infecções causadas por *S.aureus* resistente meticilina.

Entretanto, deve-se também ter uma atenção ao efeito citotóxico da nanopartícula de prata quando usada em tecidos humanos, a mesmas devem ser testadas com o objetivo de simular respostas biológicas. A International Organization Standardization (ISO) recomenda testes *in vivo* e *in vitro* para estudar a biocompatibilidade e toxicidade. Dentre estes testes, a taxa de sobrevivência celular (Ensaio MTT) é um dos mais utilizados, porque pode refletir na viabilidade celular.

Apesar de não ser recente o uso da prata, muitos aspectos a respeitos da sua interação com sistemas biológicos, como também sua influência sobre o metabolismo celular ainda permanecem sem uma completa compreensão. Os estudos sobre a toxicidade são variados, porém há muito a se entender sobre a

toxicidade no que rege a nanopartícula de prata com efeito antimicrobiano para o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

Dentro deste contexto, focamos o trabalho na análise dos efeitos da nanopartícula de prata sobre cultura de macrófagos imortalizados, a fim de elucidar os efeitos envolvidos na agressão causada por estas nanopartículas de prata sobre o sistema biológico em questão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana é um fenômeno genético relacionado à expressão de genes contidos no micro-organismo, os quais codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. (WITTE W., et al 2001). Da perspectiva epidemiológica, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, micro-organismos resistentes são aqueles resistentes a uma ou mais classes de antibióticos. (AZEVEDO F.M., 2005) e sob o ponto de vista laboratorial, quando bactérias *in vitro* se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas que interferem nas funções de crescimento. (MARTINS M.A., et al, 2001).

Na década de 60 surgiu o primeiro caso de resistência às penicilinas β-lactâmicas, como a meticilinas, e já na década de 70, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) era considerada uma pandemia. (OLIVEIRA A.C., et al 2006 ; ALANIS A.J., et al 2005). A resistência antimicrobiana é considerada um problema de saúde pública mundial, portanto, na tentativa de minimizar essa alteração, tem sido proposta várias alternativas de controle constituindo um grande desafio, ao mesmo tempo em que são adotadas

medidas de auditoria em uso de antimicrobianos, a higienização das mãos, o isolamento dos pacientes e campanhas educativas nem sempre tem trazido a contribuição para o controle da resistência. (HAMBRAEUS A., 2006 ; BECKER K., et al, 2006 ; PASKOVATY A. et al, 2005)

No Brasil, as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são causadas por cerca de 70% de bactérias resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento de pacientes, de acordo com o Ministério da Saúde. Pessoas infectadas com esses micro-organismos apresentam maior tempo internamento de hospitalar, que muitas vezes faz-se necessário o tratamento com fármacos de segunda e terceira geração, que podem ser menos efetivos, mais tóxicos ou mais caros (MARTINS I.S., et al 2007).

Uma forma de disseminação da resistência bacteriana é a introdução de micro-organismos resistentes em uma população susceptível, pelo homem ou através fômites. Assim, bactérias podem chegar aos seres humanos por meio das mãos, roupas dos profissionais de saúde, por instrumentação (ou procedimentos) ou mesmo através do uso de antimicrobianos na agricultura. (ALANIS A.J., 2005)

Quanto ao micro-organismo em questão, o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que não sofre ação da maioria dos antibióticos

betalactamicos, excetuando o ceftobiprole, uma nova cefalosporina de amplo espectro (DAUNER D.G. et al, 2010), e o razupenem, um novo carbapenem (LIVER MORE , D. M. et al, 2009). Dessa forma, habitualmente os fármacos de escolha para o tratamento de infecções causadas por essas bactérias pertencem classe dos glicopeptideos (vancomicina e teicoplanina), que agem impedindo a síntese da parede celular (ROSSI F.; ANDREZZI D.,2006)

2.2 MRSA como agente causador de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS)

O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é bem frequente em ambiente hospitalar e na própria comunidade, assim o uso indiscriminado de antimicrobianos fez com que surgissem cepas com sensibilidade diminuída. Esse tipo de infecção está se tornando cada vez mais comum, sendo responsável por 40% a 70% de todas as infecções estafilocócicas no mundo. (LUCET, J. C. *et al.,* 2003*)*

CUERVAS O., et al*.,*2010, afirmaram que a resistência à meticilina vem aumentando progressivamente, passando de 1,5% em 1986 para 31,2% em 2002. Além disso, os mesmos autores demostraram o aumento de cepas encontradas na comunidade. Mesmo assim, o Centers for Disease Control and

Prevention -CDC, de 2005 à 2011 observou uma queda significativa desse tipo de infecção em ambiente hospitalar.(CDC, 2012)

BOYCE et al. 1997 encontraram uma incidência de 42% de contaminação das luvas usadas por enfermeiros que não tinham contato direto com o paciente, mas que tinham tocado superfícies no quarto de um paciente infectado por MRSA.

O surgimento de cepas de MRSA de origem comunitária é atribuído por diversos autores, pelo uso indiscriminado e empírico de antibióticos, fazendo com que ocorra a pressão seletiva da bactéria. (RIBEIRO A., et al., 2005) Entretanto, a dimensão exata da doença relacionada ao MRSA permanece desconhecida, mas existe consenso entre a maioria dos infectologistas que as infecções por MRSA são um problema importante de saúde pública. (STRUELENS M.J., 2009 ; CIMOLAI N., 2007)

Assim, o controle hospitalar de MRSA endêmico tem se baseado em diversas estratégias complementares: identificação precoce e isolamento de portadores assintomáticos, para evitar sua disseminação; lavagens do corpo com antissépticos; tratamento sistêmico e/ou tópico, bem como um melhor cumprimento da higiene das mãos e de outras medidas de precauções convencionais para reduzir o estado de portador; e medidas de controle dos antimicrobianos para reduzir a pressão seletiva dos antibióticos. Essa

abordagem pode ajudar a minimizar a propagação de MRSA e reduzir as taxas de portadores da bactéria em hospitais onde há endemia. Além disso, o cumprimento dessas medidas deverá ter uma repercussão clínica positiva nos pacientes de alto risco, como aqueles na unidade de terapia intensiva (UTI).(CALFEE D.P., et al, 2008)

Assim, existe uma teoria, que são os íons de prata liberados pelas nanopartículas difundem-se com o fósforo das moléculas do DNA resultando na inativação de sua replicação, ou também pode reagir com proteínas que inibem as funções enzimáticas das bactérias. (GUPTA et AL, 1998; Matsumura et al, 2003). Já (GOGOI S.K., et AL, 2006) verificou que a nanopartícula de prata perfura a superfície da parede celular bacteriana, que mesmo ligada ao DNA bacteriano, não apresenta efeito direto na morte celular.

2.3 Nanopartícula de Prata

Desde o início do século 18 a prata já era conhecida pela sua eficácia antimicrobiana, pois o nitrato de prata era usado nessa época para o tratamento de úlceras (KLASEN, 2000). Entretanto, somente na década de 20 seu uso foi aprovado, por serem menos tóxicos e considerados mais seguros,

mas a utilização da prata foi sendo reduzido devido ao aparecimento dos antibióticos.

A partir de 1940, com o desenvolvimento de outros antibióticos, passaram a preterir a prata, por serem considerados menos tóxicos e mais seguros. (GEMMELL C.G., et AL, 2006). Na década de 60 o uso do sal de prata é retomado devido a crescente resistência dos micro-organismos aos antibióticos, principalmente em tratamento de queimados. (PRINCE W.R.;WOOD M., 1966). Assim, a prata fica sendo considerada como anti-séptico para o tratamento de queimados.

No início do século 20, a prata também passou a ser usada em tamanhos nanoparticulados, que eram desenvolvidas partículas bastante reduzidas, com tamanhos que variavam de 0,01 a 0,001 micrômetro de diâmetro, pois assim aumentavam sua superfície de contato, intensificando a ação antibacteriana da prata. (MAYNARD A.D.,2007)

Quando as dimensões das partículas de prata são maiores, causam obstrução das membranas celulares, acarretando em um envenenamento por prata, isto não acontece se utilizarmos partículas nanométricas, pois elas estão dispersas e com baixa concentração, podendo circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos no organismo humano. (OLIVEIRA E.M.N., 2006)

Existem várias teorias a respeito do mecanismo de ação da nanopartícula de prata com as bactérias. (SONDI I.; SALOPEK-SODI B., 2004; LOK et al., 2006) acredita que as nanopartículas atuam com elementos da membrana celular das bactérias, alterando a estrutura celular, fazendo com que haja a dissipação de prótons e morte celular. Assim, a atividade antimicrobiana está relacionada com as reações que ocorrem com os componentes internos da membrana, relacionando esse efeito ao tamanho da partícula testada, pois teria a capacidade de permear pela membrana.

A forma mais usada para sintetizar a nanopartícula de prata é a partir da corrente elétrica ou por redutores químicos. Entretanto, metodologia de fabricação das nanopartículas não interfere na eficácia antimicrobiana, mas o tamanho e sua dispersão na solução interferem no seu desempenho. Quanto menor a partícula, maior será sua ação antimicrobiana.

A contínua busca por uma partícula mais eficiente tem impulsionado a pesquisa de redutores menos tóxicos e com produção simplificada, como (PANÁCEK, et al) sugeriu a solução de amônia com maltose, lactose, glucose e galactose. Dentre os redutores avaliados, a solução de amônia com maltose gerou as menores partículas, com 25nm de diâmetro, e com partículas bem dispersas.

Compostos estão sendo pesquisados para estabilizar a solução de nanopartícula de prata, que auxilia na não agregação das partículas, a exemplo do ácido ascórbico um agente redutor que estabiliza a solução. (SONDI I.; SALOPEK-SODI B., 2004). Assim, pode-se produzir uma nanopartícula mais eficiente, com maior efeito antibacteriano e menor toxicidade.

A ciência e a inovação tecnológica seguem o mesmo caminho, o que reflete na produção acadêmica e em novas utilizações prática, portanto, novos modelos de biomateriais estão surgindo com a incorporação das nanopartículas nas matrizes. Aos poucos, na área de saúde já podemos ver cateteres vasculares e urinários (PHUNG, 2006), e em outros materiais, como nanopartículas de prata em máscaras cirúrgicas e sistemas de purificação de água (LI.et al ,2006 ; LEE.et al, 2007)

2.4 Macrófagos

Os macrófagos são células de defesa, amplamente distribuídas pelo organismo, que recebem diferentes nomes de acordo com sua localização. Tem-se a micróglia no Sistema Nervoso Central, células de Kuppfer no fígado,

macrófagos alveolares no pulmão, células dendríticas na região subcortical dos linfonodos e células de Langerhans na pele (ABBAS et al, 2012).

Possui um tamanho que varia entre 25-50 µm de diâmetro, apresentam núcleo irregular, possuem um ou mais nucléolos, cromatina pouco condensada, citoesqueleto bem desenvolvido, inúmeras projeções citoplasmáticas, grande número de lisossomos, complexo de Golgi e mitocôndrias (DINARELLO, 1996). É uma das mais importantes tipos de célula do sistema imune inato e podem assumir formas morfológicas diferentes conforme sua localização (HALLIWELL, et al, 1999).

Exercem função de defesa de maneira indireta, por meio de atividades antitumorais e microbicidas, da secreção de citocinas, da apresentação de antígenos, regulando assim o sistema imune (KLIMP et al, 2001) ou de forma direta, identificando, fagocitando e destruindo efetivamente corpos estranhos. O macrófago tem papel central no início da resposta inata e adquirida e a efetividade da resposta contra patógenos depende da sua forma de ativação (AUGER ,et al 1992).

A fagocitose desenvolvida pelos macrófagos compõe o início do conjunto das atividades biológicas de toda a resposta imunológica e da resposta inata, e é constituída pelas etapas: aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão de

células e partículas inertes e produção radicais livres (SPORN et al, 1990; DE LA FUENTE et al, 1991)

Durante a etapa de aderência ao substrato, ocorre a ativação de receptores para moléculas de adesão, como fibronectina, vibronectina e laminina, ocasionando rearranjo do citoesqueleto celular para que ocorra a fagocitose . Com a internalização do patógeno, que pode ser uma nanopartícula, há formação de uma vesícula onde o agente agressor permanece confinado, e esta fica acessível ao endossoma (SWANSON E BAER, 1995).

Desta forma, linhagens macrofágicas são de grande interesse para obtenção de informações sobre a resposta produzida frente à presença de agentes agressores desconhecidos em organismos.

Dentre as linhagens imortalizadas de macrófagos disponíveis, se destaca as RAW 264.7, oriundas de células tumorais peritoneais induzidas por vírus (Abelson Leukemia Virus) em ratos (SILVA R.A.B., 2007). Estas células são aderentes, apresentam alta taxa de fagocitose e de multiplicação. São resistentes e de fácil cultivo. São viáveis para testes de toxicidade, pois apresentam metabolismo que mimetiza macrófagos de culturas primárias, mas não sofrem fase de declínio no seu crescimento, por serem imortalizadas.
(HOLGATE et al, 1996; ADEREM et al, 1999; ZAPOLSKA-DONAR et a, 2000).

2.5 Citotoxicidade

Um aumento significativo do estudo da biocompatibilidade dos materiais é uma realidade para pesquisa das diversas especialidades. O conhecimento direcionado à composição dos materiais, suas propriedades alergênicas e irritantes e sua toxicidade são essenciais para a avaliação das etiologias dos sintomas clínicos. (GRIMSDOTTIR M.R.; HENSTER-PETERSEN A., 1993)

Os testes de citotoxicidade são recomendados para todos os materiais usados na área da saúde. Os modelos de estudo *in vitro* são uma alternativa imprescindível na pesquisa de toxicidade. (BATISTA A.C., et al,2002) Estes testes permitem uma rápida avaliação, produzem dados quantitativos e comparáveis, e devido à sua sensibilidade, permitem que os materiais tóxicos sejam descartados previamente aos experimentos em animais. (COSTA C.A.S.; SOUZA P.P.C.,2005)

A citotoxicidade é um mecanismo complexo, o qual pode resultar em um amplo espectro de efeitos, desde a morte celular até alterações metabólicas, onde ocorrem mudanças funcionais ou de alguma via específica. (BAEK H.S., et al., 2005). Testar a citotoxicidade é a primeira etapa para assegurar a

biocompatibilidade de algum material, assim o resultado negativo indicará que o material está livre de produtos prejudiciais ou que a quantidade é insuficiente para causar efeitos agudos em células do corpo. (TSUCHIYA T., et al, 1994)

Contudo, apesar da importância do teste, não se pode afirmar que o material é biocompatível, uma vez que o teste de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para a análise do material. (WATAHA J.C., 2001) Por outro lado, um teste de toxicidade positivo pode ser um sinal que o material contém uma ou mais substâncias que comprometam um metabolismo celular.(SCHMALZ G., 2002)

A avaliação do metabolismo celular pelo MTT *assay*, pode ser um teste relativamente simples de ser realizado, apesar de ser criterioso. O teste é um dos mais utilizados para se determinar a citotoxicidade sobre células em cultura. (COSTA C.A.S.; SOUZA P.P.C.,2005)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antibacteriana da nanopartícula de prata sobre o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e avaliar a citotoxicidade em linhagens de macrófagos RAW 264.7.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CMI) da nanopartícula de prata frente às cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) ATCC 6057, pelo teste microplaca;

- Determinar através da citotoxicidade *in vitro*, a viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7, frente às nanopartículas de prata através do ensaio do MTT, através da $IC_{50.}$

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo

O estudo foi realizado no setor de microbiologia clínica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Determinou-se a concentração inibitória mínima (CMI), segundo normas descritas pelo National Commitee for Clinical Laboratory Standards, em nove tamanhos de nanopartículas de prata.

Com a concentração das nanopartículas de prata definidas, o estudo utilizou células da Linhagem de macrófagos RAW 264.7 como modelo celular para avaliar *in vitro*, o efeito causado pela administração de várias concentrações e tamanhos de nanopartículas de prata por um período de 24 horas de incubação de acordo com o teste utilizado. As células foram divididas nos seguintes sistemas:

Sistema 1: Nanopartícula de 20nm

Sistema 2: Nanopartícula de 30nm

Sistema 3: Nanopartícula de 40nm

Sistema 4: Nanopartícula de 50nm

Sistema 5: Nanopartícula de 55nm

Sistema 6: Nanopartícula de 60nm

Sistema 7: Nanopartícula de 65nm

Sistema 8: Nanopartícula de 70nm

Sistema 9: Nanopartícula de 75nm

Após os períodos de incubação com as nanopartículas de prata, as células foram testadas para avaliar a viabilidade celular por atividade enzimática mitocondrial (MTT *Assay*)

Nos ensaios MTT foram testadas 9 (nove) concentrações diferentes de prata nanoparticulada, sendo no mínimo um N = 6 de amostras experimentais das diferentes concentrações, além de 6 controles negativos e 6 controles positivos confeccionados utilizando Lipopolissacarídio de *Escherichia coli* (LPS) como agente ativador de macrófago.

4.2 Síntese da Nanopartícula de Prata

A solução de Nanopartícula de Prata foi preparada a partir de diferentes cargas elétricas emitidas em placas de prata imersa em água destilada. A solução nanoparticulada foi produzida pela Khemia (Centro de Inovação Empreendedorismo e Tecnologia (CIETEC/USP), na concentração de 100 partes por milhão (ppm) e sua concentração foi aferida

pela diferença de potencial condutivo entre o veículo base e o produto final obtido pela eletroforese.

Fig.01: Nanopartícula de Prata (Khemia – CIETEC-USP)

A fim de evitar uma possível contaminação, as nanopartículas foram purificadas utilizando o filtro *Pierce Protein Concentrator* de 20K MWCO, da Thermo Scientific. O filtro possui uma membrana de celulose aderida em um suporte acoplado a um tubo tipo Falcon (15 mL), que durante a centrifugação retém as moléculas de peso superior a 20.000 Daltons, concentrando a amostra e eliminando resíduos.

4.3 Cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Foram obtidas cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (American Type Culture Collection – ATCC 6057), obtidas do Newprov Produtos para Laboratório (Pará,Brasil). Essas cepas foram mantidas em caldo Tryptic Soy Broth (TSB), adicionado de 20% de glicerol a uma temperatura de - 20°C até sua utilização.

4.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Nos ensaios para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), o caldo Müller-Hinton foi utilizado para padronização dos inóculos e o meio sólido de Müller-Hinton para manutenção do micro-organismo. Estes meios foram preparados segundo as instruções dos fabricantes e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121ºC.

A suspensão bacteriana foi produzida com as culturas em água destilada e a diluição era ajustada segundo o tubo padrão 0,5 da escala de MacFarland, o que equivale a 10^8 UFC/mL.

As nanopartículas foram solubilizadas em um sistema composto por DMSO (dimetil sulfóxido 10%)/Tween80/água destilada aquecida(1:1:8), a fim de obter soluções padronizadas de concentração igual a 1000 µg/mL. Em seguinda foram esterilizados por filtração em filtro de membrana microbiológico de 0,45 µm de diâmetro.

Foi utilizado o método de microdiluição, que determina o perfil de suscetibilidade do micro-organismo à nanopartícula de prata, é também um método quantitativo, sendo possível determinar a CIM. O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”. Um volume de 200 µL da nanopartícula foram depositados nas colunas de 1 a 10 da linha A. Os demais orifícios foram preenchidos com 100 µL de caldo Mueller-Hinton . Em seguida, uma diluição da solução de nanopartícula foi feita transferindo uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, e assim sucessivamente, até a linha H, e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se assim concentrações decrescentes da solução de nanopartícula (1000 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 15,625 mg/mL e 7,81 mg/mL). Um volume de 5 µL de cada inóculo microbianos padronizados na concentração de 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL) foi depositado em uma

coluna diferente. Os orifícios da coluna 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. A coluna 11 serviu como controle negativo da atividade inibitória dos diluentes (DMSO/tween 80). Os orifícios da coluna 12 receberam apenas o caldo Mueller-Hinton e o inoculo microbiano, possibilitando o controle positivo da viabilidade microbiana. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas.

A revelação do crescimento bacteriano ou da inibição foi realizada pela adição de uma solução aquosa de cloridrato de 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) a 0,5%. As enzimas oxidativas presentes nas membranas celulares dos micro-organismos vivos reagem com o TTC oxidando-o, provocando a mudança de coloração de incolor (forma reduzida) para vermelho de formazan (forma oxidada).

As microplacas foram novamente incubadas por mais três horas a 35°C. Após esse intervalo de tempo, a leitura da placa foi realizada. Quando a coloração nos orifícios ficou vermelha, foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório da nanopartícula, ou seja, houve crescimento do MRSA, quando foi visualizada a ausência de cor, foi considerada prova positiva da ação antimicrobiana da prata particulada, ou seja, concentração mínima inibitória (CMI) foi considerada a menor concentração da amostra que impede

visivelmente o crescimento microbiano, o aparecimento da coloração vermelha. (BARBOSA M.A., 2010)

4.5 Cultivo da Célula RAW 264.7

A linhagem celular imortalizada, RAW 264.7 foi escolhida para fazer o teste de citotoxicidade. A célula pertence a uma linhagem macrofágica aderente e imortalizada por vírus (SOUSA M.T , 2008) que preserva todas as características de uma célula fagocítica do sistema mononuclear. As células RAW 264.7 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro - UFRJ e foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm^2 , com filtro , em atmosfera de CO_2 a 5% e a 37 ºC durante todo o período do experimento.

Na manutenção das células, utilizou-se o meio de cultura Dulbecco Medium Eagle Modified (DMEM) (Invitrogen), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen), mais 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina/estreptomicina, Invitrogen), de acordo com instruções do Banco de Células do Rio de Janeiro, trocado a cada três dias. É importante a troca do meio de cultura, pois oferece novos nutrientes e um pH ideal para que as células permaneçam viáveis.

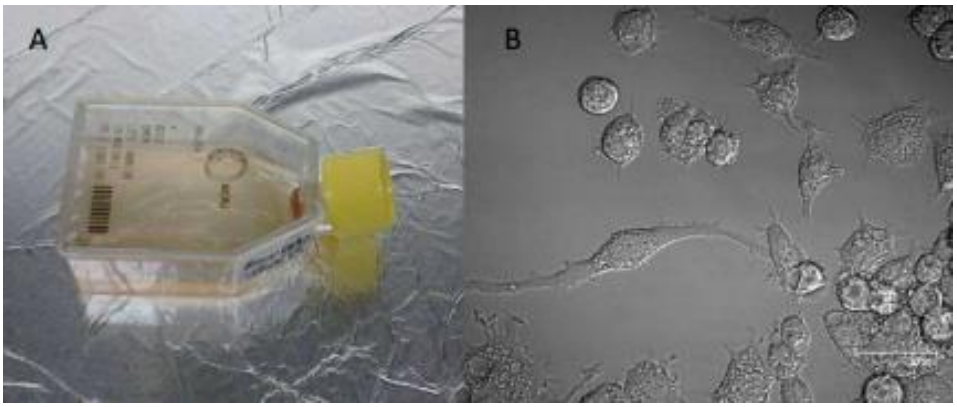

Fig 02: A, células RAW 264.7 oriunda do Banco de Células do Rio de Janeiro; B, imagem do banco de células (microscopia óptica)

A cada semana as células foram tripsinizadas para a manutenção da confluência celular. Durante a descolagem das células, todo o meio de cultura é removido e as células são lavadas com PBS, 1x e pH 7.4, com a finalidade de remover todos os vestígios de soro fetal bovino, que são agente inativante da tripsina. Adiciona-se de 5 mL de Tripsina + EDTA 0,05% (Invitrogen) por garrafa, que posteriormente são encaminhadas para a estufa, onde ficam em incubação por 8 a 10 min, em temperatura ideal para ação da enzima (37 ºC).

Após o período na estufa, as células são descoladas sob intensa agitação e homogeneização, e transferidas para tubo de centrifugação, tipo Falcon, contendo 5 mL de meio DMEM . Os tubos são centrifugados a 24 ºC, 1200 rpm, por 10 minutos para formação de pellet de células. O sobrenadante é descartado e o pellet é ressuspendido em 1 mL de meio DMEM. Uma

alíquota de 10 µL é retirada e homogeneizada em 90 µL de Azul de Tripan, para avaliação e contagem. A concentração de células é ajustada para 106 células/mL de meio, distribuídas em placas de 06 poços e mantidas para condução dos experimentos.

4.6 Incubação com Nanopartículas

No teste MTT, 10^6cels/mL foram distribuídas em placas de 06 poços e encubadas por 2 horas em estufa para adesão das células e estabilização de seu metabolismo. Após este período, todo o sobrenadante foi descartado e prosseguiu-se a lavagem com PBS 1x e então foi adicionado novo meio de cultura: suplementado apenas com 10% SFB e antibiótico. Foram então adicionadas 5 alíquotas em diferentes volumes de cada tamanho de nanopartícula de prata a fim de se obter em cada poço as concentrações finais desejadas.

Após a adição das nanopartículas , as placas foram mantidas em estufa, por um período de 24 horas, ao término deste período, foi realizado o teste. Os poços com controles negativos e positivos foram testados concomitantemente com as amostras experimentais e ambos não receberam o tratamento com as nanopartículas. O controle negativo era composto por amostras de células que

não receberam nenhum tipo de estímulo, apenas meio de cultura, e por isso suas medidas foram utilizadas com padrão de viabilidade 100%.

Fig 03: Garrafas e placas de cultura das células RAW 264.7 em estufa de CO_2

4.7 MTT

A solução de MTT foi preparada dissolvendo-se 5 mg de MTT comercial (Sigma-Aldrich) em 1 mL de PBS 1x, pH 7,4. Após as 24 horas de incubação das células com as nanopartículas nas diferentes concentrações (20nM, 30nM, 40nM, 50nM, 55nM, 60nM, 65nM, 70nM, 75nM), o sobrenadante foi aliquotado e as células foram lavadas com PBS, e então foram adicionados 550 µL de PBS e 55 µL da solução de MTT. As placas retornaram à estufa onde ficaram mantidas por mais 2 horas. A partir deste ponto foi preciso proteger as

amostras da luz, pois os cristais de formazan são fotossensíveis e degradam-se na presença de luminosidade.

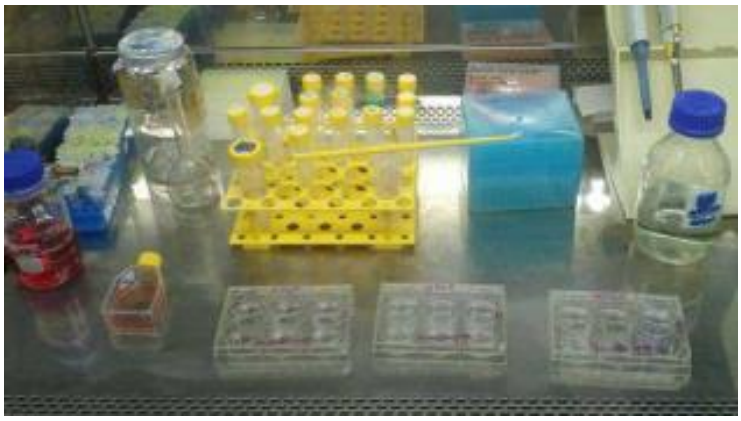

Fig4: Manipulação das células na estufa de co_2

Foram adicionados 400 µL de DMSO em cada poço e com o auxílio de um screaper, raspa-se a monocamada celular aderida ao fundo da placa e o sobrenadante é armazenado para a leitura, ao abrigo da luz. Cada alíquota é lida em espectrofotômetro (Evolution 600 da Thermo Scientific) sempre utilizando a água ultra-pura como referência, em comprimento de onda de 570 nm. Quanto maior a absorbância, mais células viáveis presentes na amostra. Os resultados são expressos em percentuais de viabilidade celular em relação à média do grupo controle, que é estabelecida como 100% de viabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Segundo (TAKANA et al.,2005 e HOLETZ et al.,2002) a atividade antimicrobiana pode ser classificada de acordo com a CMI em: Inativa (CMI > 1000 µg/mL); atividade fraca (500 < CMI < 1000µg/mL); atividade moderada (100 < CMI < 500 µg/mL) e ativa boa (CMI < 100 µg/mL). Portanto, a CMI dos diferentes tamanhos de nanopartículas é analisada segundo o trabalho acima.

As nanopartícula de prata com tamanho de 70, 75 e 65 nm não apresentaram atividade inibitória, verificando a presença do vermelho de formazan , quando enzimas oxidativas que estão presentes nas membranas celulares do MRSA reagem com o revelador (TTC).

Nanopartícula de prata de 50 e 55 nm apresentaram atividades semelhantes frente à bactéria Gram-positiva *Staphylococcus. aureus* resistente à meticilina, ambas com CIM de 250 µg/mL (atividade moderada). Nanoparticulas, com 60nM apresentou uma concentração inibitória de 500 µg/mL,ou seja, uma atividade fraca, o que discorda com (PALAVECICINO E., 2007), onde houve inibição microbiana moderada.

A prata particulada frente ao MRSA, com tamanhos de 40 e 30 nm , apresentaram a CMI de 145 µg/mL(atividade moderada). e 62,5 µg/mL (boa atividade), respectivamente. A Nanopartícula de 20nm também apresentou boa atividade (15,62 µg/mL), reafirmando o trabalho de (BRAYDICH-STOLLE, et al.,2005)

BURD A.,et al, 2007 ,verificou nos testes antimicrobianos que a partícula de 10nm teve um maior efeito bactericida em relação a de 15nm, justificando que a partícula menor apresenta um aumento na sua atividade antibacteriana.

Comparando diferentes dados relatados na literatura, é possível perceber incoerências nos resultados. (PALAVECICINO E., 2007) testou a nanopartícula de 20nm, e verificou que a CMI era de 10 µg/mL, o que é um equivoco, pois verificou-se neste trabalho uma excelente atividade bactericida de 15,62 µg/mL, e VELAZQUEZ-MEZA ME.,2005 já afirmava a excelente atividade de nanopartículas de prata com tamanho entre 10 nm- 20nm.

NanoAg	CMI(µg/mL)
20 nm	15,62
30 nm	62,5
40 nm	145
50 nm	250
55 nm	250
60 nm	500
65 nm	ND
70 nM	ND

75 nM	ND

Tabela1: Valores da Concentração Inibitória Mínima(CMI) *ND : Não Determinado

5.2 Teste de Citotoxicidade: MTT

O teste do MTT mostrou a percentagem de células viáveis após 24 horas de exposição a cada concentração ativa de nanopartícula de prata (todos os tamanhos de nanopartículas foram testados).

Através do teste de citotoxicidade determinou-se a IC_{50} que determina a concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle. Foi realizada através do gráfico Dose-resposta, usando a curva sigmóide. Todos os dados foram processados pelo Excel, produzido pela Microsoft, pelo Bioestat 5.0.

A IC_{50} maior que 50 µg/mL, indica uma ausência de atividade citotóxica. Para as nanopartículas de 65nm , 70nm e 75nm, IC_{50} de 1,7 µg/mL; 2,2 µg/mL; 2,7 µg/mL, respectivamente, conforme a tabela abaixo.

Em SONG,UK. 2006 , foi testado a citotoxicidade em partícula que variavam de 40nm – 60nm, e em todas a IC_{50} foi >50. No trabalho de (SOUSA L.M., et al, 2013), a IC_{50} foi de 2,3 µg/mL, na partícula de 65nm, próximo a atividade da nanopartícula de prata de 70nm testada no nosso trabalho, que foi de 2,2 µg/mL.

Poucos testes de toxicidade foram realizados nos tamanhos das nanopartículas de prata testada neste trabalho, apenas em partículas maiores que 67nm, que já pode indicar uma certa atividade citotóxica, como em SENJEN R, ILLUMINATO I. 2009 e MURDOCK RC., et al,2008.

	IC_{50} (µg/mL)								
LINHAGEM CELULAR	**20nm**	**30nm**	**40nm**	**50nm**	**55nm**	**60nm**	**65nm**	**70nm**	**75nm**
RAW 264.7	**>50**	**>50**	**>50**	**>50**	**>50**	**>50**	**1,7**	**2,2**	**2,7**

Tabela 2: Citotoxicidade das nanopartículas de prata

6. CONCLUSÃO

Dentre as partículas testadas, nanopartícula de prata de 20 nM com CMI de 15,62 µg/mL, foi a mais eficaz, uma vez que também não afetou a viabilidade das células RAW 264.7. Entretanto, existe também partículas que não respondem a atividade antibacteriana a MRSA, como observada no trabalho com as partículas de 65nm, 70nm e 75nm, havendo até uma certa resposta celular.

Assim o que se observa é que quanto menor a nanopartícula for, maior a atividade bactericida e menor o efeito citotóxico. Portanto, é viável o uso das nanopartículas na área da saúde, podendo, inclusive, contribuir com a diminuição das infecções hospitalares e até comunitária por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

Entretanto o que deve existir é uma maior intensificação de outros teste de citotoxicidade, pois ainda é observado uma discordância entre a atividade bacteriana e atividade citotóxica , quando são testadas as nanopartículas de diversos tamanhos. E uma preocupação que existe é que já existe no mercado alguns materiais com nanopartículas, sobretudo na área de saúde, e não sabemos o real risco a longo prazo.

7. REFERÊNCIAS

1. Martins MA, Azevedo FM, Rocha LCM, Rosário PWS. Drogas antibacterianas: antibióticos. In: Martins MA. Manual de infecção hospitalar: epidemiologia, prevenção e controle. 2ª ed. Belo Horizonte: Medsi; 2001. p. 451-72.

2. Azevedo FM. Microrganismos multirresistentes. In: Oliveira AC. Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 341-47.

3. Oliveira AC, Evangelista S, Lucas TC, Mourão PHO, Clemente WT. A percepção da equipe multiprofissional sobre a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar. Online Braz J Nurs [Internet]. 2006 [cited 2007 apr 30];5(2)

4. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era Arch Med Res. 2005;36(6):697–705.

5. Hambraeus A. Lowbury lecture 2005: infection control from a global perspective. J Hospi Infect. 2006;64(3):217-223.

6. Paskovaty A, Pflomm JM, Myke N, Seo SK. A multidisciplinary approach to antimicrobial stewardship: evolution into de 21st century. Int J Antimicrob Agents.2005;25(1):1-10.

7. Martins IS, Nogueira IA, Conceição M, Brasil P. Recomendações para o uso adequado de antimicrobianos. Rio de Janeiro: Secretária de Estado de Saúde; 1998 [cited 2007 apr 30]. Avaiable from: http://www.saude.rj.gov.br/Docs/cecih/Antimicrobianos.doc.

8. Struelens MJ. Guidelines and indicators for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in hospitals: toward international agreement? Curr Opin Infect Dis. 2009; 22(4):337-8.

9. Cimolai N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* public concern, and legislative mandates. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007; 28(7):896.

10. Becke K, Hu Y, Biller – Andorno N. Infectious diseases: a global chalenge. Int J Med Microbiol. 2006;296(4/5):179-85.

11. RIBEIRO , A. *et al*. First report of infection with communityacquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 4, p. 1985-8,2005

12. LUCET, J. C. *et al*. Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit: results of a multicenter study. *Arch Intern Med*, v. 163, n. 2,p. 181-8, 2003.

13. CUEVAS, O. *et al*. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five Nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 48, n. 11, p. 4240-5, 2004.

14. Opal SM, Mayer KH, Stenberg MJ *et al*. Frequent acquisition of multiple strains of methicillin-resistant*Staphylococcus aureus* by

healthcare workers in an endemic hospital environment. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009; 11(9):479-85.

15. Zachary KC, Bayne PS, Morrison VJ *et al*. Contamination of gowns, gloves, and stethoscopes with vancomycin-resistant *enterococci*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2001; 22(9):560-4.

16. DAUNER , D. G.; RO BER T, N. E.; TAKE TA, D. C. Ceftobiprole: a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Health Syst Pharm*, v. 67, n 12. p. 983-93, 2010

17. LIVER MORE , D. M.; MUSHTAQ, S.; WARNER , M. Activity of the anti-MRSA carbapenem razupenem (PTZ601) against *Enterobacteriaceae* with defined resistant mechanisms. *J Antimicrob Chemother*, v. 64, n. 2, p. 330-5, 2009.

18. ROSSI, F.; ANDREZZ I, D. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. São Paulo: Atheneu, 2006.

19. Calfee DP, Salgado CD, Classen D *et al*. Strategies to prevent transmission of methicillin-resistant*Staphylococcus aureus* in acute care hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 29(Suppl 1):S62-80.

20. Boyce JM, Potter-Bynoe G, Chenevert C, King T. Environmental contamination due to methicillin-resistant*Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997; 18(9):622-7.

21. Gupta A, Maynes M, Silver S. Effects of on plasmid-mediated silver reistence in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(12):5042-5

22. Gogoi S.K., Gopinath P.,Paul A., Ghosh S.S., Chattopadhyyay A. Green Fluorescent Protein-Expressing *Escherichia coli* as model system for investigating the antimicrobial activitis of silver nanoparticles. Langmuir. 2006; 22:9322-8

23. Gemmell C.G., Edwards D.I, Fraise A.P. et al. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistent *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. J Antimicrob Chemother. 2006; 57:589-608.

24. Matsumura Y,Yoshikata K.,Kunisaki S.,Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and is comparison with that of silver nitrate. Appl Environ Microbiol.2003;69(7): 4278-81

25. Klasen H.J. Historical review of the use of silver in the treatment of burns.I. Early uses. Burns. 2000; 26: 117-30

26. Prince W.R>, Wood M. Silver nitrate burn dressing. Treatment of seventy burned persons. Am J Surg. 1966; 112: 674-80.

27. Panácek A., Kvitek L, Prucek R, Kolár M, Vecerová R, Pizúrová N., Sharma V., Nevecná T., Zhoril R. Silver collid Nanoparticles: Synthesis, characterization, and the Antibacterial Acttivity. J Phys Chem B. 2006; 110(33): 16248-56

28. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticle as antimicrobial agente: a case study on *E. coli* as a modes for Gram-negative bactéria. J Colloid Interface Sci. 2004;275:177-82.

29. Lok C.N., Ho C-M. Chen R. He Q-Y, Yu W-Y, Sun H,etal. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. J Proteome Res. 2006; 5:916-24

30. Oliveira EMN. Trabalho de conclusão de curso. Departamento de Quimica. UFSC

31. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. Células e tecidos do Sistema Imunológico. In: Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. Immunologia Celular e Molecular. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.26-28, 20125.

32. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals reactive species and toxicology. Free radicals in biology and medicine, New York: Oxford University Press, p.544-616, 1999.

33. Auger, M.J., Ross, J.A. The biology of the macrophages. In: The natural immune system: the macrophage. Eds. C.E. Lewis & J.O.D. McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, p.1-57, 1992.

34. Dinarello, C. A. Biological basis for interleukin-1 in disease. Blood. v.87, p. 2065-2147, 1996.

35. Sporn, S.A.; Eierman, D.F.; Johnson, C.E.; Morris, J.; Martin, G.; Ladner, M.; Haskill, S. Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. J Immunol; 1990; 144,: 4434-4441.

36. De La Fuente M., Del Rio M., Ferrandez M.D., Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrinreleasing peptide and neuromedin C. Immunol 1991; 73:205-211. 57.

37. Holgate, S.T., Church, M.K. Allergy. Trad Oliveira Ng. Manole, São Paulo, p 7.1- 7.7; 1996. 58.

38. Aderem, A., Underhill, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu. Rev. Immunol, v. 17, p. 593-623, 1999. and colocalize with experimental gliomas. Neurosurgery. 2007 Mar;60(3):524-9; discussion 529-30. 59.

39. Zapolska-Donar, D. et al. Ibuprofen in hibits adhesiveness of monocytes to endothelium and reduces cellular oxidative stress in smokers and no-smokers. Eur J Clin Invest.,v. 30, p. 1002-1010, 2000.

40. Bauerle, P.A.; Rupec, R.A.; Pahl, H.L. Reactive oxyen intermediates as second messengers of a general pathogen response. Pathol Biol., v. 44, n. 1, p. 29-35, 1996. 63.

41. Pithon-Curi, T.C. et al. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. Clin Sci., v.103, n.4, p.403-8, 2002. SPRINGALL, D.R.; Nitric oxide - Friend and foe. editorial. Journal Pathology, v.175, p.165-166, 1995.

42. Swanson, J.A., Baer, S.C., Phagocytosis by zippers and triggers. Trends in cell biology, v.5, p. 89-93, 1995.

43. Barbosa M.A. Avaliação da Atividade Antimicrobiana "*in vitro*" da *Punica granatum* Linn. Frente à *Enterococcus faecalis* Isolados clinicamente, 2010.

44. Lee Hy, Park HK, Lee YM,Park SB. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. Chem Commun, 2007;28:2959-61.

45. Li Y,Leung P, Yao L, Song QW, Newton E. Antimicrobial effect of surgical masks coated of antibacterial action of silver nanoparticles. J Hosp Infec. 2006;62:58-63.

46. Maynard AD. Nanothechnology: the next big thing, or much ado about nithing? Ann Occuo Hyg. 2007;51(1): 1-12

47. WITTE, W.; BRAULKE, C.; CUNY, C.; HEUCK, D.; KRESKEN, M. Changing pattern of antibiotic resistance in methicilin-resistant

Staphylococcus aureus from German hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*, Chicago, v. 22, n. 11, p. 683-686, 2001.

48. Centers for Disease Control and Prevention(CDC). 2012. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, Methicillin - Resistant Staphylococcus aureus, 2012.

49. Grimsdottir MR,Henster-Petersen A. Cytotoxity and antibactetrial effects of orthodontic appliances. Scand J Dent Res 1993; 101 (4): 229-31

50. Craig RG. Restorative dental materials. 9 ed. St. Louis: Mosby Yeas Book, 1993. 141-7

51. Costa CAS, Souza PPC. Testes de citotoxicidade em culturas de células. In: Estrela C. Metodologia cientifica. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005.p213-30

52. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practioners. J Prosthet Dent 2001; 86(2):203-9

53. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. Oral Dis 2002; 8(5): 254-60

54. Tsuchiya T, Ikarashi Y,Arai T, Ohashi J, Nakamura A. Improved sensitivity and decresead sample size in cutotoxicity test for biomaterials: a modified colony microassay using a microplate and crystal violet staining. J Appl Biomater 1994; 5(4): 361-7

55. Schmalz G. Materials science: biological aspects. J Dent Res 2002; 81(10):660-3

56. Rogero SO,Lugão AB, \ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Mat Res 2003; 6(3) 317-9

57. Matejka M, Partyka J, Ulm C P, Sinzinger H,Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. J Periodontol 1998;33(8):517-8

58. Baek HS, Yoo JA, Rah DK, Han DW, Lee DH, Kwon OH, Park JC. Evaluation of the Eextraction method for cytotoxicity testing of latex gloves. Yonsei Med J 2005; 46(4):579-83.

59. Feder LS,Laskin DL. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF and IL-1b following acute endotoximia. Journal of Leukocite Biology.Vol.55, n4, p 57-13, 1994.

60. Tanaka, J. C. A.; Da Silva, C. C.; Dias Filho, B. P.; Nakamura, C. V.; de Carvalho, J. E.; Foglio, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (*Tiliaceae*). *Quím Nova*: São Paulo, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

61. Song,UK, Muller J.M. Fabiann F.T.. Fabrication of silver nanoparticles and their antimibrobial mechanisms. Eur Cell Mater, 2006.

62. SOUSA L.M., Sriram K, Wolfarth M, Jefferson A. A biocompatible medium for nanoparticle dispersion. Nanotoxicology 2:144–154. 2013

63. SONG U.K. Fabrication of silver nanoparticles and their antimibrobial mechanisms. Eur Cell Mater. 46:2668–2670.2006.

64. Senjen R, Illuminato I. 2009. Nano and Biocidal Silver: Extreme Germ Killers Present a Growing Threat to Public Health. Friends of the Earth, Washington, DC, USA

65. Murdock RC, Braydich-Stolle L, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic lights cattering technique.ToxicolSci101:239–253.

66. Sousa M.T. A potencial role of macrophage activation in the treatment of cancer. Critical Reviews in Oncology-Hematology,in press,2008.