

**AVALIAÇÃO DO USO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA
FOTOINATIVAÇÃO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

**EVALUATION OF THE USE OF GOLD NANOPARTICLES FOR
PHOTOINACTIVATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

**EVALUACIÓN DEL USO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO PARA LA
FOTOINACTIVACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**



10.56238/MedCientifica-045

Hygor Chaves da Silva

Mestre em Ciências dos Materiais

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

E-mail: hygorchavesdasilva@gmail.com

RESUMO

O surgimento de bactérias multirresistentes a medicamentos tornou-se uma grave ameaça à saúde pública. Consequentemente, a proposição de novas estratégias para combate de microrganismos multirresistentes é atualmente de extrema relevância para a saúde pública global. Nesse cenário, este trabalho teve por objetivo determinar o potencial de AuNPs (nos diâmetros mais recorrentes de 15 e 75 nm) à diferentes concentrações como agente antimicrobiano e fotoantimicrobiano sob ação de luz verde (550 nm) para fotoinativação de bactérias Gram-positiva (*S. aureus*). O plaqueamento foi realizado somente para a *S. aureus* e feita a determinação do número de unidade formadoras de colônia (UFC). Os resultados mostram que apenas exposição das bactérias a luz não reduz o número de UFC. Por sua vez, o emprego de AuNPs contribui para a diminuição do crescimento microbiano, bem como a inibição aumenta na presença de luz. Todavia, não houve redução expressiva na quantidade de UFCs, o tratamento mais eficaz apresentou 62,64% de redução em relação ao grupo não tratado-escuro. O tratamento mais eficaz empregou AuNPs nos diâmetros de 15 nm à 25 ppm.

Palavras-chave: Ressonância de Plasma. Ensaio de MTT. Inativação Bacteriana.

ABSTRACT

The emergence of multidrug-resistant bacteria has become a serious threat to public health. Consequently, the proposition of new strategies to combat multidrug-resistant microorganisms is currently of extreme relevance to global public health. In this scenario, this work aimed to determine the potential of AuNPs (in the most recurrent diameters of 15 and 75 nm) at different concentrations as an antimicrobial and photoantimicrobial agent under the action of green light (550 nm) for the photoinactivation of Gram-positive bacteria (*S. aureus*). Plating was performed only for *S. aureus*, and the number of colony-forming units (CFU) was determined. The results show that exposure of the bacteria to light alone does not reduce the number of CFU. In turn, the use of AuNPs contributes to the decrease in microbial growth, and inhibition increases in the presence of light. However, there was no significant reduction in the number of CFUs; the most effective treatment showed a 62.64% reduction compared to the untreated-dark group. The most effective treatment employed AuNPs with diameters of 15 nm at 25 ppm.

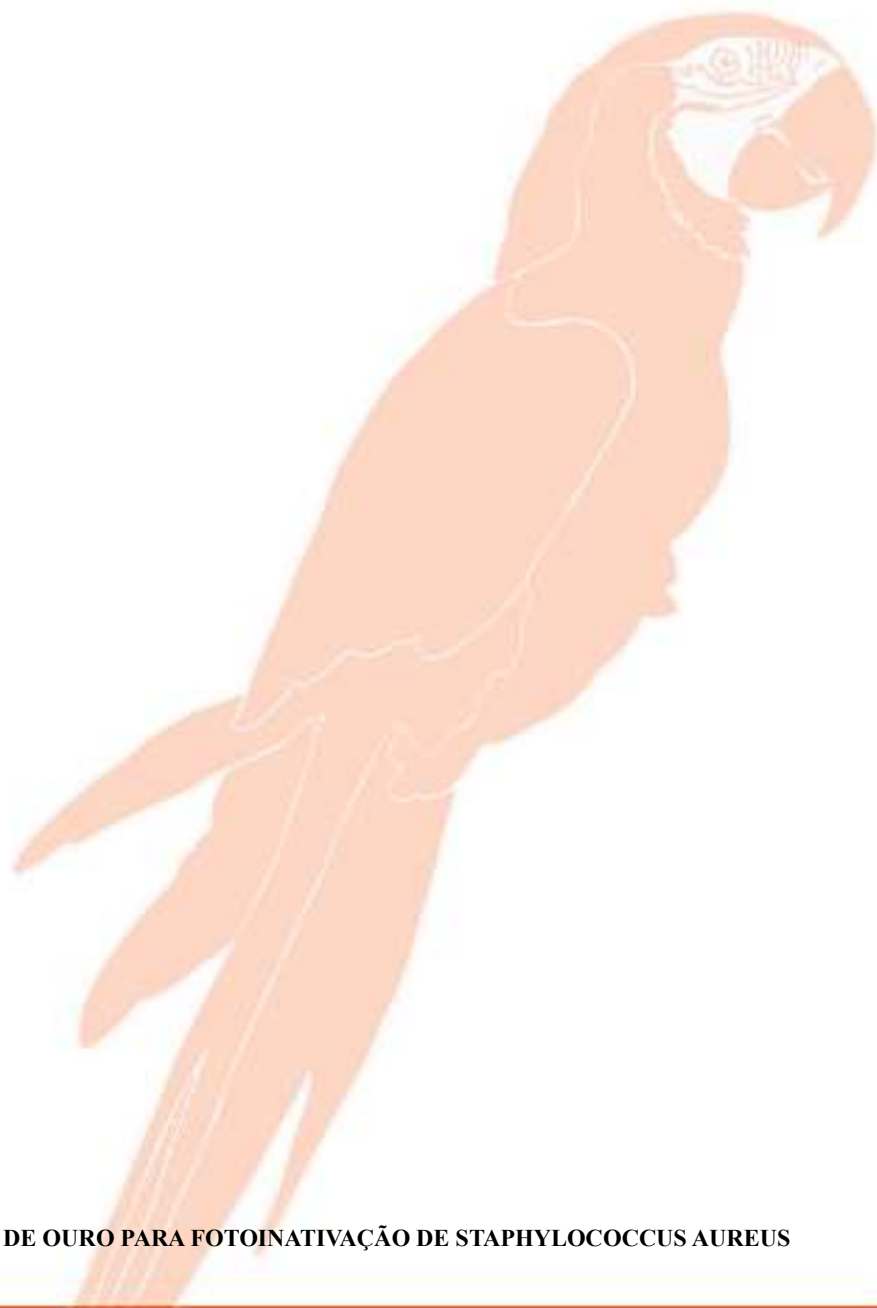


Keywords: Plasma Resonance. MTT Assay. Bacterial Inactivation.

RESUMEN

La aparición de bacterias multirresistentes se ha convertido en una grave amenaza para la salud pública. Por consiguiente, la propuesta de nuevas estrategias para combatir estos microorganismos multirresistentes reviste actualmente una importancia crucial para la salud pública mundial. En este contexto, este trabajo tuvo como objetivo determinar el potencial de las nanopartículas de oro (AuNPs) (con los diámetros más frecuentes de 15 y 75 nm) a diferentes concentraciones como agente antimicrobiano y fotoantimicrobiano bajo la acción de luz verde (550 nm) para la fotoinactivación de bacterias Gram positivas (*S. aureus*). El cultivo se realizó únicamente para *S. aureus* y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados muestran que la exposición de las bacterias a la luz por sí sola no reduce el número de UFC. En cambio, el uso de AuNPs contribuye a la disminución del crecimiento microbiano, y la inhibición aumenta en presencia de luz. Sin embargo, no se observó una reducción significativa en el número de UFC; el tratamiento más efectivo mostró una reducción del 62,64 % en comparación con el grupo control (sin tratamiento) en oscuridad. El tratamiento más eficaz empleó nanopartículas de oro (AuNPs) de 15 nm de diámetro a 25 ppm.

Palabras clave: Resonancia de Plasma. Ensayo MTT. Inactivación Bacteriana.





1 INTRODUÇÃO

A resistência contra antibióticos se tornou um dos grandes problemas globais [1]. A utilização de forma inadequada e indiscriminada de antibióticos possibilitou que as bactérias desenvolvessem resistência a diversos antibióticos, resultando em bactérias multirresistentes [2,3]. Estima-se que os pacientes com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina tenham (64%) mais chances de morrer do que aqueles infectados pela variedade não resistente [4]. Oitenta mil infecções causadas por *S. aureus* resistente à meticilina foram registradas nos Estados Unidos, resultando em mais de 11.000 mortes só em 2011 [5]. A amplitude do problema envolvendo bactérias multirresistentes é tão grande que cerca de meio milhão de pessoas desenvolveram tuberculose multirresistente em todo o mundo em 2016. Em 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS) identificou 32 antibióticos em desenvolvimento clínico para combater os patógenos prioritários listados pela organização, dos quais apenas seis foram classificados como inovadores [4].

Corantes/substâncias fotossensibilizadoras, naturais ou sintéticas, têm sido empregadas no tratamento de doenças e combate a microrganismos (bactérias e fungos) pelo processo de terapia fotodinâmica (TFD) [6–8]. A TFD consiste na ação de um fotossensibilizador sob iluminação promovendo eventos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos que destroem de forma seletiva e programada o tecido celular dos micro-organismos [9,10].

1.1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS E SUA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias esféricas com diâmetros de 0,5 a 1,5 μm , imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados, que se agrupam em formato de cacho de uva. Este gênero foi detectado pela primeira vez em 1880, tornando-se um dos micro-organismos mais comuns nas infecções piogênicas (geradoras de pus) em todo o mundo [11].

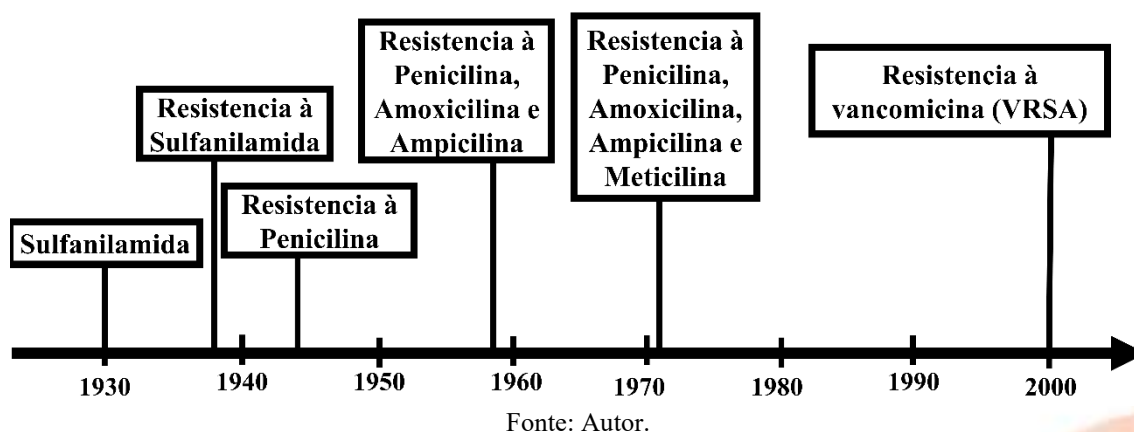
Esse gênero possui 33 espécies, das quais 17 podem ser isoladas de amostras humanas, fazendo parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos. A espécie de maior interesse médico é a *S. aureus*, pois provoca diversas infecções em seres humanos [11]. Cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, ágar e caldo simples em pH 7 a 37 °C. As colônias em placa, mostram-se arredondadas, lisas e brilhante, possuindo coloração amarelo-ouro [11].

Sua antibioticoterapia teve início, no princípio da década de 1930, com o emprego da sulfanilamida. Observou-se já no final daquela década o surgimento das primeiras cepas resistentes. Com a penicilina, *S. aureus* desenvolveu resistência pela produção da betalactamase (hidrolisante do anel betalactâmico da penicilina). Em 1944, 5% das *S. aureus* eram resistentes à penicilina; em 1959, 80% dessas bactérias se tornaram resistentes, não só a penicilina, como também à amoxicilina e ampicilina. Em 1960, descobriu-se a meticilina. Contudo, no começo da década de 1970, aparecem com muita rapidez, cepas com resistência à meticilina. Em 2000, as primeiras cepas com resistência à



vancomicina (VRSA do inglês *Vancomycin Resistant S. aureus*) foram encontradas em um hospital de referência do município de Queimados, Rio de Janeiro, Brasil. Ainda em 2002, nos EUA foi encontrado o primeiro isolado clínico de cepas VRSA. Outras cepas resistentes foram relatadas no Japão, França, Reino Unido e Alemanha [11]. A Figura 1 exibe a linha temporal do desenvolvimento de resistência da *S. aureus*.

Figura 1: Linha temporal do desenvolvimento de resistência da *S. aureus*.



Esses dados ratificam a necessidade urgente, já reconhecida pela OMS, da descoberta ou síntese de novos antibióticos para o tratamento das cepas de *S. aureus* multirresistentes [12,13]. E neste cenário uma recente tecnologia empregada no controle desses microrganismos tem por base a Terapia Fotodinâmica.

1.1.1 *Escherichia coli* e sua resistência a antibióticos

A *E. coli* é uma das bactérias mais comuns e mais importantes do gênero *Escherichia*, está constantemente associada a uma variedade de doenças, como gastroenterite e infecções extraintestinais como infecções do trato urinário (ITU), meningites e sepse. *E. coli* é o bacilo Gram-negativo mais comum isolado de pacientes com sepse [14].

As cepas de *E. coli* capazes de causar gastroenterite podem ser divididas em grupos, destacando-se as cepas: *E. coli* enterotoxigênica, enteropatogênica, enteroagregativa, produtora de toxinas Shiga e enteroinvasiva [14]. A *E. coli* enterotoxigênica é a causadora mais comuns de doença diarreica bacteriana em países em desenvolvimento, tendo uma estimativa de 840 milhões de casos por ano. Ela também causa doenças diarreicas em cerca de 30% dos viajantes a estes países. As infecções são frequentemente adquiridas pelo consumo de água ou alimentos contaminados com fezes. A *E. coli* enteropatogênica foram as primeiras cepas de *E. coli* associadas a surtos de doenças diarreicas relatados nas décadas de 1940 e 1950. É transmitida através da exposição fecal-oral de produtos alimentares ou superfícies contaminadas. A *E. coli* enteroagregativa é associada a diarreia crônica e



atraso do crescimento em crianças. A doença é definida por uma diarreia secretora aquosa, na maioria das vezes com células inflamatórias e acompanhada por náuseas, dor abdominal e febre [14].

Um número crescente de genes de resistência foi identificado em cepas isoladas de *E. coli* durante as últimas décadas. A resistência antimicrobiana em *E. coli* é considerada um dos maiores desafios em humanos e animais em escala mundial e precisa ser considerada como um verdadeiro problema de saúde pública [15].

Um estudo de resistência feito com 592 cepas de *E. coli* mostrou que uma grande parte dessas cepas apresetaram taxas elevadas de resistência à ampicilina (99,5%), doxiciclina (95,6%), tetraciclina (93,4%), trimetoprima-sulfametoxazol (74,3%), amoxicilina (65,1%), estreptomicina (54,7%) e cloranfenicol (50,2%). Resistência a cefalosporinas, quinolonas e aminoglicosídeos também foi altamente prevalente. A maioria (81%) das cepas isoladas manifestou resistência a multi-antibióticos. Uma das cepas foi resistente a todos os 22 antibióticos testados [16].

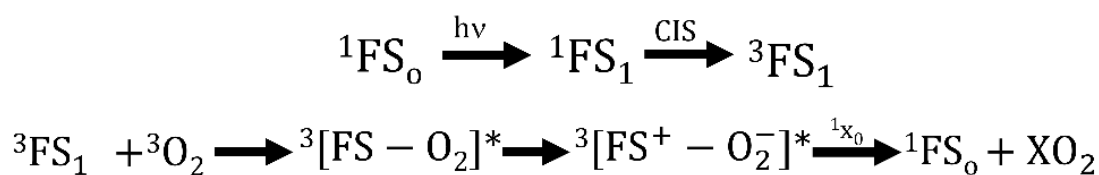
Em 2016, Yi-Yun Liu *et. al* relatou o surgimento de resistência à colistina em *E. coli*, na China [17]. A colistina é um antibiótico de amplo espectro da família das polimixinas, considerada como um dos antibióticos de “último recurso” no combate a bactérias multirresistentes [7].

1.1.2 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) tem como princípio a interação de luz em comprimento de onda adequado com um composto não-tóxico, o fotossensibilizador (FS), e oxigênio (disponível no meio) resultando em espécies reativas capazes de inviabilizar células e microrganismos. Este resultado decorre fundamentalmente da excitação eletrônica do corante pela luz e, dependendo do seu estado excitado, da ocorrência de dois mecanismos principais de reação [18–20].

O primeiro mecanismo envolve a transferência de elétron (mecanismo tipo I) entre o FS no estado tripleto excitado e oxigênio molecular no estado fundamental (tripleto) (3O_2) do alvo, gerando íons-radicais que tendem a reagir com os constituintes do alvo, resultando em produtos oxidados (Figura 2). Estes produtos oxidados geram necrose dos tecidos na região tratada [21].

Figura 2: Esquema do mecanismo tipo I (transferência de elétrons): FS e X indicam o fotossensibilizador e o alvo, respectivamente. Onde $h\nu$ representa a energia do fóton/luz incidente e CIS significa cruzamento intersistema.



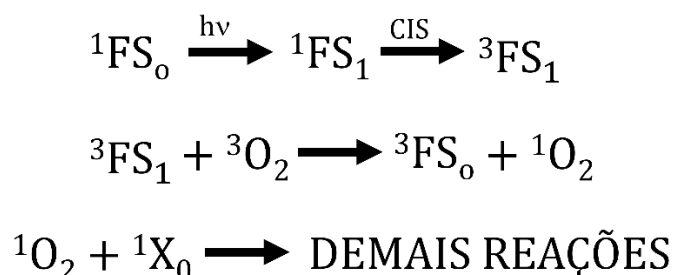
Fonte: Autor.

O segundo mecanismo (mecanismo tipo II) decorre da transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto, com a geração de oxigênio singleto, sendo este altamente



citotóxico (Figura 3). O tempo de vida do oxigênio singleto em solução depende da natureza do solvente [19]. O mecanismo tipo II é mais desejável por ser responsável pela célula ter morte celular programada encolhendo e formando vesículas que são fagocitadas por macrófagos posteriormente, este processo é denominado de apoptose, que não provoca danos aos tecidos adjacentes. Como não ocorre lise celular, não há vazamento externo do conteúdo citoplasmático, evitando assim, lesão tecidual [21].

Figura 3: Esquema do mecanismo tipo II (transferência de energia): FS indica o fotossensibilizador e X indica o alvo. Onde $h\nu$ representa a energia do fóton/luz incidente e CIS significa cruzamento intersistema.



Fonte: Autor.

Procedimentos envolvendo TFD tem sido difundidos nos países do primeiro mundo [22–24]: Em 1994, o governo japonês autorizou o emprego de Photofrin® na terapia de câncer de pulmão. Em 1995, o governo norte-americano autorizou o emprego deste produto na terapia de câncer do esôfago; em 1996, foi a vez do governo francês.

Embora a TFD tenha sido originalmente desenvolvida visando a terapia do câncer em suas diversas formas, tem se mostrado útil no tratamento de outras moléstias. Nesse rol incluem-se a psoríase [24], degeneração macular da retina, condições autoimunes, arteriosclerose, remoção de verrugas na laringe [25], tratamento de micoses fungóides [26], e destruição de infestações bacterianas resistentes a tratamentos tradicionais à base de antibióticos [27–33]. Sendo estes dois últimos comumente chamados de inativação fotodinâmica.

1.1.3 Fonte de Luz

Várias fontes de luz podem ser utilizadas na TFD tópica. As fontes disponíveis para TFD pertencem a três grandes grupos: as lâmpadas de amplo espectro (halógenas), os diodos emissores de luz (LEDs, *Light Emitting Diode*) e os *lasers* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). As primeiras fontes utilizadas foram as lâmpadas convencionais emitindo luz não coerente e policromáticas, com forte componente térmico associado [21].

1.1.4 Fotossensibilizadores

Desde o início do século XX, tem-se discutido o emprego de corantes como drogas. Certos corantes têm sido empregados como agentes terapêuticos, como é o caso do azul de metileno (AM) e



da violeta de genciana (cristal violeta), que possuem ação bacteriostática. Tappeiner, em 1900 [34], observou a morte de microrganismos quando expostos à luz solar e ao ar na presença de corantes; Tappeiner reportou o princípio de uma nova modalidade clínica para o tratamento do câncer e outras moléstias, conhecida como Terapia Fotodinâmica (TFD).

Os fotossensibilizadores (FSs) são moléculas que têm a propriedade de absorver luz (em um certo comprimento de onda) e usar esta energia para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) por processos fotofísicos e fotoquímicos, provocando reações químicas nas células e tecidos alvos do corpo [35,36].

A maioria dos FSs possui um amplo espectro de absorção na região visível, permitindo a escolha do comprimento de onda de irradiação para TFD. Os FSs devem ser idealmente: *i*) não tóxicos e sua metabolização não deve criar subprodutos tóxicos; *ii*) com administração fácil e segura com toxicidade administrativa mínima; *iii*) alcançando apenas a região de tratamento, com ativação garantida por um comprimento de onda apropriado; *iv*) estar disponível comercialmente; *v*) ter sinergia com outros tratamentos (cirurgia, quimioterapia, *etc.*); *vi*) possuir alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete; *vii*) ser quimicamente puro; e ainda, *viii*) ter absorção de luz significativa no comprimento de onda ideal para penetração profunda na pele [37].

A primeira geração de FSs foi baseada em misturas de derivados porfirínicos [23,38,39] que se mostraram eficiente no tratamento de tumores malignos ou não. Preferencialmente, o FS deve se concentrar no tecido lesado. Em parte, essa seletividade em tumores decorre da associação do FS as lipoproteínas do plasma, que o transporta preferencialmente para as células anormais. Isso ocorre pois essas células possuem um número exageradamente alto de receptores de lipoproteínas de baixa densidade, resultado de sua elevada demanda por colesterol [24]. Já em bactérias a seletividade pode ser realizada pelo tempo de internalização do composto, sendo esse tempo menor para células de bactérias em relação as células de mamíferos Os FSs de primeira geração não são quimicamente puros, causam fotossensibilização prolongada da pele podendo durar de 4 a 6 semanas após o término do tratamento, um perfil de baixa absorção do fotossensibilizador nos comprimentos de onda para ativação, resultando em baixa penetração nos tecidos [40].

A maioria dos “fotossensibilizadores de segunda geração” se assemelham à porfirina, como benzoporfirinas, clorinas, texapirinas, ftalocianinas e naftalocianinas. Esses fotossensibilizadores possuem: altos coeficientes de rendimento quântico; podem ser usados em regiões mais profundas de tecidos de mamíferos (devido ao seus comprimentos de absorção, 660-850 nm); tempo de meia vida curto no soro e acúmulo seletivo nos tecidos; toxicidade mínima na ausência de luz; e por fim, correspondem a compostos puros [22]. Alguns dos FSs disponíveis atualmente são compostos altamente hidrofóbicos, frequentemente com longo tempo de retenção nos tecidos. Várias estratégias vêm sendo desenvolvidas para melhorar a solubilidade e a especificidade tumoral destes agentes,



incluindo a sua conjugação com proteínas carreadoras, oligonucleotídeos, anticorpos monoclonais, carboidratos e polímeros hidrofílicos [41].

Atualmente, busca-se produzir FSs baseados em nanopartículas para superar alguns desafios, por exemplo, melhorar a permeabilidade do FS nas células. Com o uso de um nanomaterial, a eficiência da inativação fotodinâmica seria maximizada com a maior penetração do FS através da parede celular. Portanto, o desenvolvimento de nanomateriais que absorvem luz e induzem a formação de EROs deve contribuir para a eliminação de bactérias resistentes a antibióticos. Estudos mostram que nanopartículas de ouro e óxido de grafeno, por exemplo, podem ser úteis nesse contexto, pois, absorvem luz visível, bem como têm sido utilizados em diferentes aplicações nas áreas de nanomedicina e eletroquímica [5,42].

1.1.5 Inativação Fotodinâmica

A inativação fotodinâmica (IFD) foi relatada pela primeira vez em 1900 quando Oscar Raab e seu professor Herman Von Tappeiner publicaram o primeiro artigo sobre os efeitos fotodinâmicos com base na observação que baixas concentrações do corante de acridina na presença de luz causavam a morte do protozoário causador da malária. A primeira aplicação médica é atribuída a Tappeiner & Jesionek, em 1903, ao utilizarem por via tópica o corante eosina e luz para tratamento de câncer cutâneo. Em 1907, Von Tappeiner e Jodlbauer publicaram um livro-texto sobre essa terapia, no qual denominaram este processo de fotossensibilização usado no tratamento de tumor cutâneo e destruição de partículas infecciosas, ação fotodinâmica. Desde então, as pesquisas neste ramo buscam novos FS e novas fontes de luz. Das possibilidades terapêuticas empregando a TFD, a inativação microbiana é uma das mais discutidas atualmente [43].

A IFD envolve a combinação de luz e agentes sensíveis à luz em um ambiente rico em oxigênio de forma sinérgica, mostrando-se como uma próspera estratégia para eliminação de infecções bacterianas [44,45]. A fotoinativação bacteriana depende da concentração do FS e do comprimento de onda da luz, bem como da duração e intensidade da irradiação (dose). O efeito bactericida é rápido e altamente localizado. Não interfere com outros locais do corpo, uma vez que a aplicação do FS ocorre apenas na área infectada. Além disso, o procedimento pode ser repetido, pois não apresenta toxicidade cumulativa [46]. Por sua vez, o evento citotóxico depende da produção de $^1\text{O}_2$ ou radicais livres gerados em vários locais no micro-organismo alvo tornando improvável o desenvolvimento de resistência como resultado do procedimento [47].

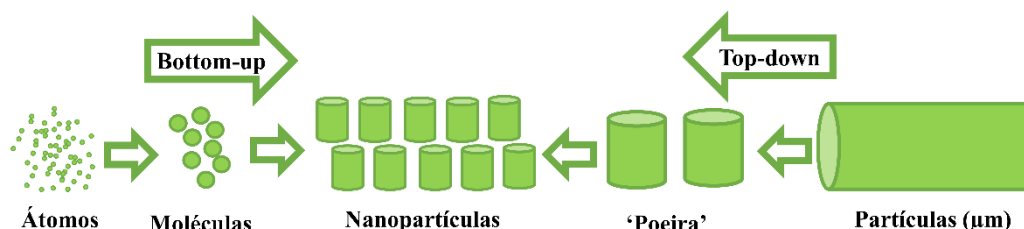
1.1.6 Nanopartículas de ouro (AuNPs)

Nanopartículas (NPs) podem ser classificadas de acordo com sua composição química e propriedades físico-químicas. Elas podem ser produzidas por métodos físicos ou químicos (Figura 4).



Os métodos físicos *top-down* são classificados pela produção a partir do material a granel, reduzido por moagem, raspagem, decomposição térmica etc. Os métodos químicos *bottom-up* partem dos componentes moleculares para gerar o crescimento dos aglomerados adotando, por exemplo, síntese eletroquímica [48,49].

Figura 4: Esquema das técnicas para fabricação de NPs: *bottom-up* e *top-down*.



Fonte: Autor.

NPs metálicas tem potencial para catálise, transporte e outras aplicações nas ciências biológicas e médicas [50]. Essas nanopartículas exibem o efeito de ressonância de plasmon de superfície, causado pela interação dos elétrons livres (camada de condução) com a luz incidente. Este efeito depende de propriedades como geometria da partícula, características físico-químicas da superfície, estado de agregação e dimensões. Em geral, as soluções aquosas de nanopartículas de ouro (AuNPs) estabilizadas com citrato são soluções coloidais vermelhas com banda de absorção plasmônica em torno de 550 nm. O plasmon de superfície tem sido usado para avaliar mudanças nas propriedades da AuNPs mediante interação com macromoléculas orgânicas naturais, como substâncias húmicas [48].

1.1.7 AuNPs e *S. aureus*.

Recentemente, as NPs têm sido usadas como um método alternativo para o tratamento de várias infecções bacterianas resistentes a antibióticos [51]. De acordo com Elbehiry *et al.*, a atividade antimicrobiana de AuNPs é reforçada por sua maior área de superfície (com cargas) por unidade de volume em relação a área por volume de Au com dimensões superiores a ordem de nanômetros [52]. Vários pesquisadores relataram a ação antibacteriana de AuNPs contra microrganismos em humanos, mas os resultados das mínimas concentrações inibitórias (MICs) para *E. coli* e *S. aureus* não foram estatisticamente significativos para AuNPs de 7 nm e 16 nm [31,53,54].

Como as NPs podem matar bactérias por adesão direta à suas paredes celulares sem a necessidade de perfurar as células, a maioria dos mecanismos de resistência a antibióticos tornam-se irrelevantes. Isso aumenta a expectativa de que as bactérias são menos propensas a resistir as NPs do que aos antibióticos [51]. Em geral, o mecanismo antimicrobiano de ação das NPs está associado:



indução de estresse oxidativo [55], liberação de íons metálicos [56], ou mecanismos não-oxidativos [57]. Esses três tipos de mecanismos podem ocorrer ao mesmo tempo.

Poucos estudos têm sido realizados em microrganismos para avaliar se doses subletais de NPs também resultam em resistência [52]. Embora os potenciais efeitos adversos das NPs estejam atraindo cada vez mais a atenção, nenhum teste robusto foi realizado [31,58].

Shamaila *et al.*, em 2016, estudou a atividade antibacteriana de AuNPs (em diâmetros de 7-34 nm) contra *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, e *Klebsiella pneumonia* e determinou que as MICs de AuNPs contra as bactérias testadas foram 2,93; 7,56; 3,92; e 3,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Além disso, Li *et al.*, em 2014, relatou que vários tamanhos de AuNPs inibiram com sucesso o crescimento de várias bactérias multirresistentes, incluindo *S. aureus* [59].

Monteiro *et al.*, em 2020, testou AuNPs ($\sim 5,5 \cdot 10^{13}$ partículas mL^{-1}), LED (630 ± 10 nm, 125 mW, 192 s, 12 J cm^{-2}) e AuNPs + LED para fotoinativar *S. aureus*. Os pesquisadores observaram que o LED proporciona um aumento (327,75%) de UFC (unidades formadoras de colônias) quando comparado ao grupo controle escuro. Ainda, o grupo AuNPs escuro exibiu redução (90,40%) na contagem de UFC em relação ao grupo controle escuro. Por sua vez, o grupo AuNPs + LED apresentou redução (99,07%) da carga microbiana [42].

O mecanismo subjacente à ação antimicrobiana de AuNPs já foi estudado anteriormente. Foi sugerido que a ligação entre NPs e componentes da célula bacteriana pode causar comprometimento da membrana celular, levando à morte celular. Em geral, a ação de AuNPs é paralela à dos íons Au [60,61]; os íons reagem não apenas com grupos de tiol e inibem enzimas respiratórias [62], mas também com os grupos de enxofre e fósforo do DNA [63]. Segundo Maliszewska *et al.*, um possível mecanismo para AuNPs promover inativação é induzindo aquecimento no meio após absorver radiação na sua região de plasmon que corresponde a banda de 510-525 nm [64].

Sabe-se que menores NPs têm maior efeito antimicrobiano devido a sua maior relação superfície-volume, aumentando sua interação com a superfície bacteriana. Em 2018, Lee *et al.* estudou o modo de ação das AuNPs em *E. coli* e reportaram que estas NPs induziram a morte celular apoptótica bacteriana por danificar rigorosamente o DNA [65]. Além disso, altos níveis de espécies de oxigênio reativo intracelular e redução da glutathiona foram observados em células tratadas com AuNPs.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade antimicrobiana de AuNPs em diâmetros de 15 e 75 nm no processo de fotoinativação de *S. aureus* e *E. coli*.



2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

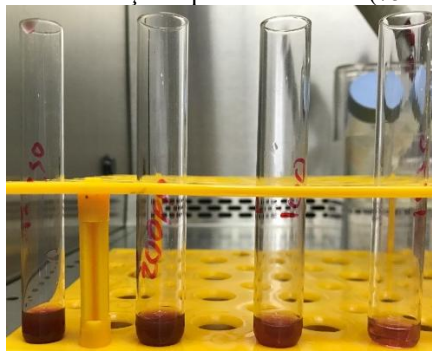
- Caracterização da janela óptica das AuNPs (15 e 75 nm) por absorção UV-vis (200-900 nm).
- Avaliar a concentração inibitória de AuNPs com cepas de *S. aureus* e *E. coli* por ensaio *in vitro* usando brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).
- Quantificar o potencial antimicrobiano de AuNPs em função da concentração e do diâmetro por meio de experimentos *in vitro* determinando a capacidade em fotoinativar as bactérias de *S. aureus*.

3 METODOLOGIA

3.1 NANOMATERIAL

Nanopartículas de ouro, esféricas com diâmetros recorrentes (seguindo uma distribuição normal) de 15 e 75 nm da marca nanoComposix®, com cobertura de polímero PVP, lote DAG2717, foram empregadas nos ensaios. As soluções de AuNPs foram preparadas em meio aquoso em concentrações de 250, 200, 100, 50 e 25 ppm para cada diâmetro (15 e 75 nm) (Figura 5).

Figura 5: Da esquerda para direita: solução aquosa de AuNPs (75 nm) à 250, 200, 100 e 50 ppm.



Fonte: Autor.

3.2 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

O espectro de absorção UV-vis das soluções aquosas de AuNPs nos diâmetros de 15 e 75 nm à 20 e 25 ppm foram obtidos em um espectrofotômetro (Perkin Elmer modelo LAMBDA™ 256 UV/Vis). O espectro foi registrado entre 200 e 900 nm usando uma cubeta de quartzo com quatro faces polidas e caminho óptico de 10 mm. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente.

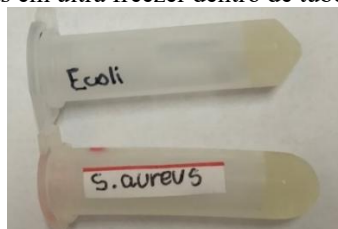
3.2.1 Fotoinativação *in vitro* empregando o ensaio MTT

Os experimentos foram realizados com cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As cepas são mantidas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescidas de glicerol a 20% (V/V) (Figura 6) e armazenadas em ultra freezer. As suspensões bacterianas foram preparadas a partir do estoque em tubo eppendorf mantido no freezer. Foram



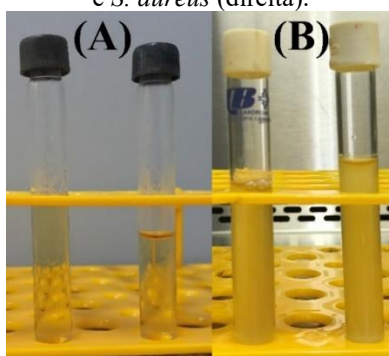
inoculados 40 μL do estoque em 80 mL de caldo BHI (Figura 7 A), em seguida, a solução foi mantida sob agitação de 120 rpm à 37 °C durante 24 h para o crescimento bacteriano (Figura 7).

Figura 6: Estoque das cepas mantidas em Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescidas de glicerol a 20% (V/V) e armazenadas em ultra freezer dentro de tubos eppendorf.



Fonte: Autor.

Figura 7: (A) Caldo BHI sem crescimento de cepas bacterianas; (B) Caldo BHI com cepas crescidas de *E. coli* (esquerda) e *S. aureus* (direita).

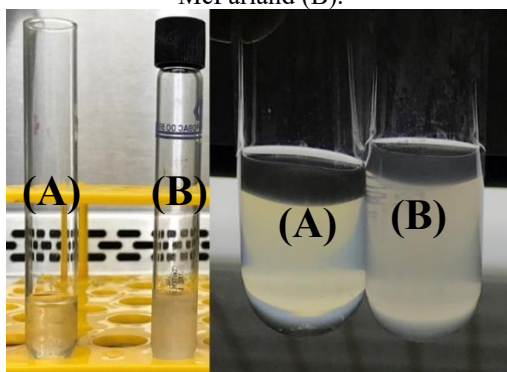


Fonte: Autor.

Após o crescimento (Figura 7 B), o inóculo foi diluído em solução fisiológica até a obtenção da turvação de 1,0 da escala de McFarland (Figura 8). Em seguida, foram adicionados 250 μL de solução contendo as concentrações de 20, 50, 100, 200 e 250 ppm de AuNPs de cada tanho em diferentes tubos eppendorf com 250 μL de caldo no padrão 1,0 na escala de McFarland. Obtendo no final as concentrações de (i) 0,0 (ii) 10 (iii) 25 (iv) 50 (v) 100 e (vi) 125 ppm. No final temos 5 tubos eppendorf contendo a AuNP, em cada uma das concentrações já mencionadas, e as bactérias na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1} (0,5 na escala de McFarland) para o diâmetro de 15 nm e outros 5 tubos eppendorf com as mesmas concentrações para o diâmetro de 75 nm, além, é claro, do grupo (i) controle negativo (0,0 ppm). O processo de adição das soluções de AuNPs foi repetido para as duas bactérias e no final teve-se 22 tubos eppendorf. Todos os tubos foram envoltos em papel alumínio e incubados sob agitação (120 rpm) durante 1 h à 37 °C para internalização das AuNPs (inclusive na concentração 0,0 ppm).



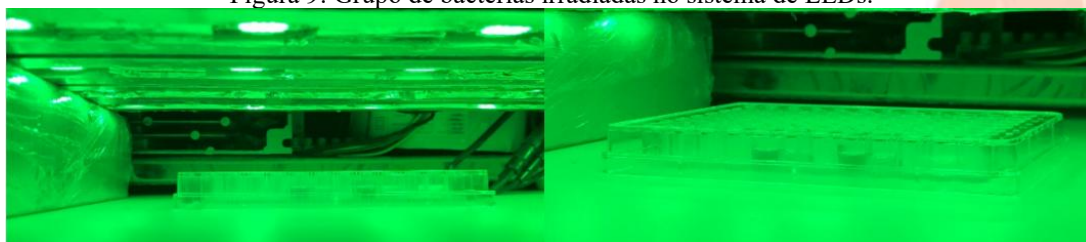
Figura 8: Solução de caldo da *S. aureus* (A) diluída em solução salina ao lado do padrão comercial de turbidez 1,0 McFarland (B).



Fonte: Autor.

Decorrido a internalização, 200 μL de cada amostra foram retirados e dispostos em duas microplacas de 96 poços separadamente – (i) irradiado – *S. aureus* e *E. coli* (ii) Escuro – *S. aureus* e *E. coli*. Para o grupo irradiado (i) a placa foi exposta à luz proveniente de um sistema de LEDs operando com comprimento de onda de 550 nm em potência de 2 mW cm^{-2} durante 2 h, resultando em uma dose de 14,4 J cm^{-2} (Figura 9). A microplaca do grupo controle (ii) escuro foi protegida da luz durante 2 h.

Figura 9: Grupo de bactérias irradiadas no sistema de LEDs.



Fonte: Autor.

Posterior a irradiação, os grupos escuros foram adicionados na mesma placa do grupo irradiado. Após a disposição de todos os grupos na mesma placa, todos os poços, de ambos os grupos, tiveram o volume de 100 μL retirados. Após a retirada do volume, todos os poços receberam 10 μL do corante MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) à 5 ppm (em solução tampão fosfato salino).

Na sequência à adição do MTT, as microplacas foram protegidas e levadas à estufa à 37 °C sob agitação por 4 h para que as bactérias metabolizassem o MTT e excretarem os cristais. Após a metabolização do MTT, foram adicionados 200 μL de álcool isopropílico nos poços com bactéria. Após adição do isopropílico, as placas foram protegidas e levadas para agitação por 12 h à temperatura ambiente.



3.2.2 Experimentos de Fotoinativação *in vitro* com plaqueamento de *S. aureus*

O meio de crescimento PCA (*Plate Count Agar*) foi preparado à 23,5 g L⁻¹ em meio aquoso (Figura 10). O meio após ser autoclavado foi vertido em placas de Petri. As placas com PCA foram armazenadas em geladeira até solidificação para posterior plaqueamento.

Figura 10: Meio PCA antes de ser autoclavado (líquido).



Fonte: Autor.

Os experimentos foram realizados com cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As cepas são mantidas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescidas de glicerol a 20% (V/V) (Figura 6) e armazenadas em ultra freezer. As suspensões bacterianas foram preparadas a partir do estoque em tubo eppendorf mantido no freezer. Foram inoculados 40 µL do estoque em 80 mL de caldo BHI (Figura 7 A), em seguida, a solução foi mantida sob agitação de 120 rpm à 37 °C durante 24 h para o crescimento bacteriano.

Após o crescimento, o inóculo foi diluído em solução fisiológica até a obtenção da turvação de 1,0 da escala de McFarland. Em seguida, foram adicionados 250 µL de solução contendo as concentrações de 20 e 50 ppm de AuNPs de cada tanho em diferentes tubos eppendorf com 250 µL de caldo no padrão 1,0 na escala de McFarland. Obtendo no final as concentrações de (i) 0,0 (ii) 10 (iii) 25 ppm. No final temos 2 tubos eppendorf contendo a AuNP, em cada uma das concentrações já mencionadas, e as bactérias na concentração de 1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹ (0,5 na escala de McFarland) para o diâmetro de 15 nm e outros 2 tubos eppendorf com as mesmas concentrações para o diâmetro de 75 nm, além, é claro, do grupo (i) controle negativo (0,0 ppm). Todos os tubos foram envoltos em papel alumínio e incubados sob agitação (120 rpm) durante 1 h à 37 °C para internalização das AuNPs (inclusive na concentração 0,0 ppm).

Decorrido a internalização, 200 µL de cada amostra foram retirados e dispostos em duas microplacas de 96 poços separadamente – (i) irradiado (ii) Escuro. Para o grupo irradiado (i) a placa foi exposta à luz proveniente de um sistema de LEDs operando com comprimento de onda de 550 nm



em potência de 2 mW cm^{-2} durante 3 h. A microplaca do grupo controle (ii) escuro foi protegida da luz durante 3 h.

Posterior a irradiação, foram realizadas diluições seriadas até 1:32, para ambos os grupos, irradiado e não-irradiado (escuro). A diluição 1:32 foi empregada no plaqueamento. Foram retirados separadamente $1 \mu\text{L}$ de cada poço da diluição 1:32 e semeados por técnica de espalhamento nas placas contendo meio PCA. Em seguida, as placas foram dispostas em estufas à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h para o crescimento bacteriano.

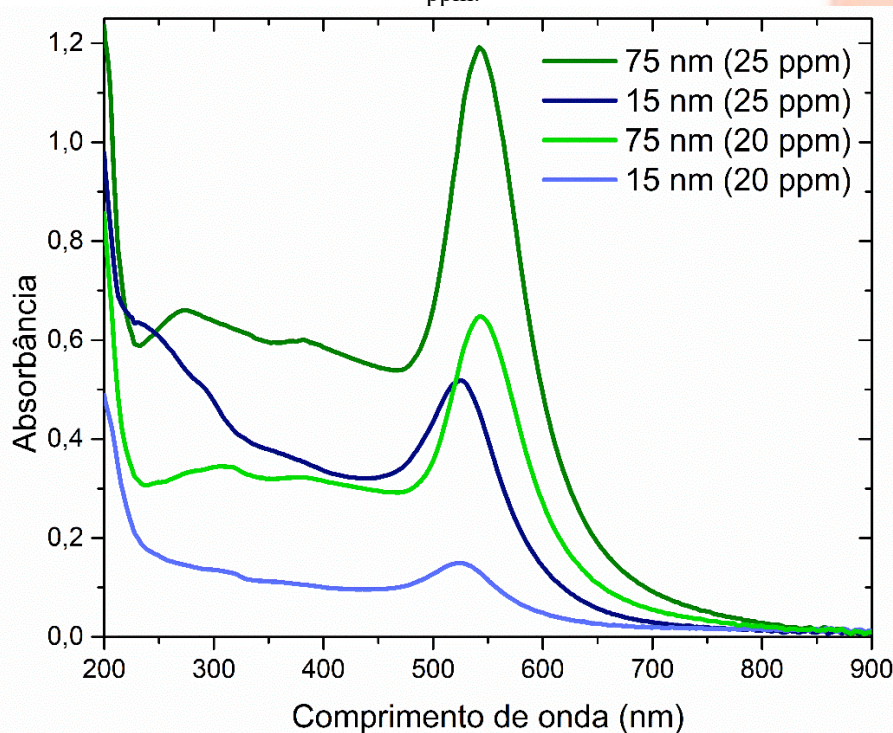
Após o crescimento bacteriano, as UFCs foram contadas, avaliando-se a morte das bactérias frente ao efeito físico e fotofísicos das AuNPs nos diâmetros de 15 e 75 nm em concentrações de 10 e 25 ppm. Todas as análises foram realizadas em duplicata. As análises estatísticas de variância dos resultados foram realizadas adotando o teste *t-student*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

A Figura 11 mostra os espectros de absorção UV-vis das soluções aquosas de AuNPs à 20 e 25 ppm para os diâmetros de 15 e 75 nm.

Figura 11: Espectros de absorção das soluções aquosas de AuNPs (75 nm) à 25 e 20 ppm e AuNPs (15 nm) à 25 e 20 ppm.



Fonte: Autor.

O espectro da amostra contendo AuNPs com diâmetro de 75 nm (em ambas as concentrações) apresenta uma banda de absorção em torno de 550 nm, já a amostra com diâmetro de 15 nm (nas duas



concentrações) exibe um pico de absorção em torno de 525 nm. Comparando os espectros das amostras contendo nanopartícula com mesmo diâmetro, por exemplo 75 nm, é possível ver que a absorbância diminui com a concentração, isso podendo ser decorrência da saturação do equipamento em virtude da alta concentração de AuNPs. Comparando-se diâmetros diferentes na mesma concentração é possível verificar que a absorção diminui em função da redução do diâmetro das AuNPs. Também é possível notar uma ampla faixa de absorção na região ultravioleta próximo na região entre 200-600 nm. É visível que as amostras com maiores diâmetros tiveram sua região de plasmon deslocada para o vermelho (maiores comprimento de onda), região de menor energia. A Figura 11 mostra ainda que as AuNPs com menores diâmetros tem sua banda de plasmon mais larga.

O desvio para o vermelho (*redshifts*), resultante do aumento de diâmetro das NPs, é devido à maior densidade de cargas nas nanopartículas, proporcionando ao sistema uma maior inércia oscilatória, modificando a frequência natural de oscilação para menores energias. O alargamento da banda de absorção plasmônica, ocorre uma vez que a densidade eletrônica não oscila em fase (homogeneamente), ocasionando que diferentes densidades eletrônicas sejam excitadas em diferentes frequências [66].

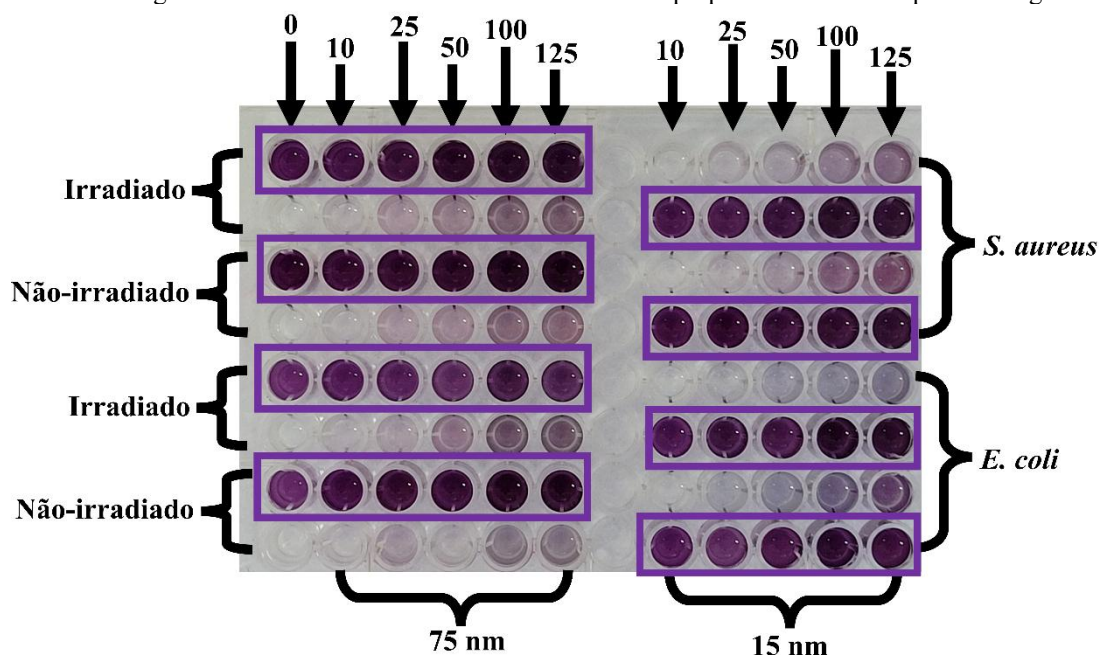
Devida à alta absorção na região em torno de 525-550 nm (região de plasmon das AuNPs) adotamos como fonte de excitação nos bioensaios de fotoinativação LEDs operando em 550 nm.

4.2 FOTOINATIVAÇÃO *IN VIDRO* EMPREGANDO O ENSAIO MTT

O ensaio com MTT permitiu constatar visualmente que algumas concentrações possuem um maior efeito inibidor. As concentrações que mais inibem o crescimento de cepas são indicadas pelos poços com menos coloração. A Figura 12 mostra uma linha de poços com AuNPs (75 nm) que receberam MTT e, logo abaixo, poços com o mesmo tratamento, mas sem adição de MTT. Por sua vez, também pode-se ser visto uma linha de poços com AuNPs (15 nm) sem MTT e, logo abaixo, poços com o mesmo tratamento, mas que receberam o MTT. Todos os poços receberam isopropílico para criar a mesma diluição e coluna de fluido no intuito de melhorar a comparação visual.



Figura 12: Microplaca de 96 poços com os grupos irradiados e não-irradiados com as diferentes concentrações de AuNPs (ppm) empregadas nos diâmetros 75 nm (primeiro bloco de colunas) e 15 nm (segundo bloco de colunas) para a *S. aureus* e *E. coli*. A figura indica ainda os tratamentos com MTT + isopropílico contornados pelos retângulos.



Fonte: Autor.

Os grupos sem AuNPs, tratados com MTT, apresentaram poços levemente mais claros após irradiação, para ambas as bactérias. É possível ver que as soluções irradiadas de AuNPs (75 nm) tem menos pigmentação que os grupos não-irradiados deste diâmetro, para a *E. coli*, já para a *S. aureus* não teve diferença visual. Nas soluções contendo nanopartículas com diâmetro de 15 nm, fenômeno de menor pigmentação também ocorre para os grupos irradiados sendo mais evidente para *E. coli*.

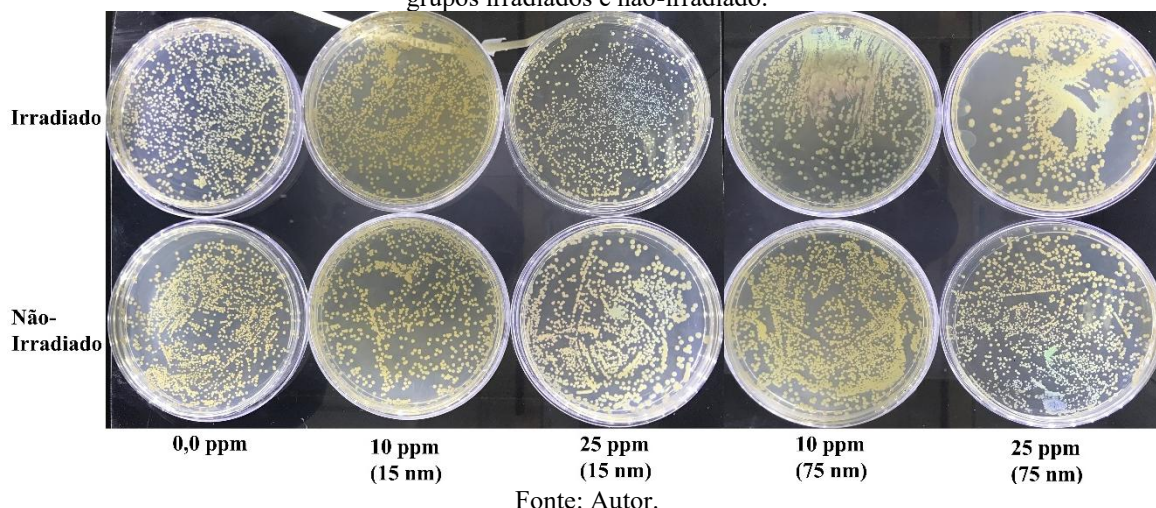
De forma geral, aparentemente a coloração, e consequentemente metabolização do MTT, é menor para os poços com *E. coli* irradiados com relação aos poços contendo *S. aureus* submetido ao mesmo tratamento. Além disso, nota-se que baixas concentrações de nanopartículas provocam maior redução de coloração ao comparar soluções irradiadas e não irradiadas, justificando o uso das concentrações 10 e 25 ppm nos bioensaios de fotoinativação.

4.2 EXPERIMENTOS DE FOTOINATIVAÇÃO *IN VITRO* COM PLAQUEAMENTO DE *S. AUREUS*

A Figura 13 mostra o crescimento de UFCs após o plaqueamento, apresentando quantias consideráveis de UFCs em todos os grupos estudados.



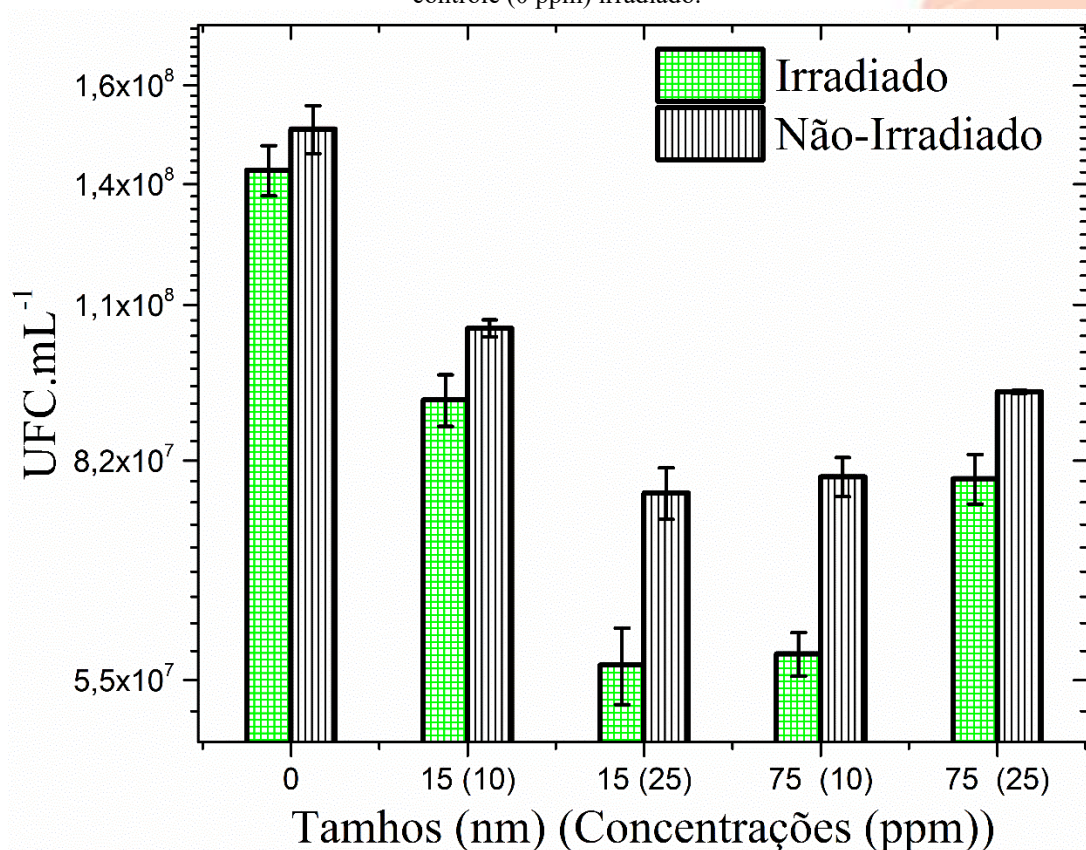
Figura 13: Unidades formadoras de colônia plaqueadas em meio Agar após ensaio fotodinâmico com AuNPs, para os grupos irradiados e não-irradiado.



A Figura 13 mostra os agrupamentos de *S. aureus* nos diversos arranjos de cadeias possíveis para esta bactéria, bem como mostra sua coloração amarelo-ouro destacada.

A Figura 14 mostra a redução da viabilidade das bactérias nos grupos tratados somente com AuNPs considerando a contagem de UFCs. Os grupos irradiados apresentaram redução ainda mais expressiva de UFCs que seus respectivos controles com AuNPs não-irradiados.

Figura 14: Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL⁻¹) em função do tratamento empregado contra *S. aureus*.
*Redução de 62,64 % em relação ao grupo controle (0 ppm) não-irradiado e redução de 59,98 % em relação ao grupo controle (0 ppm) irradiado.



Fonte: Autor.



O grupo irradiado sem AuNPs não exibiu redução em relação ao grupo não-irradiado. Além disso, todos os grupos, irradiado e não-irradiado, apresentaram redução de UFCs em relação aos grupos controles sem AuNPs. O Test *t-student* foi realizado em pares de grupos para verificar a existência de diferença significativa ($p < 0,05$). Os resultados são exibidos na Tabela 1.

Tabela 1: Comparativo do número médio de UFC mL⁻¹, pelo teste *t-student* ($p < 0,05$), nos grupos mostrados na Figura 14, onde (N) são os não-irradiados e (I) são os irradiados. Os grupos são denominados em termos do diâmetro (nm) e concentração de AuNPs (ppm) – [diâmetro(concentração)(grupo)].

Grupos comparados	Variância significativa?
0 (N) – 0 (I)	Não
15 (10) (N) – 15 (10) (I)	Não
15 (25) (N) – 15 (25) (I)	Sim
75 (10) (N) – 75 (10) (I)	Sim
75 (25) (N) – 75 (25) (I)	Sim
15 (10) (I) – 75 (25) (I)	Sim
15 (25) (I) – 75 (10) (I)	Não
0 (N) – 15 (10) (N)	Sim
0 (N) – 15 (25) (N)	Sim
0 (N) – 75 (10) (N)	Sim
0 (N) – 75 (25) (N)	Sim
15 (10) (N) – 75 (25) (N)	Sim
15 (25) (N) – 75 (10) (N)	Não
0 (I) – 15 (10) (I)	Sim
0 (I) – 15 (25) (I)	Sim
0 (I) – 75 (10) (I)	Sim
0 (I) – 75 (25) (I)	Sim
0 (N) – 15 (10) (I)	Sim
0 (N) – 15 (25) (I)	Sim
0 (N) – 75 (10) (I)	Sim
0 (N) – 75 (25) (I)	Sim
0 (I) – 15 (10) (N)	Sim
0 (I) – 15 (25) (N)	Sim
0 (I) – 75 (10) (N)	Sim
0 (I) – 75 (25) (N)	Sim

Fonte: Autor.

Os grupos que não apresentam diferença significativa de UFCs são os grupos sem AuNPs (não-irradiado e irradiado); os grupos irradiado e não-irradiado tratado com 15 nm à 10 ppm; os grupos irradiados tratados com 15 nm à 25 ppm e com 75 nm à 10 ppm; e os grupos não-irradiados tratados com 15 nm à 25 ppm e com 75 nm à 10 ppm.

Todos os demais grupos, de acordo com a Tabela 1, mostram redução significativa com relação aos controles. Por exemplo, comparando o grupo 15 nm (10 ppm) e 75 nm (25 ppm), detectou-se diferença significativa, bem como os grupos 75 nm (10 ppm) e 15 nm (10 ppm). Contudo, não foi observado nenhuma redução expressiva nas UFCs, já que se buscam reduções de aproximadamente 99.99%.

Até o momento não é possível comparar os dados com a literatura, pois nos trabalhos envolvendo AuNPs [67–72] para fotoinativação de *S. aureus* não foram fornecidos detalhes a respeito



do recobrimento das AuNPs. Sendo que, por exemplo, o polímero de recobrimento (PVP) pode inibir a geração de íons, sendo o efeito das AuNPs paralela aos dos íons, resultando em um menor efeito químico e enfatizando o efeito fotofísicos da excitação (na região de plasmon) dos elétrons na camada de condução das AuNPs e sua consequente ejeção. O presente estudo adotou AuNPs recobertas com PVP. Além disso, a faixa de AuNPs relatada em literatura abrange de 5-34 nm, logo as AuNPs de 75 nm foram pela primeira vez testadas na presente pesquisa.

5 CONCLUSÃO

Os espectros de absorção das soluções de AuNPs demonstram que a região de plasmon das AuNPs encontra-se em torno de 550 nm, possibilitando identificar a faixa espectral de excitação e, por consequência, a fonte de excitação usada nos bioensaios de inativação fotodinâmica. O ensaio com MTT mostrou uma redução relativa de pigmentação dos grupos tratados com luz e AuNPs nas concentrações mais baixas. A redução de pigmentação foi ainda mais expressiva para *E. coli* do que para a *S. aureus* o que pode indicar que a *E. coli* é mais suscetível à AuNPs. Provavelmente o teste com MTT deve ser dispensado quando o composto empregado irá apresentar forte pigmentação e turbidez ao ponto de interferir na visualização dos cristais diluídos.

O plaqueamento de *S. aureus* tratada com soluções de AuNPs nos diâmetros de 15 e 75 nm nas concentrações de 10 e 25 ppm, apesar de mostrar redução estatisticamente significativas, não revela uma redução expressiva de UFCs. A inexpressiva redução de UFCs indica que AuNPs não é um eficiente fotoinativador de *S. aureus* adotando os protocolos aqui reportados. A fotoinativação pouco eficaz de *S. aureus* pode ser devido a cobertura das AuNPs com PVP; a utilização de AuNPs não recobertas deve ser testada.



REFERÊNCIAS

- [1] J.M.A. BLAIR, M.A. WEBBER, A.J. BAYLAY, D.O. OGBOLU, L.J.V. PIDDOCK, MOLECULAR MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE, NAT REV MICROBIOL. 13 (2015) 42–51. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NRMICRO3380](https://doi.org/10.1038/nrmicro3380).
- [2] L.L. LING, T. SCHNEIDER, A.J. PEOPLES, A.L. SPOERING, I. ENGELS, B.P. CONLON, A. MUELLER, T.F. SCHÄBERLE, D.E. HUGHES, S. EPSTEIN, M. JONES, L. LAZARIDES, V.A. STEADMAN, D.R. COHEN, C.R. FELIX, K.A. FETTERMAN, W.P. MILLETT, A.G. NITTI, A.M. ZULLO, C. CHEN, K. LEWIS, ERRATUM: A NEW ANTIBIOTIC KILLS PATHOGENS WITHOUT DETECTABLE RESISTANCE, NATURE. 520 (2015) 388–388. [HTTPS://DOI.ORG/10.1038/NATURE14303](https://doi.org/10.1038/nature14303).
- [3] H. RUNCIE, INFECTION IN A PRE-ANTIBIOTIC ERA, J ANC DIS PREV REM. 03 (2015). [HTTPS://DOI.ORG/10.4172/2329-8731.1000125](https://doi.org/10.4172/2329-8731.1000125).
- [4] WORLD HEALTH ORGANIZATION, ANTIMICROBIAL RESISTANCE, (2020). [HTTPS://WWW.WHO.INT/NEWS-ROOM/FACT-SHEETS/DETAIL/ANTIMICROBIAL-RESISTANCE](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance) (ACCESSED JANUARY 7, 2021).
- [5] T. MONOWAR, S.J. BHORE, ANTIBIOTIC RESISTANCE NEEDS GLOBAL SOLUTIONS, THE LANCET INFECTIOUS DISEASES. 14 (2014) 549. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S1473-3099\(14\)70799-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70799-6).
- [6] C.S.A. CAIRES, C.R.B. LEAL, C.A.N. RAMOS, D. BOGO, A.R. LIMA, E.J. ARRUDA, S.L. OLIVEIRA, A.R.L. CAIRES, V.A. NASCIMENTO, PHOTOINACTIVATION EFFECT OF EOSIN METHYLENE BLUE AND CHLOROPHYLLIN SODIUM-COPPER AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND ESCHERICHIA COLI, LASERS MED SCI. 32 (2017) 1081–1088. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S10103-017-2210-1](https://doi.org/10.1007/s10103-017-2210-1).
- [7] C.S.A. CAIRES, C.R.B. LEAL, A.C.S. RODRIGUES, A.R. LIMA, C.M. SILVA, C.A.N. RAMOS, M.R. CHANG, E.J. ARRUDA, S.L. OLIVEIRA, V.A. NASCIMENTO, A.R.L. CAIRES, PHOTOINACTIVATION OF MCR-1 POSITIVE ESCHERICHIA COLI, LASER PHYSICS LETTERS. 15 (2018) 015601. [HTTPS://DOI.ORG/10.1088/1612-202X/AA86E0](https://doi.org/10.1088/1612-202X/AA86E0).
- [8] C.S.A. CAIRES, L.A.S. FARIAS, L.E. GOMES, B.P. PINTO, D.A. GONÇALVES, L.F. ZAGONEL, V.A. NASCIMENTO, D.C.B. ALVES, I. COLBECK, C. WHITBY, A.R.L. CAIRES, H. WENDER, EFFECTIVE KILLING OF BACTERIA UNDER BLUE-LIGHT IRRADIATION PROMOTED BY GREEN SYNTHESIZED SILVER NANOPARTICLES LOADED ON REDUCED GRAPHENE OXIDE SHEETS, MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING: C. 113 (2020) 110984. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.MSEC.2020.110984](https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110984).
- [9] T.J. DOUGHERTY, C.J. GOMER, B.W. HENDERSON, G. JORI, D. KESSEL, M. KORBELIK, J. MOAN, Q. PENG, PHOTODYNAMIC THERAPY, JNCI: JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE. 90 (1998) 889–905. [HTTPS://DOI.ORG/10.1093/JNCI/90.12.889](https://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889).
- [10] P.R. RICHTER, S.M. STRAUCH, A. AZIZULLAH, D.-P. HÄDER, CHLOROPHYLLIN AS A POSSIBLE MEASURE AGAINST VECTORS OF HUMAN PARASITES AND FISH PARASITES, FRONT. ENVIRON. SCI. 2 (2014). [HTTPS://DOI.ORG/10.3389/FENV.S.2014.00018](https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00018).



- [11] A.L. DOS SANTOS, D.O. SANTOS, C.C. DE FREITAS, B.L.A. FERREIRA, I.F. AFONSO, C.R. RODRIGUES, H.C. CASTRO, STAPHYLOCOCCUS AUREUS: VISITANDO UMA CEPA DE IMPORTÂNCIA HOSPITALAR, J. BRAS. PATOL. MED. LAB. 43 (2007) 413–423. [HTTPS://DOI.ORG/10.1590/S1676-24442007000600005](https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000600005).
- [12] OMS PUBLICA LISTA DE BACTÉRIAS PARA AS QUAIS SE NECESSITAM NOVOS ANTIBIÓTICOS URGENTEMENTE - OPAS/OMS | ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, (N.D.). [HTTPS://WWW.PAHO.ORG/PT/NOTICIAS/27-2-2017-OMS-PUBLICA-LISTA-BACTERIAS-PARA-QUAIS-SE-NECESSITAM-NOVOS-ANTIBIOTICOS](https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos) (ACCESSED SEPTEMBER 7, 2021).
- [13] OMS ALERTA PARA ESCASSEZ GLOBAL DE NOVOS ANTIBIÓTICOS, ONU NEWS. (2021). [HTTPS://NEWS.UN.ORG/PT/STORY/2021/04/1747822](https://news.un.org/pt/story/2021/04/1747822) (ACCESSED SEPTEMBER 7, 2021).
- [14] E. JAWETZ, J.L. MELNICK, MICROBIOLOGIA MÉDICA, 26TH ED., AMGH, 2014.
- [15] L. POIREL, J.-Y. MADEC, A. LUPO, A.-K. SCHINK, N. KIEFFER, P. NORDMANN, S. SCHWARZ, ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ESCHERICHIA COLI, IN: ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN BACTERIA FROM LIVESTOCK AND COMPANION ANIMALS, JOHN WILEY & SONS, LTD, 2018: PP. 289–316. [HTTPS://DOI.ORG/10.1128/9781555819804.CH13](https://doi.org/10.1128/9781555819804.CH13).
- [16] HIGH PREVALENCE AND WIDESPREAD DISTRIBUTION OF MULTI-RESISTANT ESCHERICHIA COLI ISOLATES IN PIGS AND POULTRY IN CHINA - SCIENCEDIRECT, (N.D.). [HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/ABS/PII/S1090023309004225?VI](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023309004225?via%3DIHUB) A%3DIHUB (ACCESSED NOVEMBER 20, 2021).
- [17] Y.-Y. LIU, Y. WANG, T.R. WALSH, L.-X. YI, R. ZHANG, J. SPENCER, Y. DOI, G. TIAN, B. DONG, X. HUANG, L.-F. YU, D. GU, H. REN, X. CHEN, L. LV, D. HE, H. ZHOU, Z. LIANG, J.-H. LIU, J. SHEN, EMERGENCE OF PLASMID-MEDIATED COLISTIN RESISTANCE MECHANISM MCR-1 IN ANIMALS AND HUMAN BEINGS IN CHINA: A MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL STUDY, THE LANCET INFECTIOUS DISEASES. 16 (2016) 161–168. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- [18] A.A. FRIMER, SINGLET O/SUB 2/. VOLUME I: PHYSICAL-CHEMICAL ASPECTS, (1985). [HTTPS://WWW.OSTI.GOV/BIBLIO/5730217-SINGLET-SUB-VOLUME-PHYSICAL-CHEMICAL-ASPECTS](https://www.osti.gov/biblio/5730217-singlet-sub-volume-physical-chemical-aspects) (ACCESSED APRIL 16, 2021).
- [19] F. WILKINSON, W.P. HELMAN, A.B. ROSS, QUANTUM YIELDS FOR THE PHOTOSENSITIZED FORMATION OF THE LOWEST ELECTRONICALLY EXCITED SINGLET STATE OF MOLECULAR OXYGEN IN SOLUTION, JOURNAL OF PHYSICAL AND CHEMICAL REFERENCE DATA. 22 (1993) 113–262. [HTTPS://DOI.ORG/10.1063/1.555934](https://doi.org/10.1063/1.555934).
- [20] M. OCHSNER, PHOTOPHYSICAL AND PHOTOBIOLOGICAL PROCESSES IN THE PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMOURS, J PHOTOCHEM PHOTOBIO B. 39 (1997) 1–18. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S1011-1344\(96\)07428-3](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07428-3).
- [21] B. SCHAEFFER, F.S. D'AVIZ, P.C. GHIGGI, L.M. KLASSMANN, PHOTODYNAMIC THERAPY IN ENDODONTICS: LITERATURE REVIEW, JOURNAL OF ORAL INVESTIGATIONS. 8 (2019) 86–99. [HTTPS://DOI.ORG/10.18256/2238-510X.2019.V8I1.2779](https://doi.org/10.18256/2238-510X.2019.V8I1.2779).



- [22] P.G. CALZAVARA-PINTON, REPETITIVE PHOTODYNAMIC THERAPY WITH TOPICAL DELTA-AMINOLAEVULINIC ACID AS AN APPROPRIATE APPROACH TO THE ROUTINE TREATMENT OF SUPERFICIAL NON-MELANOMA SKIN TUMOURS, *J PHOTOCHEM PHOTOBIOLOG B*. 29 (1995) 53–57. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/1011-1344\(95\)90253-8](https://doi.org/10.1016/1011-1344(95)90253-8).
- [23] P. CHARLESWORTH, T.G. TRUSCOTT, D. KESSEL, C.J. MEDFORTH, K.M. SMITH, PHOTOPHYSICAL STUDIES OF SUBSTITUTED PORPHYRINS, *J. CHEM. SOC., FARADAY TRANS. 90* (1994) 1073–1076. [HTTPS://DOI.ORG/10.1039/FT9949001073](https://doi.org/10.1039/FT9949001073).
- [24] J.G. LEVY, PHOTODYNAMIC THERAPY, *TRENDS IN BIOTECHNOLOGY*. 13 (1995) 14–18. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0167-7799\(00\)88895-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88895-2).
- [25] A.L. ABRAMSON, M.J. SHIKOWITZ, V.M. MULLOOLY, B.M. STEINBERG, C.A. AMELLA, H.R. ROTHSTEIN, CLINICAL EFFECTS OF PHOTODYNAMIC THERAPY ON RECURRENT LARYNGEAL PAPILLOMAS, *ARCH OTOLARYNGOL HEAD NECK SURG*. 118 (1992) 25–29. [HTTPS://DOI.ORG/10.1001/ARCHOTOL.1992.01880010029011](https://doi.org/10.1001/ARCHOTOL.1992.01880010029011).
- [26] P. WOLF, R. FINK-PUCHES, L. CERRONI, H. KERL, PHOTODYNAMIC THERAPY FOR MYCOSIS FUNGOIDES AFTER TOPICAL PHOTOSENSITIZATION WITH 5-AMINOLEVULINIC ACID, *J AM ACAD DERMATOL*. 31 (1994) 678–680. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0190-9622\(08\)81742-2](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(08)81742-2).
- [27] C.S.A. CAIRES, C.R.B. LEAL, C.A.N. RAMOS, D. BOGO, A.R. LIMA, E.J. ARRUDA, S.L. OLIVEIRA, A.R.L. CAIRES, V.A. NASCIMENTO, PHOTOINACTIVATION EFFECT OF EOSIN METHYLENE BLUE AND CHLOROPHYLLIN SODIUM-COPPER AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND ESCHERICHIA COLI, *LASERS MED SCI*. 32 (2017) 1081–1088. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S10103-017-2210-1](https://doi.org/10.1007/S10103-017-2210-1).
- [28] C.S.A. CAIRES, C.R.B. LEAL, A.C.S. RODRIGUES, A.R. LIMA, C.M. SILVA, C.A.N. RAMOS, M.R. CHANG, E.J. ARRUDA, S.L. OLIVEIRA, V.A. NASCIMENTO, A.R.L. CAIRES, PHOTOINACTIVATION OF MCR-1 POSITIVE ESCHERICHIA COLI, *LASER PHYSICS LETTERS*. 15 (2018) 015601. [HTTPS://DOI.ORG/10.1088/1612-202X/AA86E0](https://doi.org/10.1088/1612-202X/AA86E0).
- [29] A.E. BEHIRY, G. SCHLENKER, I. SZABO, U. ROESLER, IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS ISOLATED FROM COWS WITH SUBCLINICAL MASTITIS TO DIFFERENT ANTIMICROBIAL AGENTS, *J VET SCI*. 13 (2012) 153. [HTTPS://DOI.ORG/10.4142/JVS.2012.13.2.153](https://doi.org/10.4142/JVS.2012.13.2.153).
- [30] P.K. SELBO, A. WEYERGANG, M.S. ENG, M. BOSTAD, G.M. MÆLANDSMO, A. HØGSET, K. BERG, STRONGLY AMPHIPHILIC PHOTOSENSITIZERS ARE NOT SUBSTRATES OF THE CANCER STEM CELL MARKER ABCG2 AND PROVIDES SPECIFIC AND EFFICIENT LIGHT-TRIGGERED DRUG DELIVERY OF AN EGFR-TARGETED CYTOTOXIC DRUG, *J CONTROL RELEASE*. 159 (2012) 197–203. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JCONREL.2012.02.003](https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.02.003).
- [31] Y. ZHOU, Y. KONG, S. KUNDU, J.D. CIRILLO, H. LIANG, ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF GOLD AND SILVER NANOPARTICLES AGAINST ESCHERICHIA COLI AND BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN, *JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY*. 10 (2012) 19. [HTTPS://DOI.ORG/10.1186/1477-3155-10-19](https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-19).



- [32] H. LEE, D.G. LEE, GOLD NANOPARTICLES INDUCE A REACTIVE OXYGEN SPECIES-INDEPENDENT APOPTOTIC PATHWAY IN ESCHERICHIA COLI, COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES. 167 (2018) 1–7. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.COLSURFB.2018.03.049](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.049).
- [33] Y. YANG, H. WANG, RECENT PROGRESS IN NANOPHOTOSENSITIZERS FOR ADVANCED PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER, J. PHYS. MATER. 4 (2020) 014003. [HTTPS://DOI.ORG/10.1088/2515-7639/ABC9CE](https://doi.org/10.1088/2515-7639/abc9ce).
- [34] H. TAPPEINER, ÜBER DIE WIRKUNG FLUORESZIERENDER STOFFE AUF INFUSORIEN NACH VERSUCHEN VON RAAB., MÜNCH MED WOCHENSCHR. 1 (1900) 5–7.
- [35] M.J. BOVIS, J.H. WOODHAMS, M. LOIZIDOU, D. SCHEGLMANN, S.G. BOWN, A.J. MACROBERT, IMPROVED IN VIVO DELIVERY OF M-THPC VIA PEGYLATED LIPOSOMES FOR USE IN PHOTODYNAMIC THERAPY, JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE. 157 (2012) 196–205. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JCONREL.2011.09.085](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.085).
- [36] R. DONNELLY, P. MCCARRON, D. MORROW, S. SIBANI, A. WOOLFSON, PHOTOSENSITISER DELIVERY FOR PHOTODYNAMIC THERAPY. PART 1: TOPICAL CARRIER PLATFORMS, EXPERT OPINION ON DRUG DELIVERY. 5 (2008) 757–66. [HTTPS://DOI.ORG/10.1517/17425247.5.7.757](https://doi.org/10.1517/17425247.5.7.757).
- [37] T. GARG, N.K. JAIN, G. RATH, A.K. GOYAL, NANOTECHNOLOGY-BASED PHOTODYNAMIC THERAPY: CONCEPTS, ADVANCES, AND PERSPECTIVES, CRIT REV THER DRUG CARRIER SYST. 32 (2015) 389–439. [HTTPS://DOI.ORG/10.1615/CRITREVTHERDRUGCARRIERSYST.2015011645](https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2015011645).
- [38] M.R. HAMBLIN, E.L. NEWMAN, PHOTOSENSITIZER TARGETING IN PHOTODYNAMIC THERAPY. II. CONJUGATES OF HAEMATOPORPHYRIN WITH SERUM LIPOPROTEINS, J PHOTOCHEM PHOTOBIO B. 26 (1994) 147–157. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/1011-1344\(94\)07036-9](https://doi.org/10.1016/1011-1344(94)07036-9).
- [39] K.R. WEISHAUPT, C.J. GOMER, T.J. DOUGHERTY, IDENTIFICATION OF SINGLET OXYGEN AS THE CYTOTOXIC AGENT IN PHOTOINACTIVATION OF A MURINE TUMOR, CANCER RES. 36 (1976) 2326–2329.
- [40] L.M. MOREIRA, FOTOSSENSIBILIZADORES UTILIZADOS EM TERAPIA FOTODINÂMICA, (2008) 3.
- [41] M. SIBRIAN-VAZQUEZ, T.J. JENSEN, M.G.H. VICENTE, SYNTHESIS AND CELLULAR STUDIES OF PEG-FUNCTIONALIZED MESO-TETRAPHENYLPORPHYRINS, JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY. 86 (2007) 9–21. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.JPHOTOBIOLOG.2006.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.08.004).
- [42] J.S.C. MONTEIRO, E.E. RANGEL, S.C.P.S. DE OLIVEIRA, P.J.L. CRUGEIRA, I.P.F. NUNES, S.R.C. DE A. FAGNANI, F.J.P. SAMPAIO, P.F. DE ALMEIDA, A.L.B. PINHEIRO, ENHANCEMENT OF PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF PLANKTONIC CULTURES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS BY DMMB-AUNPS, PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY. 31 (2020) 101930. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.PDPDT.2020.101930](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101930).



- [43] A.E. DA H. MACHADO, TERAPIA FOTODINÂMICA: PRINCÍPIOS, POTENCIAL DE APLICAÇÃO E PERSPECTIVAS, QUÍM. NOVA. 23 (2000) 237–243. [HTTPS://DOI.ORG/10.1590/S0100-40422000000200015](https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000200015).
- [44] S.A. SIBANI, P.A. MCCARRON, A.D. WOOLFSON, R.F. DONNELLY, PHOTSENSITISER DELIVERY FOR PHOTODYNAMIC THERAPY. PART 2: SYSTEMIC CARRIER PLATFORMS, EXPERT OPIN DRUG DELIV. 5 (2008) 1241–1254. [HTTPS://DOI.ORG/10.1517/17425240802444673](https://doi.org/10.1517/17425240802444673).
- [45] E.L. BELINELLO-SOUZA, L.H. ALVARENGA, C. LIMA-LEAL, P. ALMEIDA, C.G. LEITE, T.R. LIMA, B. GODOY-MIRANDA, J. PREVIATI-OLIVEIRA, L. DE PRETTO, A.Z. DE FREITAS, A.U. FERNANDES, R. LABAT MARCOS, R.A. PRATES, ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY COMBINED TO PERIODONTAL TREATMENT: EXPERIMENTAL MODEL, PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY. 18 (2017) 275–278. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.PDPDT.2017.03.008](https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2017.03.008).
- [46] J.R. PERUSSI, INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE MICRORGANISMOS, QUÍM. NOVA. 30 (2007) 988–994. [HTTPS://DOI.ORG/10.1590/S0100-40422007000400039](https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039).
- [47] M.R. HAMBLIN, T. HASAN, PHOTODYNAMIC THERAPY: A NEW ANTIMICROBIAL APPROACH TO INFECTIOUS DISEASE?, PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. SCI. 3 (2004) 436–450. [HTTPS://DOI.ORG/10.1039/B311900A](https://doi.org/10.1039/B311900A).
- [48] Y. JU-NAM, J.R. LEAD, MANUFACTURED NANOPARTICLES: AN OVERVIEW OF THEIR CHEMISTRY, INTERACTIONS AND POTENTIAL ENVIRONMENTAL IMPLICATIONS, SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT. 400 (2008) 396–414. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.SCITOTENV.2008.06.042](https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2008.06.042).
- [49] CONSOLINI G., SÍNTESE E ATIVIDADE MICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS POÇOS DE, 2015. [HTTPS://WWW.UNIFAL-MG.EDU.BR/ENGENHARIAQUIMICA/SYSTEM/FILES/IMCE/TCC_2015_2/TCC_GABRIELA%20CONSOLINI.PDF](https://www.unifal-mg.edu.br/engenhariaquimica/system/files/imce/tcc_2015_2/tcc_gabriela%20consolini.pdf) (ACCESSED DECEMBER 21, 2020).
- [50] M.-C. DANIEL, D. ASTRUC, GOLD NANOPARTICLES: ASSEMBLY, SUPRAMOLECULAR CHEMISTRY, QUANTUM-SIZE-RELATED PROPERTIES, AND APPLICATIONS TOWARD BIOLOGY, CATALYSIS, AND NANOTECHNOLOGY, (2003) 54. [HTTPS://DOI.ORG/10.1021/CR030698+](https://doi.org/10.1021/CR030698+).
- [51] L. WANG, C. HU, L. SHAO, THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NANOPARTICLES: PRESENT SITUATION AND PROSPECTS FOR THE FUTURE, INT J NANOMEDICINE. 12 (2017) 1227–1249. [HTTPS://DOI.ORG/10.2147/IJN.S121956](https://doi.org/10.2147/IJN.S121956).
- [52] A. ELBEHIRY, M. AL-DUBAIB, E. MARZOUK, I. MOUSSA, ANTIBACTERIAL EFFECTS AND RESISTANCE INDUCTION OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS -INDUCED MASTITIS AND THE POTENTIAL TOXICITY IN RATS, MICROBIOLOGYOPEN. 8 (2019) E00698. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/MBO3.698](https://doi.org/10.1002/MBO3.698).
- [53] D. MUBARAKALI, N. THAJUDDIN, K. JEGANATHAN, M. GUNASEKARAN, PLANT EXTRACT MEDIATED SYNTHESIS OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES AND ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST CLINICALLY ISOLATED PATHOGENS, COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES. 85 (2011) 360–365. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.COLSURFB.2011.03.009](https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2011.03.009).



- [54] S. SHAMAILA, N. ZAFAR, S. RIAZ, R. SHARIF, J. NAZIR, S. NASEEM, GOLD NANOPARTICLES: AN EFFICIENT ANTIMICROBIAL AGENT AGAINST ENTERIC BACTERIAL HUMAN PATHOGEN, NANOMATERIALS. 6 (2016) 71. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/NANO6040071](https://doi.org/10.3390/nano6040071).
- [55] S. GURUNATHAN, J.W. HAN, A.A. DAYEM, V. EPPAKAYALA, J.-H. KIM, OXIDATIVE STRESS-MEDIATED ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GRAPHENE OXIDE AND REDUCED GRAPHENE OXIDE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE. 7 (2012) 5901–5914. [HTTPS://DOI.ORG/10.2147/IJN.S37397](https://doi.org/10.2147/IJN.S37397).
- [56] A. NAGY, A. HARRISON, S. SABBANI, R.S. MUNSON, P.K. DUTTA, W.J. WALDMAN, SILVER NANOPARTICLES EMBEDDED IN ZEOLITE MEMBRANES: RELEASE OF SILVER IONS AND MECHANISM OF ANTIBACTERIAL ACTION, INT J NANOMEDICINE. 6 (2011) 1833–1852. [HTTPS://DOI.ORG/10.2147/IJN.S24019](https://doi.org/10.2147/IJN.S24019).
- [57] Y.H. LEUNG, A.M.C. NG, X. XU, Z. SHEN, L.A. GETHINGS, M.T. WONG, C.M.N. CHAN, M.Y. GUO, Y.H. NG, A.B. DJURIŠIĆ, P.K.H. LEE, W.K. CHAN, L.H. YU, D.L. PHILLIPS, A.P.Y. MA, F.C.C. LEUNG, MECHANISMS OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MGO: NON-ROS MEDIATED TOXICITY OF MGO NANOPARTICLES TOWARDS *ESCHERICHIA COLI*, SMALL. 10 (2014) 1171–1183. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/SMLL.201302434](https://doi.org/10.1002/SMLL.201302434).
- [58] V. STONE, H. JOHNSTON, R.P.F. SCHINS, DEVELOPMENT OF IN VITRO SYSTEMS FOR NANOTOXICOLOGY: METHODOLOGICAL CONSIDERATIONS, CRITICAL REVIEWS IN TOXICOLOGY. 39 (2009) 613–626. [HTTPS://DOI.ORG/10.1080/10408440903120975](https://doi.org/10.1080/10408440903120975).
- [59] X. LI, S.M. ROBINSON, A. GUPTA, K. SAHA, Z. JIANG, D.F. MOYANO, A. SAHAR, M.A. RILEY, V.M. ROTELLO, FUNCTIONAL GOLD NANOPARTICLES AS POTENT ANTIMICROBIAL AGENTS AGAINST MULTI-DRUG-RESISTANT BACTERIA, ACS NANO. 8 (2014) 10682–10686. [HTTPS://DOI.ORG/10.1021/NN5042625](https://doi.org/10.1021/NN5042625).
- [60] Q.L. FENG, J. WU, G.Q. CHEN, F.Z. CUI, T.N. KIM, J.O. KIM, A MECHANISTIC STUDY OF THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF SILVER IONS ON *ESCHERICHIA COLI* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, (2000) 7.
- [61] J.T. SEIL, T.J. WEBSTER, ANTIMICROBIAL APPLICATIONS OF NANOTECHNOLOGY: METHODS AND LITERATURE, INT J NANOMEDICINE. 7 (2012) 2767–2781. [HTTPS://DOI.ORG/10.2147/IJN.S24805](https://doi.org/10.2147/IJN.S24805).
- [62] S. PAL, Y.K. TAK, J.M. SONG, DOES THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES DEPEND ON THE SHAPE OF THE NANOPARTICLE? A STUDY OF THE GRAM-NEGATIVE BACTERIUM *ESCHERICHIA COLI*, AEM. 73 (2007) 1712–1720. [HTTPS://DOI.ORG/10.1128/AEM.02218-06](https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06).
- [63] S.P. PRICKER, MEDICAL USES OF GOLD COMPOUNDS: PAST, PRESENT AND FUTURE, GOLD BULL. 29 (1996) 53–60. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/BF03215464](https://doi.org/10.1007/BF03215464).
- [64] I. MALISZEWSKA, A. LEŚNIEWSKA, J. OLESIAK-BAŃSKA, K. MATCZYSZYN, M. SAMOĆ, BIOGENIC GOLD NANOPARTICLES ENHANCE METHYLENE BLUE-INDUCED PHOTOTOXIC EFFECT ON *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*, J NANOPART RES. 16 (2014) 2457. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S11051-014-2457-4](https://doi.org/10.1007/S11051-014-2457-4).



- [65] H. LEE, D.G. LEE, GOLD NANOPARTICLES INDUCE A REACTIVE OXYGEN SPECIES-INDEPENDENT APOPTOTIC PATHWAY IN ESCHERICHIA COLI, COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES. 167 (2018) 1–7. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.COLSURFB.2018.03.049](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.049).
- [66] J.F.L. SANTOS, M.J.L. SANTOS, A. THESING, F. TAVARES, J. GRIEP, M.R.F. RODRIGUES, RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE LOCALIZADO E APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES E CÉLULAS SOLARES, QUIMICA NOVA. 39 (2016) 1098–1111. [HTTPS://DOI.ORG/10.21577/0100-4042.20160126](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160126).
- [67] J.S.C. MONTEIRO, E.E. RANGEL, S.C.P.S. DE OLIVEIRA, P.J.L. CRUGEIRA, I.P.F. NUNES, S.R.C. DE A. FAGNANI, F.J.P. SAMPAIO, P.F. DE ALMEIDA, A.L.B. PINHEIRO, ENHANCEMENT OF PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF PLANKTONIC CULTURES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS BY DMMB-AUNPS, PHOTODIAGNOSIS AND PHOTODYNAMIC THERAPY. 31 (2020) 101930. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/J.PDPDT.2020.101930](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101930).
- [68] M.R. HAMBLIN, L.Y. CHIANG, S. LAKSHMANAN, Y.-Y. HUANG, M. GARCIA-DIAZ, M. KARIMI, A.N. DE S. RASTELLI, R. CHANDRAN, NANOTECHNOLOGY FOR PHOTODYNAMIC THERAPY: A PERSPECTIVE FROM THE LABORATORY OF DR. MICHAEL R. HAMBLIN IN THE WELLMAN CENTER FOR PHOTOMEDICINE AT MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL AND HARVARD MEDICAL SCHOOL, NANOTECHNOLOGY REVIEWS. 4 (2015) 359–372. [HTTPS://DOI.ORG/10.1515/NTREV-2015-0027](https://doi.org/10.1515/NTREV-2015-0027).
- [69] A. ELBEHIRY, M. AL-DUBAIB, E. MARZOUK, I. MOUSSA, ANTIBACTERIAL EFFECTS AND RESISTANCE INDUCTION OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS -INDUCED MASTITIS AND THE POTENTIAL TOXICITY IN RATS, MICROBIOLOGYOPEN. 8 (2019) E00698. [HTTPS://DOI.ORG/10.1002/MBO3.698](https://doi.org/10.1002/mbo3.698).
- [70] S. SHAMAILA, N. ZAFAR, S. RIAZ, R. SHARIF, J. NAZIR, S. NASEEM, GOLD NANOPARTICLES: AN EFFICIENT ANTIMICROBIAL AGENT AGAINST ENTERIC BACTERIAL HUMAN PATHOGEN, NANOMATERIALS. 6 (2016) 71. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/NANO6040071](https://doi.org/10.3390/nano6040071).
- [71] I. MALISZEWSKA, A. LEŚNIEWSKA, J. OLESIAK-BAŃSKA, K. MATCZYSZYN, M. SAMOĆ, BIOGENIC GOLD NANOPARTICLES ENHANCE METHYLENE BLUE-INDUCED PHOTOTOXIC EFFECT ON STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS, J NANOPART RES. 16 (2014) 2457. [HTTPS://DOI.ORG/10.1007/S11051-014-2457-4](https://doi.org/10.1007/s11051-014-2457-4).
- [72] M.J. LEE, A.M. GELLER, N.C. BAMFORD, H. LIU, F.N. GRAVELAT, B.D. SNARR, F. LE MAUFF, J. CHABOT, B. RALPH, H. OSTAPSKA, M. LEHOUX, R.P. CERONE, S.D. BAPTISTA, E. VINOGRADOV, J.E. STAJICH, S.G. FILLER, P.L. HOWELL, D.C. SHEPPARD, DEACETYLATION OF FUNGAL EXOPOLYSACCHARIDE MEDIATES ADHESION AND BIOFILM FORMATION, MBIO. 7 (2016). [HTTPS://DOI.ORG/10.1128/MBIO.00252-16](https://doi.org/10.1128/mbio.00252-16).