



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANTONIO AUBERSON MARTINS MACIEL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE
MICONAZOL E NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PRODUZIDAS POR SÍNTESE VERDE CONTRA CEPAS DE
*Candida parapsilosis***

FORTALEZA

2016

ANTONIO AUBERSON MARTINS MACIEL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE
MICONAZOL E NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PRODUZIDAS POR SÍNTESE VERDE CONTRA CEPAS DE
*Candida parapsilosis***

Dissertação submetida à
coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Química da
Universidade Federal do Ceará
como requisito parcial à obtenção do
Título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Pierre Basílio
Almeida Fachine

Fortaleza

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M138a Maciel, Antonio Auberson Martins.
Avaliação da atividade sinérgica entre miconazol e nanopartículas de prata produzidas por síntese verde contra cepas de *Candida parapsilosis*. / Antonio Auberson Martins Maciel. – 2016.
61 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine.
Coorientação: Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes.
1. Nanopartículas de prata. 2. *Candida parapsilosis*. 3. Miconazol. I. Título.


CDD 540

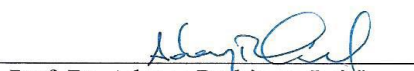
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Físico-Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.


Antônio Auberson Martins Maciel

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 04/07/2016.

EXAMINADORES:


Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Adonay Rodrigues Loiola
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes
Universidade Federal do Ceará – UFC

“Milhares e milhares de anos decorrerão, antes que as circunstâncias investidas sobre minha cabeça vão procurar um outro na multidão para reproduzir o mesmo espetáculo”.

(Napoleão Bonaparte)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha mãe, Luiza Maria Martins Maciel, que me apoiou, incentivou, brigou, castigou, ensinou, e que em todos os momentos de minha vida, quer fossem bons ou ruins esteve presente, dando seu colo como um refúgio para minhas lamentações.

A minha tia Eldenice que soube mediar todos os momentos de intempéries presentes em minha vida e que na ausência de um pai, não me fez sentir tal ausência.

Ao David Santos, técnico do laboratório, que me ajudou demasiadamente em meus experimentos.

Ao Prof. Dr. Pierre Basílio por sua orientação e oportunidade de aprofundar meus conhecimentos, sobretudo pelo conhecimento que tenho adquirido desde o início da faculdade enquanto cursava físico-química.

Ao Prof. Dr. Everardo Menezes pela sua orientação e dedicação ao ensinar.

Ao meu coorientador e amigo Dr. Afrânio Cunha por não medir esforços em ajudar e estar prontamente ao lado orientando e aconselhando da melhor maneira possível.

RESUMO

O estudo de nanopartículas com atividade biológica em microorganismos vem ganhando espaço devido ao aparecimento da resistência e ineficácia de alguns antimicrobianos. Em especial, as nanopartículas de prata (AgNPs) ganharam expansão no novo campo da nanomedicina através do seu desenvolvimento e incorporação em uma gama de produtos e tecnologias. Candidemia e candidíase estão entre as infecções mais comuns e que apresentam significativa morbidade e mortalidade. A candidemia corresponde à infecção da corrente sanguínea e a candidíase refere-se à infecção por leveduras do gênero *Candida* em qualquer sítio corpóreo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* da sinergia de AgNPs com o antifúngico azólico da classe dos imidazólicos, Miconazol, contra cepas de *Candida parapsilosis*. As AgNPs foram sintetizadas via síntese verde com variação da concentração do estabilizante, Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS) 0,5g; 0,25g e 0,1g. As AgNP foram caracterizadas por espectroscopia Ultravioleta/visível, Infravermelho com transformada de Fourier, Difração de raios-X, Espalhamento de luz e Microscopia eletrônica de varredura com a microanálise. Na avaliação da atividade sinérgica foram utilizadas 50 cepas de *Candida parapsilosis*. As AgNPs com 0,5g de SDS apresentaram tamanho médio de 77,58 nm e potencial zeta de -49,2 enquanto as AgNP com 0,25g de SDS apresentaram tamanho médio de 91,22 nm e potencial zeta de -47,2. Não houve estabilização de AgNP com 0,1g de SDS. As AgNP -G-SDS mostraram elevada atividade antifúngica quando associadas ao Miconazol.

Palavras chave: Nanopartículas de prata; *Candida parapsilosis*; Miconazol.

ABSTRACT

The study of nanoparticles on biological activity of microorganisms is becoming more popular and important as there is the emergence of resistance as well as the ineffectiveness of some antimicrobials against these microorganisms. In particular, the silver nanoparticles gained expansion in the new field of nanomedicine through their development and incorporation into a range of products and technologies. Candidemia and candidiasis are among the most common infections and which have significant morbidity and mortality. The candidemia corresponds to bloodstream infection and candidiasis refers to infection with *Candida* yeasts in any body site. The objective of this study was to evaluate the in vitro activity of synergy silver nanoparticles (AgNP) with the antifungal azole class of imidazole, Miconazole, against strains of *Candida parapsilosis*. The green AgNP were synthesized via synthesis with varying the concentration of the stabilizer, sodium dodecyl sulfate (SDS), 0,5g; 0,25g and 0,1g. The AgNP were characterized by spectroscopy UV / visible, infrared Fourier transform spectroscopy, X-ray diffraction, light scattering and scanning electron microscopy with microanalysis. In assessing the synergistic activity were used 50 strains of *Candida parapsilosis*. The AgNP with 0,5g of SDS reached an average size of 77,58 nm and zeta potential of -49,2 while NPAg with 0,25 g of SDS reached an average size of 91,22 nm and zeta potential of -47,2. No stabilization AgNP with 0,1g SDS. The AgNP-G-SDS showed high antifungal activity when combined with Miconazole.

Keywords: Silver nanoparticles; *Candida parapsilosis*; Miconazole.

TABELA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo esquemático de AgNPs	11
Figura 2: Produtos fabricados com nanopartículas.....	13
Figura 3: Antifúngicos imidazólicos.....	17
Figura 4: Representação da estrutura química do Miconazol.....	18
Figura 5: Protocolo de avaliação de sinergismo.....	28
Figura 6: Protocolo da metodologia.....	29
Figura 7: Reação geral de formação das AgNPs.....	30
Figura 8: Reação de abertura da molécula de glicose.....	30
Figura 9: UV-vis de AgNP com 0,5 g de SDS.....	33
Figura 10: UV-vis de AgNP com 0,25 g de SDS.....	34
Figura 11: UV-vis de AgNP com 0,1 g de SDS.....	35
Figura 12: Espectro no Infravermelho para AgNP 0,5 g SDS.....	36
Figura 13: Espectro no Infravermelho para AgNP 0,25 g SDS.....	36
Figura 14: DLS para AgNP produzidas com 0,5 g SDS.....	38
Figura 15: DLS para AgNP produzidas com 0,25 g SDS.....	38
Figura 16: Potencial zeta para AgNP com 0,5 g SDS.....	39
Figura 17: Potencial zeta para AgNP com 0,25 g SDS.....	40
Figura 18: Padrão de difração de raios-X.....	41
Figura 19: MEV das AgNP com 0,5 g SDS.....	42
Figura 20: Detalhe do tamanho da AgNP com 0,5 g SDS.....	42
Figura 21: MEV das AgNP com 0,25 g SDS.....	43
Figura 22: Detalhe do tamanho da AgNP com 0,25 g SDS.....	44
Figura 23: Microanálise das AgNP.....	44
Figura 24: <i>C. parapsilosis</i> em meio Agar batata.....	45
Figura 25: <i>C. parapsilosis</i> em meio Agar cromógeno.....	46
Figura 26: Discos de Miconazol e AgNP.....	46
Figura 27: Aumento da área de inibição.....	49
Figura 28: Creme produzido com AgNP e Miconazol.....	50
Figura 29: Perfil de sensibilidade em detalhe.....	51
Tabela 1: Perfil de sensibilidade de <i>C. papapsilosis</i>	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Nanotecnologia: um novo campo em ciências médicas	11
1.2 Produtos nanotecnológicos na contemporaneidade.....	12
1.3 Nanopartículas de prata.....	13
1.4 Síntese de nanopartículas.....	14
1.5 Infecções por Candida.....	15
1.6 Infecções e importância da <i>Candida parapsilosis</i>.....	16
1.7 Miconazol no tratamento da candidíase.....	17
1.8 NPAg como opções terapêuticas.....	18
1.9 Sinergismo entre AgNP e antimicrobianos.....	18
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Materiais.....	22
3.2 Produção de nanopartículas.....	22
3.3 Caracterização das AgNP.....	23
3.3.1 Separação e purificação.....	24
3.3.2 Espectrofotometria Ultravioleta visível (UV-vis).....	24
3.3.3 Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	24
3.3.4 Difração de Raios-X.....	24
3.3.5 Tamanho de partícula (Espalhamento de luz-DLS).....	25
3.3.6 Estabilidade das AgNP (Potencial zeta).....	25
3.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	26
3.4 Origem das cepas.....	26
3.5 Agentes antifúngicos.....	26
3.6 Sinergismo entre Miconazol e AgNP.....	27
3.7 Interpretação dos resultados.....	27
3.8 Estocagem da amostra.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5 CONCLUSÕES.....	53
6 REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia: um novo campo em ciências médicas

Nos últimos anos o vasto campo da nanotecnologia tem ganhado notório espaço na área científica, englobando conhecimentos nas áreas de química, física, biologia, matemática, ciência dos materiais dentre outras. Essas ciências em conjunto são consideradas básicas e têm caracterizado esse novo ramo científico (Zijlstra e Orrit 2011).

A aplicação de materiais e estruturas em nanoescala, geralmente variando de 1 a 100 nm, é uma área emergente de nanociência e nanotecnologia. Os nanomateriais podem oferecer soluções aos desafios para o meio tecnológico, em se tratando de conversão da energia solar, catálise e principalmente na área da medicina (Dahl e Hutchison 2009). Na Figura 1 pode-se ver o efeito comparativo do tamanho das nanopartículas com outras estruturas.

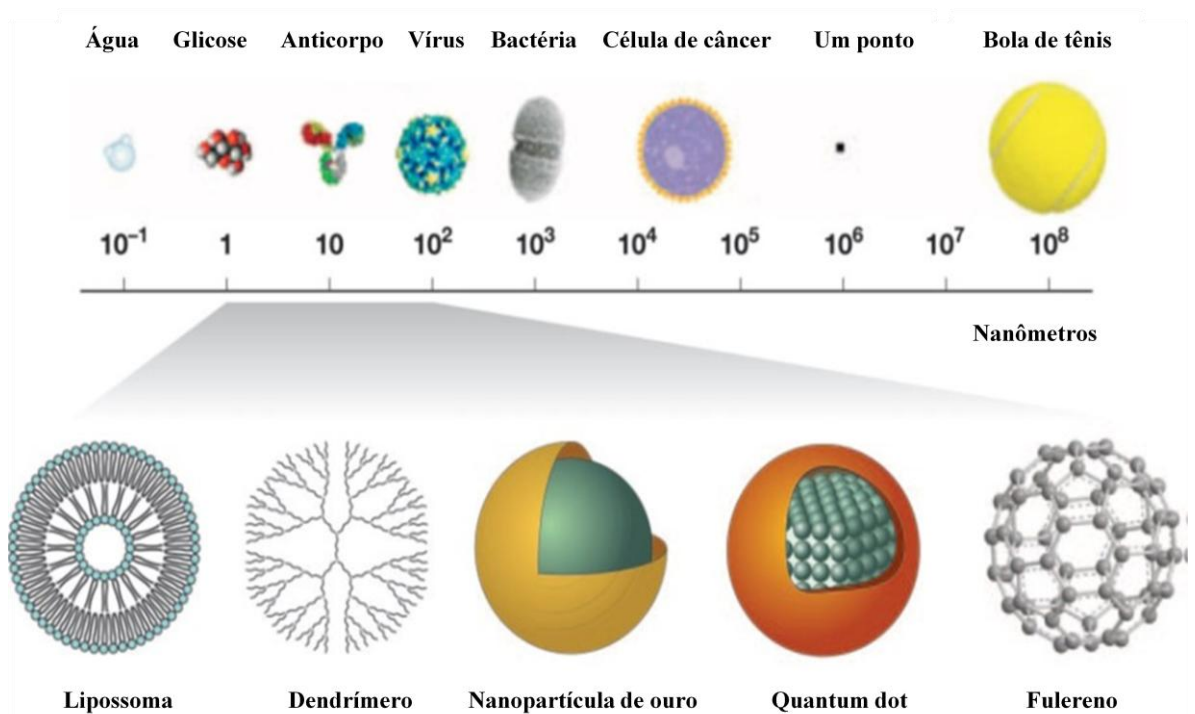


Figura 1: Modelo esquemático de estruturas nanoparticuladas (San Alberto, 2014).

O estudo de processos de síntese de produtos nanotecnológicos devem sempre acompanhar métodos que envolvam uma rota verde, visando à minimização de produtos

tóxicos e que agridam ao meio ambiente. A implantação dos processos de sustentabilidade devem adotar os princípios fundamentais da química verde. Princípios esses que são voltados à orientação de utilização de produtos que não agridam ou que agridam minimamente o meio ambiente. Assim, qualquer processo de rota ou produto químico sintético deve abordar esses princípios (Poliakoff *et al*, 2013).

Muitas vezes, nanopartículas mostram propriedades biológicas bem como características químicas e físicas bem diferentes em relação a seus homólogos em escala macro. Nanopartículas de prata (AgNPs), por exemplo, possuem características distintas da prata metálica, tais como uma ressonância de plasma de superfície de absorção na região do UV-vis. A banda plasma surge da existência de elétrons livres na banda de condução devido à pequena dimensão das partículas, sendo que a mudança da banda é dependente do tamanho de partícula, material adsorvido e constante dielétrica (Mulvaney *et al*, 2011).

De um modo geral, as nanopartículas metálicas podem ser preparadas e estabilizadas por meio de métodos físicos e químicos. As abordagens químicas, tais como a redução química, técnicas eletroquímicas e reduções fotoquímicas ainda são os mais amplamente utilizados (Frattoni *et al*, 2009).

Estudos têm demonstrado que o tamanho, a morfologia, a estabilidade e propriedades físicas e químicas de nanopartículas metálicas são fortemente influenciados pelas condições experimentais, a cinética de interação dos íons metálicos com os agentes de redução e os processos de adsorção de agentes de estabilização com as nanopartículas metálicas. Assim, a concepção de um método de síntese em que o tamanho, a morfologia, a estabilidade e as propriedades (físicas e químicas) são controladas, tornaram-se um importante campo de interesse, tendo em vista que a síntese verde supri grande parte dessas características ditas ideias de síntese (Chou *et al*, 2010).

1.2 Produtos nanotecnológicos na contemporaneidade

Diversos produtos baseados em nanotecnologia encontram-se disponíveis no mercado global, sejam em produtos farmacêuticos, perfumarias, cosméticos ou até mesmo em produtos não relacionados à saúde, como celulares. Estimativas de organizações mundiais avaliam que a demanda internacional para produtos com nanotecnologia possam ultrapassar os 5 bilhões de dólares anuais, constata-se portanto a importância da nanotecnologia para a economia de um país, sobretudo, países em desenvolvimento (Mu *et al*, 2013).

Existe ainda, uma perspectiva para que esses produtos nanotecnológicos possam ser utilizados em tratamentos e curas de algumas doenças que não possuem um bom prognóstico na atualidade (Doane e Burda. 2012; Dykman e Khlebtsov, 2012).

Os produtos que possuem nanotecnologia ainda estão ganhando seu devido espaço na sociedade, porém alguns até já são comercializados. Os primeiros produtos no mercado são os de higiene pessoal, que prometem deixar mais limpa a pele, manter os dentes mais saudáveis bem como produtos de natureza capilar. Na Figura 2, podem-se evidenciar alguns desses produtos que já estão no mercado (Muller *et al*, 2008).



Figura 2: Produtos fabricados com nanopartículas (Muller *et al*, 2008).

Outros produtos também formados à base de nanotecnologia estão sendo fabricados: de natureza médica como sondas, cateteres, sensores, anticorpos acoplados a nanopartículas metálicas, materiais médico-hospitalares revestidos por nanopartículas assim como produtos de uso no dia-a-dia, como baterias de celulares, tabletes e computadores. A nanotecnologia firmou espaço na sociedade contemporânea e a tendência é ainda mais sua abrangência (Noimark *et al.*, 2009).

1.3 Nanopartículas de prata (AgNPs)

Já se conhecem inúmeras partículas metálicas, dentre elas podemos citar a partículas de cádmio, chumbo, platina, paládio, prata, ouro, dentre outras. As mais excessivamente estudadas são as partículas de ouro e prata em detrimento as suas características particulares e muito promissoras em se tratando de efeitos antimicrobianos e em tecnologia da informação (Jans e Huo, 2012).

As AgNPs apresentam também diversas aplicações como antissépticos, antibacterianos, antifúngicos, nanocatalisadores, sensores etc. (Astruc *et al.*, 2005; Arvizo *et al.*, 2012; Hervés *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2009). A prata é um metal mais barato que o ouro, o que a torna atrativa para as pesquisas. Aliado a isso, a prata em estado nanométrico apresenta propriedades óticas peculiares, o que possibilita sua utilização em produtos tecnológicos (Dykman e Khlebtsov 2012). A utilização de cateteres médicos recobertos por fina camada de prata nanométrica, pode impedir a colonização de microorganismos e dessa forma diminuir o tempo de internação hospitalar dos pacientes, pois previne infecções (Jha *et al.*, 2014). Além de tudo isso as AgNPs são pouco estudadas quando comparadas as AuNPs (Arvizo *et al.*, 2012).

A síntese de AgNPs pode ser feita por diversos processos químicos, biológicos ou físicos. Os métodos químicos geralmente são bem efetivos e podem ser moderadamente controlados. No entanto, são utilizados reagentes tóxicos e gerados resíduos que ameaçam a saúde de homens, animais e causam danos ao meio ambiente. Diante disso, processos verdes têm sido buscados para minimizar a geração de resíduos (Hulkoti e Taranath 2014). Dos processos considerados verdes, temos os que utilizam carboidratos no seu processamento (Sharma *et al.*, 2009).

As AgNPs recém sintetizadas são instáveis e precisam de um agente estabilizante. Existem dezenas deles, mas poucos podem ser considerados como verdes. O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um éster do ponto de vista químico de cadeia carbônica saturada, não ramificada, homogênea, que atende aos princípios do processo verde, segurança e eficácia, pois é usado em pastas de dentes e produtos de higiene pessoal (Sharma *et al.*, 2009).

Diversos carboidratos têm sido usados, a propriedade que o carboidrato tem que possuir é a presença de carbono anomérico, que fornece ao açúcar a qualidade de redutor. O açúcar redutor mais conhecido e usado é a glicose (Astruc *et al.*, 2005). Com base nisso, um método verde de síntese de AgNPs pode ser aquele que utiliza

glicose como agente redutor e SDS como estabilizante. Esse método não produz resíduos tóxicos.

1.4 Síntese de nanopartículas

Há basicamente dois meios de produção de nanopartículas metálicas, *top down* e *bottom up*. Através do processo *top down* as nanopartículas são formadas a partir do metal na sua forma *bulk* por meios mecânicos, dessa forma as nanopartículas formadas apresentam vários defeitos em sua estrutura, uma vez que é gerada uma tensão entre os átomos para a formação da nanopartícula (Cao; Wang, 2011). Para a rota *bottom up*, a formação de estruturas nanométricas se dá pela agregação ou auto-organização, em via úmida, do metal. Esse método é o mais utilizado, sendo produzidas a partir dele as dispersões coloidais. As nanopartículas produzidas por *bottom up* tendem a ser mais uniformes e homogêneas, pois a auto-organização e a agregação ocorrem pela diminuição da energia livre de Gibbs do sistema. Assim, a formação das nanopartículas ocorre quando o sistema aproxima-se do equilíbrio termodinâmico (Cao; Wang, 2011).

1.5 Infecções por *Candida*

Leveduras do gênero *Candida* residem como comensais em seres humanos sem causar patologias. Deste modo, possuem uma grande importância quando, de alguma forma causam infecções em seu hospedeiro. Sabe-se que há alta frequência de casos em que se verifica a infecção e colonização de espécies de fungos desse gênero. Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 80% da população saudável. Entre as mulheres, em torno de 20 a 30% apresentam colonização vaginal. Isso se deve ao órgão genital feminino ser propício ao desenvolvimento deste micro-organismo no que tange ao pH e temperatura. Em hospitais, o gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de todas as especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes (LEWIS, 2012).

Infecções por *Candida* envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas oportunistas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Infecções de pele e mucosas podem ser registradas em pacientes

saudáveis, mas com pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio de infecção. Contrapondo-se a isso, infecções de forma sistêmica podem comprometer ainda mais os indivíduos, acometendo vísceras como resultado de disseminação hematogênica, conhecida nosocomialmente por sepse. Tais complicações infecciosas são geralmente documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas (LEWIS, 2012; KETT, 2012; BARBEDO, 2011).

Embora a maioria das infecções ocasionadas por *Candida* pareçam originar de uma fonte endógena, a transmissão nosocomial não é incomum e pode ocorrer por transmissão cruzada como por exposição a uma fonte comum de infecção. Deste modo, é importante a implementação de medidas de controle adequadas, conhecimento de epidemiologia dessas infecções fúngicas invasivas (IFI), implementação adequada de terapia antimicótica e para isso se faz necessário o conhecimento sobre os mecanismos de sobrevivência desses microorganismos, como principalmente seu perfil de adequação de resistência aos agentes antimicrobianos (SAGHROUNI *et al.*, 2013).

1.6 Infecções e importância da *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis é uma levedura cada vez mais isolada em diversas partes do mundo, percentual de isolamento varia de 5-10% dependendo do país analisado (Guinea 2014). *C. parapsilosis* é uma levedura isoladamente com frequência no Brasil e no Ceará, apresenta sensibilidade aos principais antifúngicos testados, mas não é possível prever o seu comportamento em um futuro próximo, principalmente devido ao uso intensivo de antifúngicos, principalmente os de uso sistêmico, como a anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol (Menezes *et al.*, 2013; Nucci *et al.*, 2007).

Algumas cepas têm sítios específicos e grupos de pacientes mais susceptíveis, *C. parapsilosis* acomete principalmente pacientes com doenças hematológicas e neutropênicos ou em uso de corticosteróides (Pfaller *et al.*, 2014).

Biofilme pode ser definido como uma comunidade de células aderidas à superfície de materiais de maneira irreversível, embebidas em matriz polimérica e que diferem fenotipicamente das células isoladas, sendo que a *C. parapsilosis* é adaptada para a produção desse importante fator de virulência e auxilia a levedura a se fixar em

diversos materiais entre eles próteses odontológicas (Kamikawa *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014).

O biofilme de *C. parapsilosis* adere em cateteres, essa habilidade é muito importante no desenvolvimento de infecções urinárias em pacientes que utilizam sondas urinárias de demora. O biofilme produzido por *C. parapsilosis* é capaz de colonizar células humanas causando danos e redução da atividade metabólica das células o que prolonga a doença e torna o seu tratamento mais complexo e demorado, pois os biofilmes geralmente são mais resistentes aos antifúngicos tradicionais (Negri *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2014).

Estudos recentes mostram a tentativa de utilizar novas substâncias contra *C. parapsilosis*, podemos destacar o uso de sinvastatina associado ao fluconazol (Menezes *et al.*, 2012), nanopartículas de prata (Sanjenbam *et al.*, 2014), naftoquinonas (Neto *et al.*, 2014), amiodarona associada a fluconazol (Silva *et al.*, 2013). Os resultados são animadores e novas drogas e associações devem ser buscadas para o combate de infecções causadas por *C. parapsilosis*.

1.7 Miconazol no tratamento da candidíase

Na Figura 3 pode-se visualizar as moléculas do antifúngicos do grupo dos imidazóis.

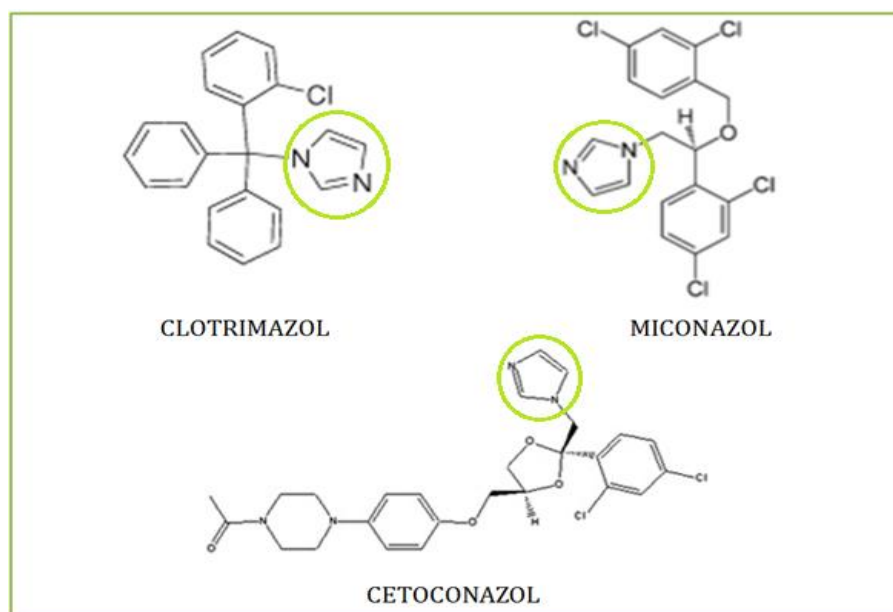


Figura 3: Antifúngicos Imidazólicos

Miconazol tem sido utilizado para tratamento de uso tópico de candidíase e outras infecções fúngicas na pele há pelo menos 40 anos. No mercado brasileiro, as preparações tópicas de Miconazol variam a concentração de 1-2% e estão no mercado na forma de cremes e pomadas. A sensibilidade ao miconazol foi avaliada por metodologias antigas, que são pouco utilizadas nos dias atuais e antes da emergência de cepas de *Candida* spp. resistentes, não se sabendo como se comporta seu perfil de ação avaliado pelas novas metodologias (Alsterholm *et al*, 2010). Acima, figura com os antifúngicos do grupo do Miconazol.

O grupo de substâncias químicas mais utilizadas no tratamento de infecções fúngicas são os imidazólicos com destaque para o Miconazol (Figura 4).

O mecanismo de ação do Miconazol pode ser sumarizado em três principais eixos de ação, sendo que o primeiro inibe a enzima lanosterol 14 a demetilase (CYP51), o segundo afeta a síntese de ácidos graxos, altera o sistema da catálise, a aderência fúngica, e formação dos tubos germinativos e micélio e por último induz espécies reativas de oxigênio. Todas essas ações somadas torna o miconazol um antifúngico fungicida, ou seja, capaz de matar as células fúngicas susceptíveis, essa propriedade não é compartilhada por outros compostos do grupo (Vasquez e Sobel 2012).

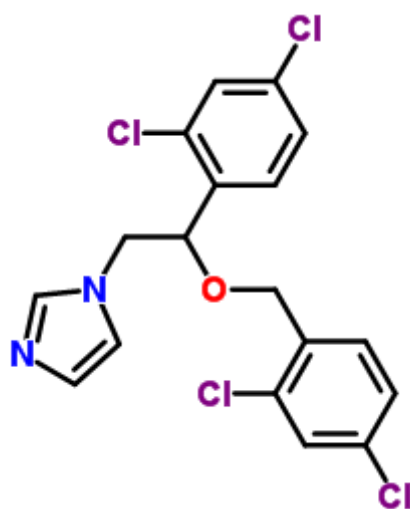


Figura 4. Representação da Estrutura Química do Miconazol.

O miconazol é um antifúngico que está em uso há cerca de 40 anos. Mesmo com o uso extensivo não foram detectados casos importantes de resistência, é um fármaco usado amplamente no tratamento de infecções fúngicas vaginais e está disponível na forma de cremes vaginais, pomadas, óvulos vaginais. As concentrações do miconazol nessas formas farmacêuticas pode chegar a 1200 mg (Sobel, 2014). Essas dosagens elevadas podem desencadear os efeitos colaterais atribuídos ao miconazol, sendo os principais: irritação, queimaduras, prurido e dermatite alérgica de contato (Dias *et al.*, 2012).

Infecções vaginais devido a *Candida* spp. são comuns durante a gravidez, tratar essas infecções é sempre um desafio para o médico que realiza o atendimento dessa futura mãe, devido ao risco inerente ao feto, o miconazol creme vaginal pode ser usado durante a gravidez o que mostra a sua segurança (Torres e Moayed, 2012).

1.8 NPAg como opções terapêuticas

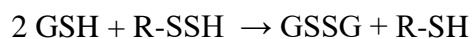
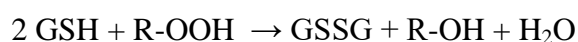
Há muito tempo já se conhece as ações antimicrobianas envolvendo soluções de prata. Entretanto, seus mecanismos de ação ainda são desconhecidos e discutíveis nas camadas científicas. Sugerem-se três vias importantes para o mecanismo de ação da prata no organismo microbiano (Marambio *et al.*, 2010).

O primeiro é através da geração de espécies reativas de oxigênio do inglês Reactive Oxygen Species (ROS). O segundo é proposto pelo rompimento da produção de ATP e da replicação do DNA após a absorção das nanopartículas de prata ou de Ag^+ . O terceiro mecanismo proposto é através do próprio rompimento da membrana celular do microorganismo.

1.8.1 Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Através de um processo normal que ocorre dentro das células, pequenas quantidades de ROS são produzidas, como subprodutos, através do próprio metabolismo celular. Apesar de serem produzidas em pequenas quantidades, as espécies reativas de oxigênio devem e são controlados pelas defesas antioxidantes

intrínsecas ao microorganismo, formada principalmente pelo equilíbrio entre a glutathiona (GSH) e o dissulfeto de glutathiona. Abaixo tem-se esquema representativo das reações constituintes:

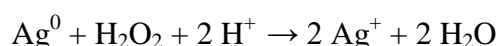


Uma vez que esse equilíbrio se desfaça a quantidade de ROS intracelular pode aumentar. O excesso de ROS pode não somente atacar a membrana celular, como também as mitocôndrias, prejudicando o processo de respiração celular bem como ataque ao próprio DNA, impedindo a replicação celular (Nel et al, 2005; Mendes et al, 2006).

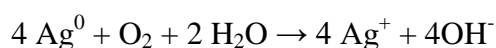
Conhece-se que metais de variados tipos, sobremaneira a prata, pode induzir o aumento de ROS intracelular. Nanopartículas de prata, principalmente, podem se ligar diretamente a GSH ou a GSH redutase ou até mesmo em outras enzimas do equilíbrio GSH/GSSG. A Ag^+ em si, pode aumentar o ROS através da captação de elétrons da cadeia respiratória. Portanto tem-se o aumento de ROS intracelular, seja pelo aumento na produção de ROS ou pela intervenção no mecanismo de equilíbrio de antioxidantes intracelulares (Carlson *et al*, 2009).

1.8.2 Aumento de Ag^+ intracelular através das nanopartículas

Alguns mecanismos são propostos para o efeito da Ag^+ dentro do microorganismo. Segundo Asharani *et al* as nanopartículas de prata são atacadas por peróxido de oxigênio liberando íons Ag^+ . Esse mecanismo dar-se-á no interior das mitocôndrias em que há um excesso de íons H^+ (Asharani *et al*, 2010). A reação é proposta a seguir:



Outro mecanismo é proposto por Choi *et al*. A prata seria atacada pelo oxigênio fora ou dentro da célula após a nanopartículas ser absorvida (Choi *et al*, 2008). A reação é proposta a seguir:



Outros autores sugerem que a Ag^+ interage com proteínas e enzimas como as da cadeia respiratória, NADH redutase, atrapalhe síntese de ATP e qualquer proteína que contenha grupamentos de enxofre. Há, na verdade, um verdadeiro colapso celular após a absorção da nanopartícula com consequente liberação de grandes quantidades de prata iônica no interior celular (Dibrov *et al*, 2008; Bard *et al*, 2009).

1.9 Sinergismo entre NP_{Ag} e antimicrobianos

É sabido e já reportado em alguns trabalhos que o uso de nanopartículas de prata associada a outras classes de substâncias químicas podem ser úteis no tratamento de algumas infecções fúngicas. A avaliação do efeito sinérgico entre nanopartículas de prata e o aldeído cinâmico mostrou uma potente atividade contra a esporulação bacteriana (Gosh *et al*, 2014).

Nanopartículas de prata foram testadas em associação com o antifúngico nistatina e o antibacteriano clorexidina a fim de se desestruturar o biofilme formado por *Candida* spp e contribuir para a prevenção de resistência bem como melhorar o tratamento de estomatite associado a próteses odontológicas (Monteiro *et al*, 2014).

Antibióticos considerados padrões como Canamicina, Cloranfenicol e Ampicilina também tiveram sua avaliação através do sinergismo com nanopartículas de prata contra bactérias patogênicas (Hwang *et al*, 2012).

Existem estudos que exploram a ação sinérgica de antifúngicos com nanopartículas de prata, esses estudos são raros e com um número ainda muito reduzido de cepas o que limita qualquer exploração dos resultados encontrados, portanto testar um número maior de cepas pode levar a um resultado ainda não visto. O Fluconazol e o Itraconazol tiveram sua ação potencializada com as nanopartículas de prata (Singh *et al*, 2013).

A atividade antifúngica de nanopartículas de prata já é bem conhecida, assim como a do Miconazol, entretanto, a ação sinérgica permanece desconhecida. Essa associação pode ter diversas utilizações pela indústria farmacêutica, pois o Miconazol é utilizado em larga escala em diversas formulações farmacêuticas, quer em uso animal, quer uso humano.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a atividade sinérgica de AgNPs com variação da quantidade de SDS com o antifúngico azólico Miconazol contra cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de pacientes.

2.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar e purificar as AgNPs utilizando glicose e o agente de *capping* SDS.
2. Caracterizar as AgNPs por DRX, IR, MEV, DLS e UV-vis.
3. Purificar as cepas de *Candida parapsilosis* e realizar a Identificação Presuntiva.
4. Determinar a concentração inibitória mínima das AgNPs contra cepas de *Candida parapsilosis* isoladas de amostras de pacientes.
5. Avaliar o sinergismo entre AgNPs e o miconazol contra *C. parapsilosis*.
6. Elaborar e avaliar a ação de um creme com AgNPs e miconazol contra *C. parapsilosis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes e materiais foram usados sem nenhuma purificação e de acordo com as instruções dos fabricantes. Glicose (Dinâmica- São Paulo- Brasil, pureza > 98.5%), nitrato de prata (Dinâmica- São Paulo- Brasil, pureza > 99%), miconazol (Sigma – Estados Unidos), (dodecil sulfato de sódio (SDS) (Synth - São Paulo- Brasil, pureza > 98.5%), Mueller-Hinton ágar (Himedia - Índia) e Azul de metileno (Dinâmica- São Paulo- Brasil, pureza > 98.5%) foram adquiridos e utilizados dentro do prazo de validade e suas propriedades fundamentais foram garantidas pelos fabricantes.

3.2 Síntese de AgNPs

Foram preparadas três suspensões de AgNPs. A metodologia empregada, bem como as substâncias utilizadas, foi igual em todas as três suspensões. A única diferença entre estas foi a quantidade do agente estabilizante, o dodecil sulfato de sódio (SDS). Na síntese da suspensão 1 de AgNPs foi utilizado 1,0g de glicose como agente redutor e 0,5g de SDS como estabilizante, agente de *capping*. Na síntese das suspensões 2 e 3 foram utilizados 0,25g e 0,1g de SDS, respectivamente. Esses reagentes foram dissolvidos em 500 mL para obtenção de uma solução 5 mM de AgNO_3 . A mistura foi aquecida até 50 °C, e mantida nessa temperatura por 30 minutos com agitação constante. A reação foi acelerada com o acréscimo de 1,0mL de NaOH 0,2 mol/L. A mesma foi considerada completa quando adquiriu uma coloração escura característica de uma suspensão de AgNPs (Darroudi *et al.*, 2010). O protocolo de síntese bem como o aspecto morfológico das suspensões de AgNP produzidas podem ser observadas na Figura 6.

3.3 Caracterizações das nanopartículas

3.3.1 Separação e Purificação das AgNPs

A solução coloidal de AgNPs é de difícil separação. Para conseguir separá-las foi necessário a utilização de ultracentrifugação. As AgNPs produzidas foram precipitadas em uma ultracentrífuga Himac CS150NX, utilizando 10.000 rpm durante 20 min, após cada etapa as AgNPs foram lavadas três vezes com água destilada e armazenadas em geladeira até o momento do uso (Li *et al.*, 2011).

3.3.2 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As AgNPs absorvem luz em torno do comprimento de onda de 400 nm, devido a esse fator peculiar a confirmação da presença de AgNPs nas suspensões obtidas foi realizada por espectrofotometria UV-visível na faixa de 300 -700 nm em espectrofotômetro Thermo Scientific GENESYS™ 10s (Peng *et al.*, 2013).

3.3.3 Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

No presente trabalho, a estabilização das AgNPs foi feita com SDS. A superfície das nanopartículas apresentou interação com o SDS, interação essa evidenciada através da realização do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Esta técnica é comumente utilizada para revelar a conjugação de nanomaterial-biomolécula (Jiang *et al.*, 2004; Shang *et al.*, 2007; Tom *et al.*, 2006). Nossas medidas foram realizadas em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR Spectrum ONE na faixa de 4000-500 cm^{-1} com a resolução de 4 cm^{-1} (Bhaduri *et al.*, 2013).

3.3.4 Difração de Raios – X

Os difratogramas das AgNPs foram realizados com o objetivo de se determinar a cristalinidade das nanopartículas. As amostras foram analisadas no PAN analytical X-pert pro MRD (Amsterdam, Netherlands). A amostra pura de AgNPs foi colocada em um suporte de vidro de 2,5 cm x 2,5 cm e o espectro foi realizado usando radiação $K\alpha$ do Cu e Ni com potencial negativo de 40 kV e 30 mA. A varredura angular (2θ) foi de 20° a 80° com passo de 0,033° por segundo (Otari *et al*, 2014).

3.3.5 Tamanho de partícula

Uma das modalidades mais utilizadas em se tratando de espalhamento de luz, o “Dynamic light scattering” (DLS), pode sondar a distribuição do tamanho de pequenas partículas na escala submícron até nanométrica, utilizando uma fonte de luz monocromática, muitas vezes utilizando o laser (Sapsford *et al*, 2011). A fonte do laser incide sobre a amostra a ser analisada que por sua vez espalha a luz. O padrão de espalhamento é projetado em um anteparo e a aquisição dos dados obtidos é verificada em função do tempo. As flutuações são analisadas devido ao espalhamento de luz e, desta forma, é possível mensurar a velocidade das partículas em solução. Com tais dados e utilizando a equação de Stokes-Einstein é possível calcular o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas (Lim *et al*, 2013). O aparelho utilizado foi o Nanozetaser da Malvern - Estados Unidos.

3.3.6 Estabilidade das AgNPs

Qualquer partícula em suspensão apresenta um determinado valor, chamado potencial zeta (ζ). Com ele é possível caracterizar se o coloide é ou não estável. A estabilidade total da suspensão depende do seu potencial total, que inclui a soma dos potenciais do solvente, do potencial atrativo e do potencial repulsivo. Para uma suspensão ser considerada estável o potencial repulsivo deve ser maior que o potencial atrativo, não havendo assim os fenômenos de agregação e floculação (Clogston *et al*, 2011).

Ocorre estabilidade das partículas em solução quando o ζ é um número escalar maior que + 30 mV ou menor que -30 mV, do contrário, ocorrerá a aglomeração. O princípio da medida do ζ se dá pelo espalhamento de luz, porém na cela em que se encontra a solução/suspensão contém dois eletrodos em que se aplica uma diferença

de potencial que gera a movimentação das partículas. Com o espalhamento determina-se a velocidade e conhecendo a viscosidade e constante dielétrica pode-se mensurar o ζ . O aparelho utilizado foi o Nanozetasizer da Malvern – Estados Unidos (Doane *et al.*, 2012).

3.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia bem como a microanálise da composição atômica das AgNPs foi realizada em Microscópio de Varredura FEG Quanta 450 ambiental com EDS/EBSD, estágio de resfriamento e aquecimento da Universidade Federal do Ceará (Bhaduri *et al.*, 2013). Essa análise foi realizada na Central Analítica da UFC.

3.4 Creme de AgNP e Miconazol

Foi fabricado 50g de creme piloto com os ativos nas concentrações de 10% de NPAg e 1% de miconazol. Foi usado carbopol como veículo em quantidade suficiente para (q.s.p) para 50g. Apresentou coloração clara, textura agradável sem sinais arenosos (Figura 9).

3.5 Origem das cepas

Foram selecionadas cepas de 50 *Candida parapsilosis* para o experimento. Essas cepas são as mais comumente isoladas de infecções fúngicas no Ceará (Menezes *et al.*, 2011a). As cepas foram isoladas de amostras de sangue entre 2007 e 2013 e fazem parte da Coleção de Leveduras do LML/DACT/FFOE/UFC (Laboratório de Microbiologia de Leveduras da Faculdade de Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará). As cepas estão armazenadas em água destilada e foram inoculadas em ágar batata (Himedia Mumbai-India) e incubadas a 35°C/24-48 h. Em seguida foram semeadas em CHROMagar Candida (Himedia Mumbai-India) para avaliar a pureza. O processo foi realizado três vezes para garantir sua pureza. A identificação foi realizada por micromorfologia em ágar arroz tween 80, fermentação e assimilação de carboidratos (Menezes *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2011; Menezes *et*

al., 2012a; Menezes *et al.*, 2012b; Menezes *et al.*, 2012c; Menezes *et al.*, 2012d; Menezes *et al.*, 2013).

3.6 Agentes antifúngicos

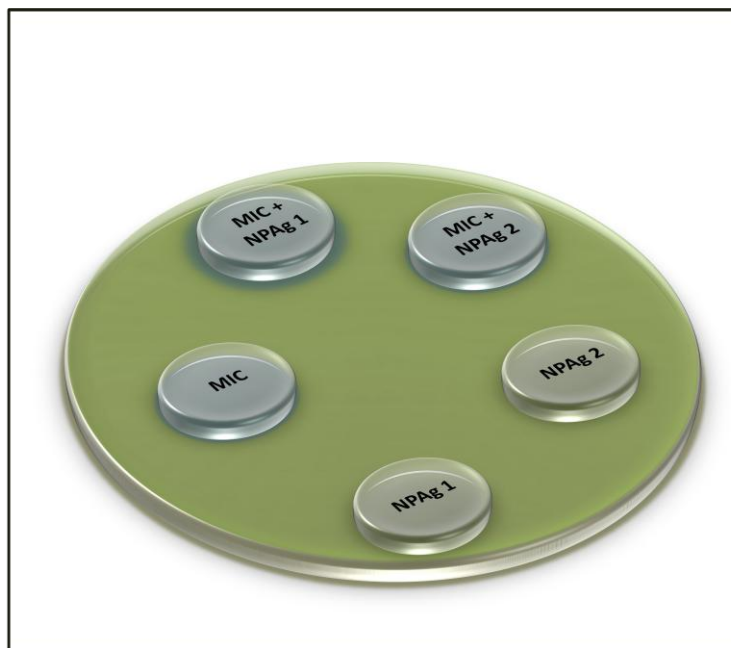
Neste estudo foi avaliado o seguinte agente antifúngico azólico da classe dos imidazólicos: Miconazol (Sigma-USA). O Miconazol foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). Foram produzidos discos de miconazol com 25 µg (Menezes *et al.*, 2012a; Menezes *et al.*, 2013).

3.7 Associação entre Miconazol e AgNPs

O método de avaliação da associação foi o protocolo de disco difusão em ágar Muller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,05% de azul de metileno. Brevemente, em cada placa foram semeadas as cepas e produzidos cinco tipos de discos de 22 mm cada utilizando papel de filtro, o conteúdo de cada disco foi o seguinte **(1)**: 25 µL de solução de miconazol 1 µg/mL, **(2)**: 25 µL de solução NPAg 1, **(3)**: 25 µL de solução NPAg 2, **(4)**: 25 µL de miconazol + 25 µL de NPAg 1 e **(5)**: 25 µL de miconazol + 25 µL de NPAg 2 (Birla *et al.*, 2009).

Após a produção dos discos, estes foram postos em estufa a 35°C por 48 h para garantir a evaporação da água. Os discos foram guardados a -8°C, até o momento do uso, esse tempo sempre foi inferior a 5 dias. As cepas de *C. parapsilosis* de crescimento recente foram colocadas em solução salina e semeadas em meio Muller-Hinton suplementado com glicose e azul de metileno. Sobre essas cepas foram colocados os discos e as placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 h (Menezes *et al.*, 2009). O esquema do protocolo de preparação dos discos foi o seguinte: Inicialmente foi pesado 10 mg de Miconazol e diluído em 10,0 mL de água deionizada, obtendo uma concentração de $C = 1\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Em seguida foi preparado a placa com ágar Muller-Hinton com 2% de glicose e 0,05% de azul de metileno. Depois de suspender as amostras de *C. parapsilosis* em solução salina, essas foram distribuídas nas placas. Em seguida colocados os discos de Miconazol e Miconazol + AgNP e deixadas incubar por 24h a 35°. A Figura 5 representa o protocolo.

Figura 5: Protocolo de avaliação de sinergismo.



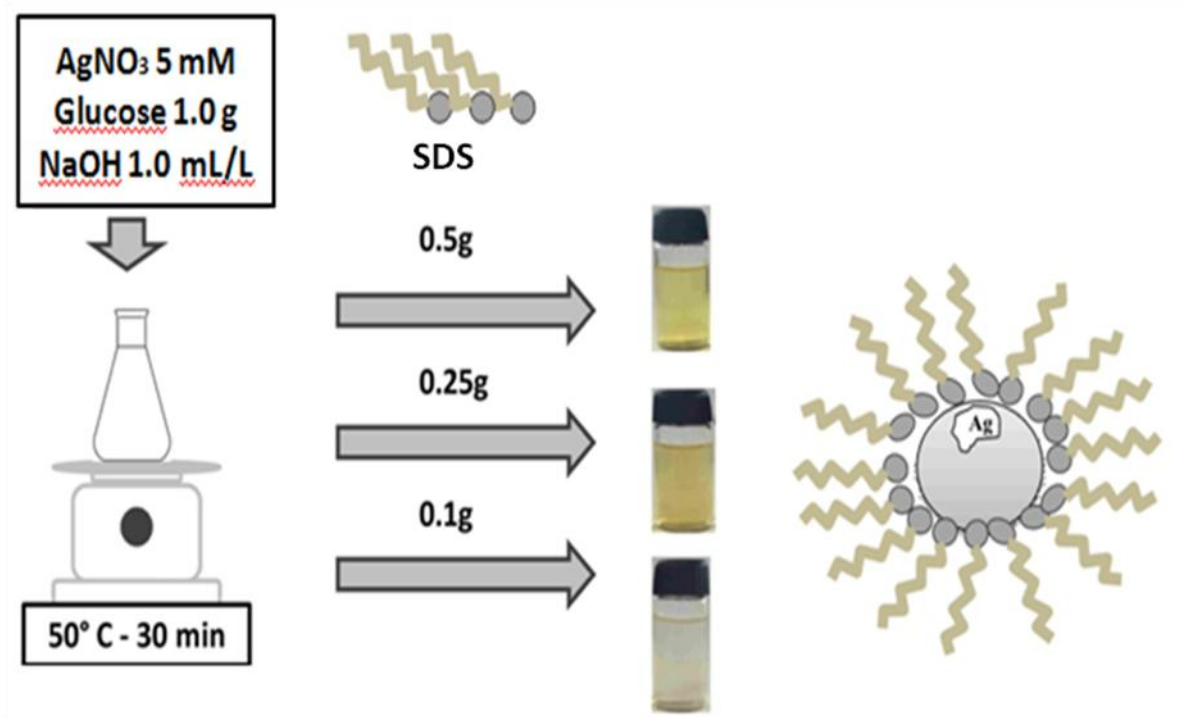
3.8 Interpretação dos resultados

Para calcular a atividade sinérgica do Miconazol com as AgNPs, pode basear-se no cálculo do aumento da área de inibição no ágar utilizando a fórmula $(B^2 - A^2) / A^2$ em que A e B são as zonas de inibição do Miconazol sozinho e associado à AgNPs, respectivamente. Na ausência do crescimento fúngico o tamanho do disco utilizado (22 mm) foi usado para calcular o aumento da área, quaisquer acréscimo na área calculada foi considerada com sinergismo, sem alteração foi caracterizado como indiferente e a redução foi caracterizada como antagonismo entre os componentes (Birla *et al.*, 2009; Fayaz *et al.*, 2010; Gajbhiye *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2012c Thomas *et al.*, 2014).

3.9 Estocagem da amostra

Depois de utilizadas, todas as amostras foram guardadas novamente em água destilada e estão sob a responsabilidade do Laboratório de Microbiologia de Leveduras.

Figura 6: Protocolo da síntese e aspecto morfológico das soluções de AgNPs.



4. RESULTADOS

Vários produtos já foram testados contra infecções causadas por espécies do gênero *Candida*. Tais produtos têm origens variadas como síntese química, produtos naturais, dentre outros. Essa procura por novas opções terapêuticas se dá principalmente devido ao ínfimo arsenal terapêutico da atualidade. Uma alternativa que se mostra bastante promissora são as AgNPs, que tem se mostrado com bons efeitos antifúngicos (Birla *et al*, 2009).

A síntese das AgNPs nesse trabalho envolveu a redução de íons de prata através do açúcar glicose, sendo estabilizadas com o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS). O NaOH foi utilizado como um acelerador da reação. O mesmo atua na abertura da molécula do açúcar com a sua consecutiva oxidação (Wang *et al*, 2005). De forma geral, temos a seguinte reação de formação das AgNPs (Figura 7):

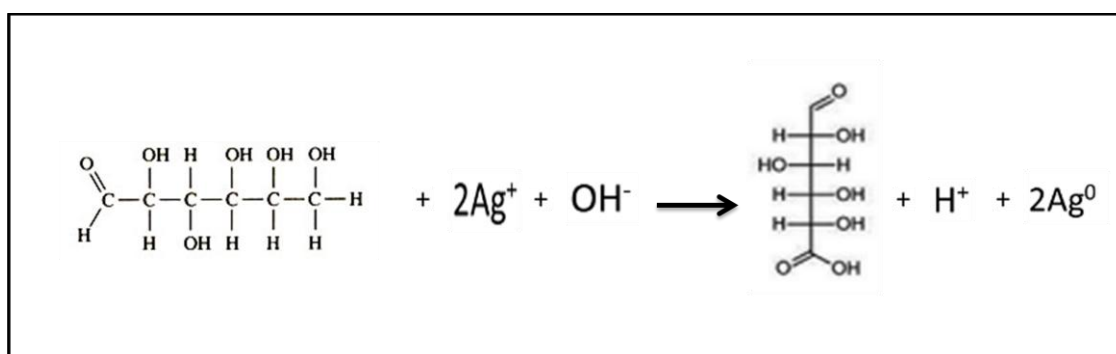


Figura 7: Reação geral de formação.

Como já falado, o NaOH tem um importante papel na preparação da reação ao abrir a molécula de glicose que podemos evidenciar através da reação seguinte (Figura 8):

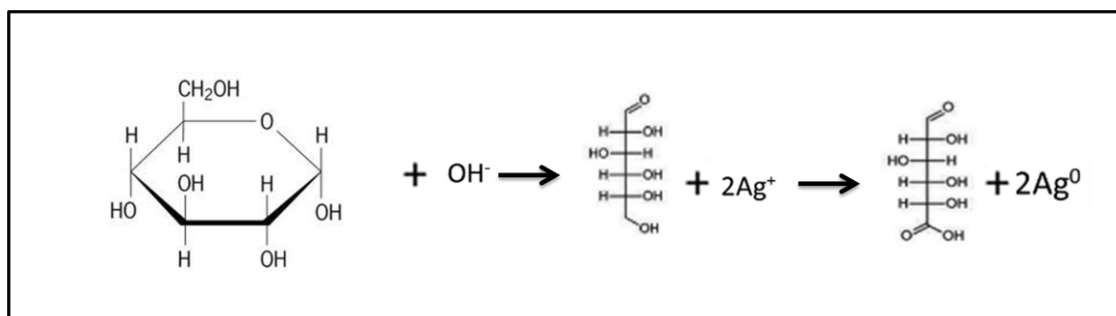
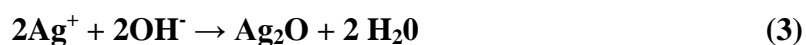
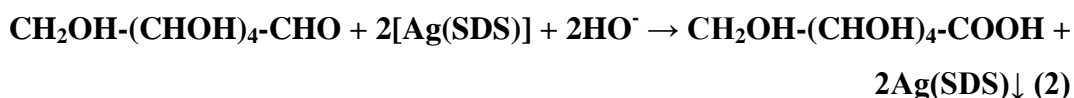


Figura 8: Reação de abertura da molécula de glicose.

A estabilização com o SDS ocorre de maneira simultânea a essas reações, como podemos evidenciar através das reações detalhadas da síntese de AgNPs a seguir:



A glicose é uma cetose e pode reduzir os íons prata a prata metálica através de um processo de oxidação a ácido glucólico. O NaOH levaria ainda a formação de óxido de prata o que facilitaria a sua redução (Darroudi *et al*, 2010).

A redução da prata por açúcares é um tema comum, são diversos os motivos pelos quais se utiliza açúcares, dentre eles temos: os açúcares são baratos, acessíveis e atóxicos. Pelos motivos citados, vários autores descrevem a utilização desses produtos como agentes redutores em reações de produção de AgNPs (Hebeish *et al*, 2015; Mallmann *et al*, 2015; Panigrahi *et al*, 2004; Philip *et al*, 2010).

Os processos que utilizam açúcares são denominados de síntese verde devido à ausência de compostos tóxicos e não formação de produtos tóxicos. No nosso estudo, a síntese foi de maneira rápida, efetiva e de baixo custo. Entretanto, cabe salientar que o nitrato de prata utilizado como fonte de prata apresenta toxicidade quando em contato com a pele, causando um quadro chamado de argiria (tonalidade escurecida de forma temporária) e o NaOH é uma base forte corrosiva, porém utilizamos baixas concentrações. Ainda assim, o processo é considerado verde uma vez que todos os reagentes são praticamente consumidos na reação e não ocorre geração de produtos tóxicos (Kharissova *et al*, 2013).

Após a síntese das AgNPs, há a necessidade de se comprovar a presença das mesmas em suspensão. Para tanto, a caracterização se faz necessária, tanto para se determinar sua existência como para averiguar o modo em que as AgNPs estão

associadas com o produtos que a formaram (agente estabilizante, chamado na literatura de agente de *capping*) (He *et al*,2009).

Uma das técnicas de caracterização de existência de AgNPs é a espectroscopia de absorção ultravioleta/visível (UV-vis). AgNPs são estruturas constituídas por átomos no estado zero de oxidação e em sua superfície existem elétrons que ficam em constante movimentação, gerando um dipolo permanente. Em se tratando de nanopartículas metálicas, as leis de Rayleigh e de Mie regem as propriedades ópticas das AgNPs, pois tais propriedades são basicamente tratadas com base na eletrodinâmica clássica. A teoria quântica também é utilizada para explicar nanopartículas com tamanho inferior a 4 nm. As mudanças de cores que podem ocorrer nas nanopartículas, principalmente as metálicas, podem ocorrer devido a um fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície. Essa ressonância nada mais é do que a excitação coletiva dos elétrons que estão na sua interface. A relação superfície/volume das nanopartículas faz com que o efeito de ressonância plasmônica seja muito sobressalente em nanopartículas metálicas. Essa excitação é gerada quando uma onda eletromagnética incide sobre uma nanopartícula metálica, fazendo sua nuvem eletrônica oscilar, gerando assim uma frequência de oscilação entre o núcleo e a nuvem, respeitando as leis de Coulomb (Zhang *et al*, 2003).

As AgNPs esféricas tem por característica apresentar formação de dipolos. O momento de dipolo induzido é provocado pela movimentação da nuvem eletrônica dentro da partícula na mesma frequência que o comprimento de onda incidente, essa movimentação é gerada devido à interação das ondas eletromagnéticas com a nanopartícula (Noguez *et al*, 207). Cada comprimento de onda produz uma oscilação diferente na nuvem eletrônica, podendo resultar ou não em ressonância. Alguns fatores são determinantes para a faixa espectral de absorção, ou melhor, onde a ressonância ocorre, dentre eles destacam-se: densidade eletrônica, massa efetiva, tamanho e formato da nanopartículas, além de, principalmente, sua interação com o seu estabilizante e o meio em que se encontram (Zhang *et al*, 2008).

O dipolo reage quando atingido por ondas eletromagnéticas, gerando um fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície (RPS). Assim, nanopartículas de prata possuem absorção no UV-vis em torno de 420 nm o que caracteriza sua identidade a partir de sua RPS (Howes *et al*, 2014).

No nosso trabalho foi importante avaliar a variação da quantidade do agente de *capping*, o SDS, na estabilização da AgNPs. Na Figura 9 podemos observar o espectro do UV-vis quando se utilizou 0,5g de SDS, o que gerou uma população de AgNPs de forma monodispersa, evidenciada pelo estreitamento do banda a meia altura e visualizada tal característica no MEV, bem como na análise dos tamanhos uniformes evidenciados via DLS.

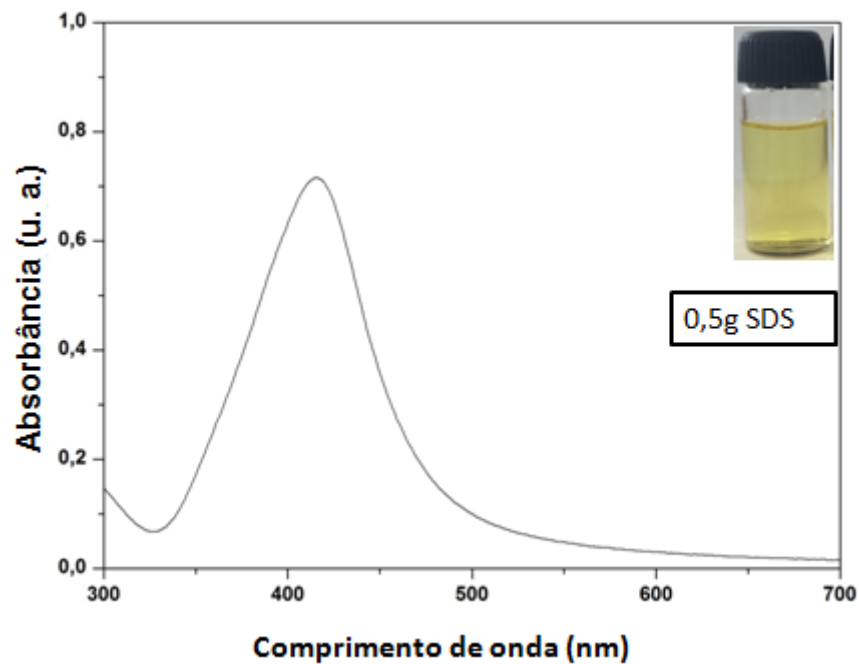


Figura 9: UV-vis de AgNPs com 0,5 g de SDS.

Quando utilizamos uma quantidade de 0,25 g de SDS, observamos que as nanopartículas obtiveram o tamanho da largura a meia altura maior, caracterizando uma população de AgNPs com características polidispersas. Também foi notado que a absorbância, em unidades arbitrárias foi menor, o que indica uma menor produção e estabilização de AgNPs. Pode influir sobre isso que a menor quantidade de SDS foi determinante para menor estabilização das nanopartículas (Liz-Marzán *et al*, 2014). Na Figura 10 representamos o espectro UV-vis das AgNPs produzidas com 0,25 g de SDS.

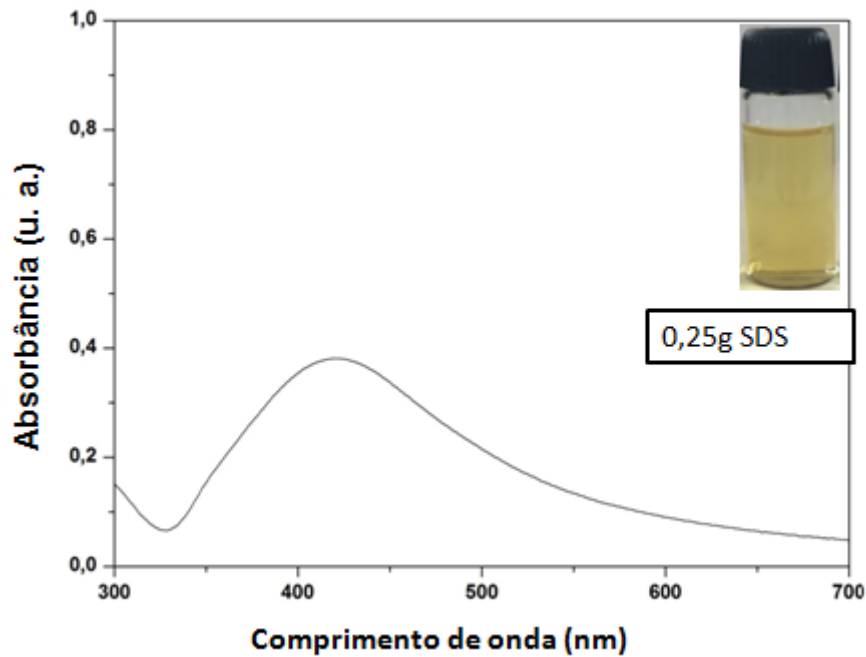


Figura 10: UV-vis da AgNPs com 0,25 g de SDS.

Quando utilizamos uma quantidade de 0,1 g de SDS como estabilizante a solução permaneceu incolor, diferentemente do que aconteceu com as duas outras soluções (0,5g e 0,25g de SDS), que apresentaram uma coloração amarelo-alaranjada, coloração determinante de AgNPs, segundo King *et al*, 2009. Portanto, como esta não apresentou nenhuma banda no UV-vis, não realizamos quaisquer outras técnicas. A seguir UV-vis com 0,1g de SDS.

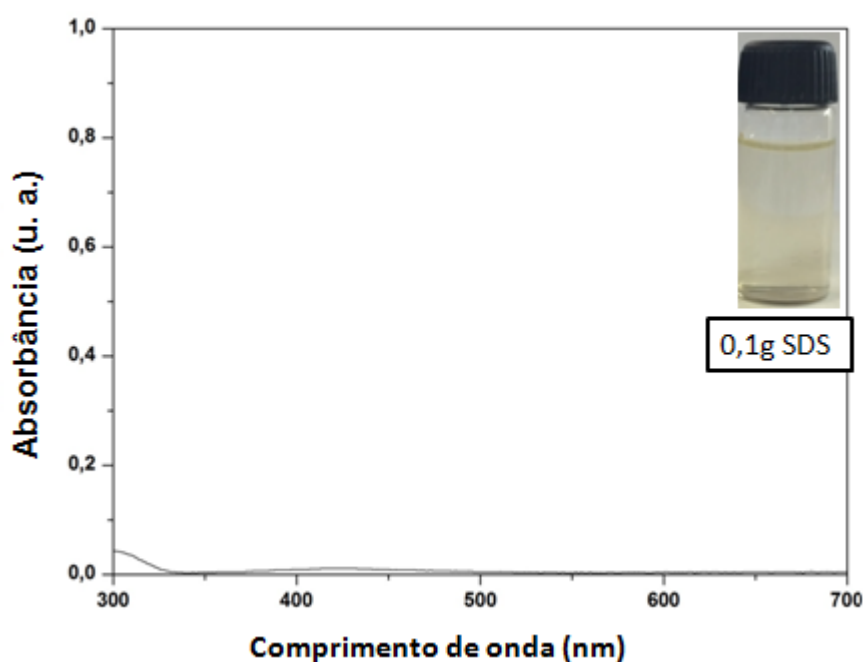


Figura 11: UV-vis das AgNPs g com 0,1 g de SDS.

A técnica do infravermelho avalia a íntima relação entre a AgNPs e o seu agente estabilizante (Figuras 12 e 13). Para nossa amostra foi possível verificar as bandas em 2850 cm^{-1} , 1220 cm^{-1} e 1085 cm^{-1} referentes aos grupamentos ($-\text{CH}_2-$), (SO_4) e (SO_4), respectivamente. Esses picos sugerem o empacotamento da AgNPs com o SDS (Viana *et al*, 2012). A banda em 3330 cm^{-1} é intensa e é referente ao grupamento hidroxila. O grupamento hidroxila pode ser proveniente de duas fontes: dos produtos da oxidação da glicose ou na umidade absorvida (Kumar *et al*, 2012). É interessante salientar que nas duas soluções sintetizadas, com suas respectivas variações nas quantidades de SDS, não houve mudanças em nenhuma das bandas formadas, indicando que o recapeamento foi efetivo nas duas nanopartículas. Isso se deve ao processo de lavagem que foi feito após a síntese.

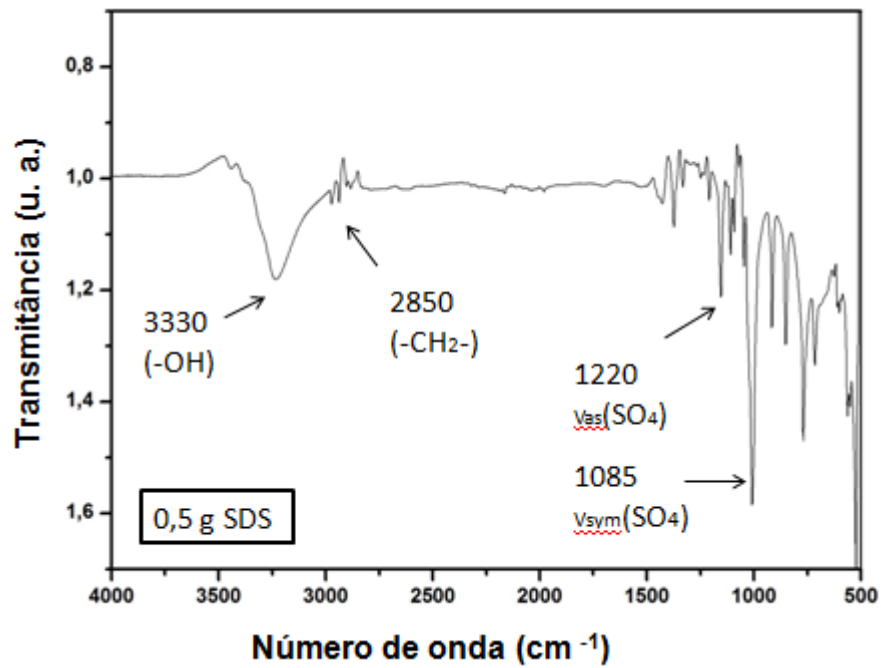


Figura 12: Espectro no infravermelho para AgNPs com 0,5g de SDS.

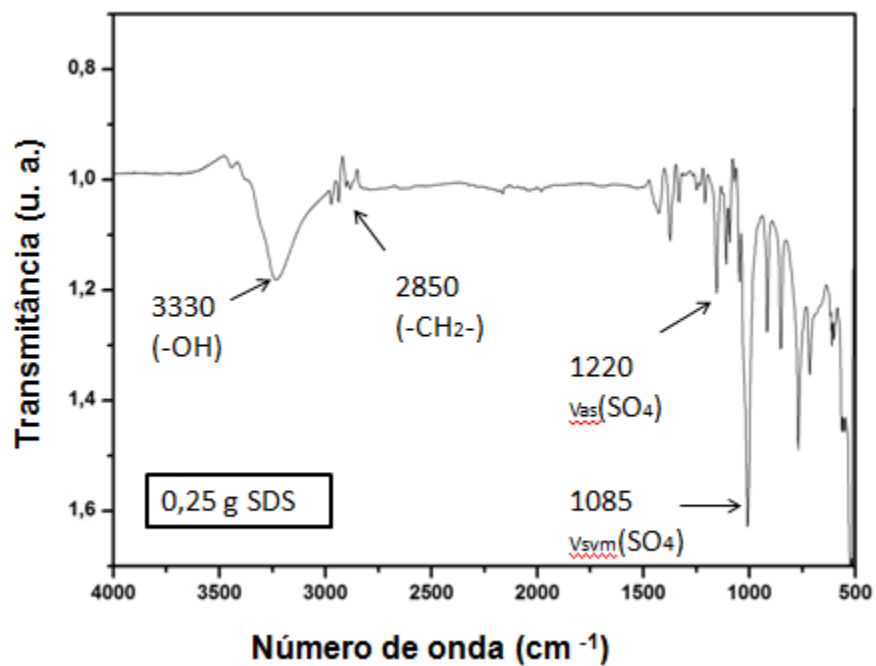


Figura 13: Espectro no infravermelho para AgNPs com 0,25g de SDS.

O tamanho das AgNPs foi estimado pela medida de espalhamento de luz (DLS). Esta fornece a distribuição do tamanho, cabendo salientar que o aparelho capta

apenas sinais de nanopartículas em forma esférica, e também o ζ . O tamanho encontrado para as nanopartículas preparadas com 0,5 g de SDS foi de $77,58 \pm 47,08$ nm (média \pm Desvio padrão) e o índice de polidispersividade (PDI) foi de 0,189, sendo que o número esperado que caracteriza uma população de nanopartículas monodispersas é menor que 0,2. Isso infere que nossa amostra apresentou índice de monodispersividade, o que comprova os resultados já esperados através da análise do UV-vis (Tomaszewska *et al*, 2013). Para as AgNPs produzidas com 0,25 g de SDS foi obtido um tamanho de $91,22 \pm 29,37$ nm (média \pm Desvio padrão) e o PDI foi de 0,225.

A menor quantidade de SDS na solução 2 (0,25g SDS) favoreceu um menor grau de recapeamento da nanopartícula, o que acarretou em crescimento das AgNPs evidenciado pelo DLS e pelo valor de PDI acima de 0,2 (0,225), conferindo a amostra uma característica polidispersa que já havia sido sugerido através do UV-vis quando apresentou um tamanho de meia altura bastante largo (Mehta *et al*, 2010).

A técnica de DLS é uma técnica rápida, com resultados reprodutivos e eficientes. Pode ser utilizada sempre que a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) ou MEV não estão disponíveis. Entretanto, sempre é válido o somatório das técnicas (Tomaszewska *et al*, 2013).

Ressalta-se que para obter uma melhor visualização dos resultados, foram realizadas diluições de 1:10 para a solução produzida com 0,25 g de SDS. A diluição se fez necessária devido ao grau de agregação de nanopartículas que esta solução teve devido a menor estabilidade. As Figuras 14 e 15 representam o tamanho das AgNPs das suspensões 1 e 2, respectivamente.

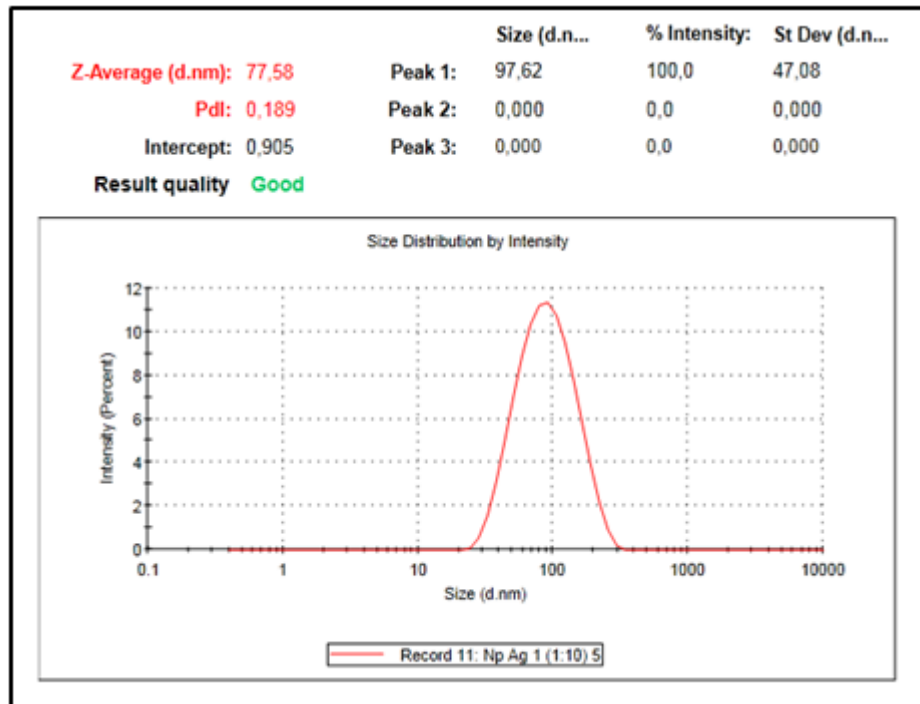


Figura 14: Distribuição de tamanho para AgNPs produzidas com 0,5 g de SDS.

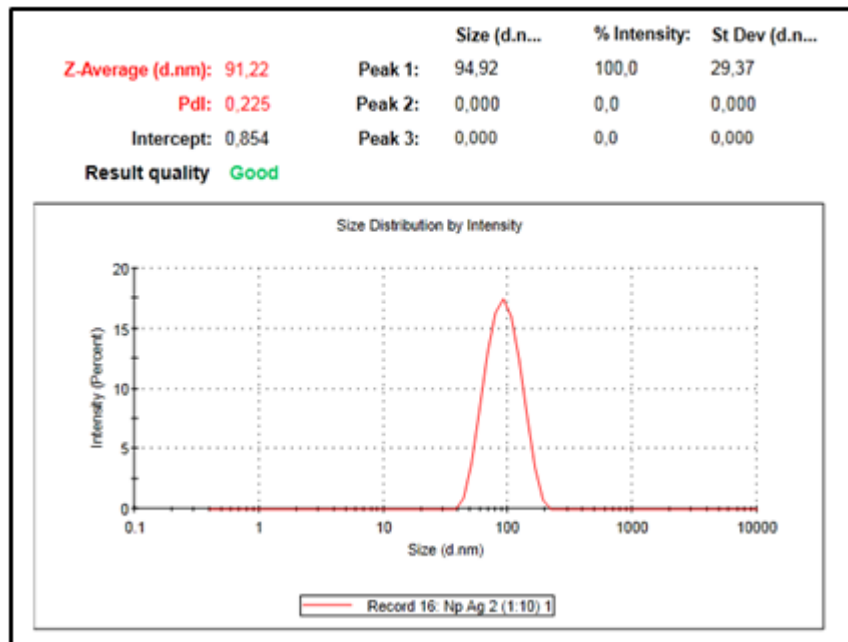


Figura 15: Distribuição de tamanho para AgNPs produzidas com 0,25 g de SDS.

O (ζ) é a medida que fornece a carga na superfície das nanopartículas e quanto é estável a suspensão das mesmas. ζ acima de $\pm 20,0$ mV, em módulo, indica suspensões estáveis (Lin *et al*, 2014). No presente trabalho foi encontrado um valor de ζ de $-49,2$ mV para a AgNPs com 0,5 g de SDS e de $-47,2$ mV para a com 0,25 g de SDS. Esses resultados comprovam a alta estabilidade das nanopartículas sintetizadas. Ressaltando que as amostras permaneceram a temperatura ambiente (25 °C) e que não foram privadas de luz por pelo menos 3 meses antes da análise. As Figuras 16 e 17 representam os valores de ζ para as suspensões 1 e 2, respectivamente.

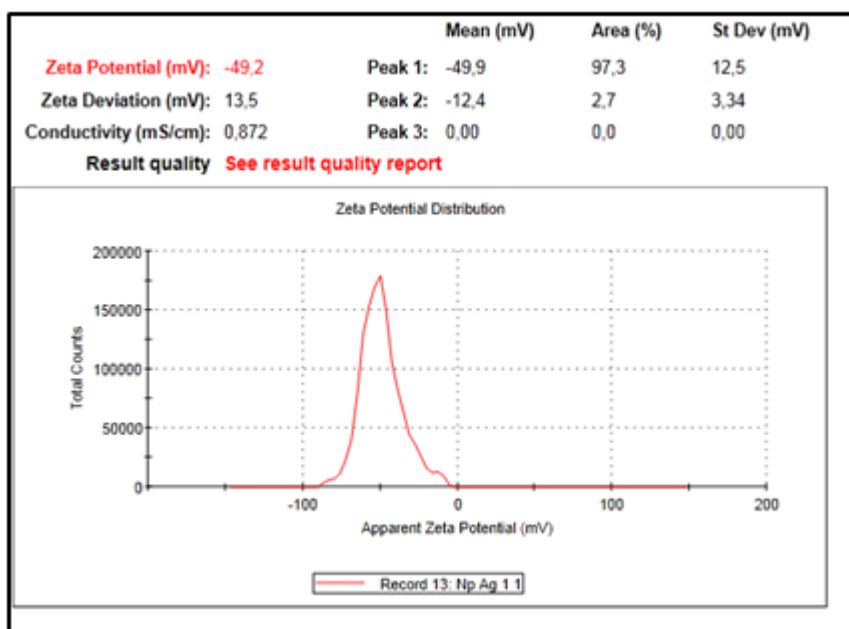


Figura 16: ζ para AgNPs com 0,5 g de SDS.

Foi observado que a diferença entre os valores de ζ para as duas suspensões de AgNPs apresentou valores muito próximos, indicando que a estabilidade das duas suspensões foram excelentes. Assim, a menor quantidade de SDS na suspensão 2 obteve um resultado menor ($-47,2$ mV), mas ainda assim é considerada uma suspensão bastante estável (Gbenou *et al*, 2010).

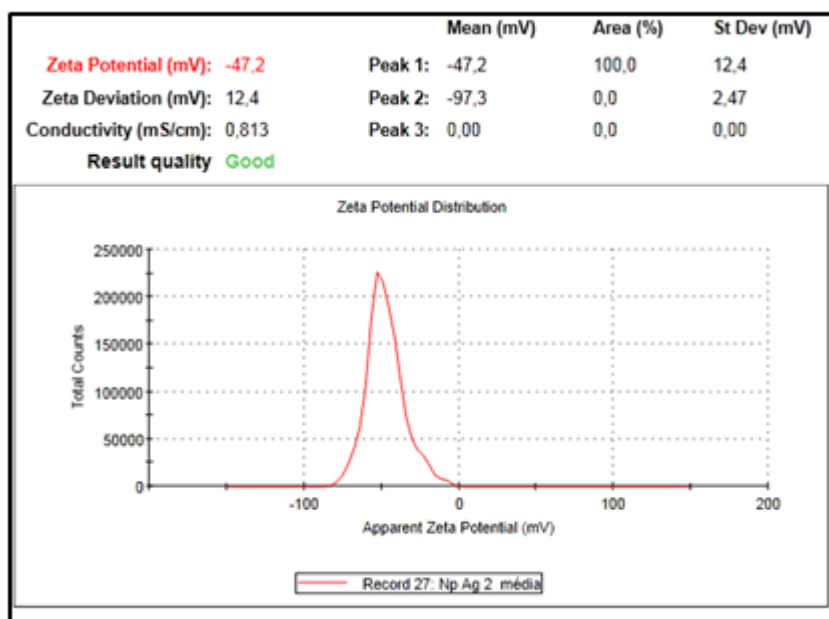


Figura 17: ζ para AgNPs com 0,25 g de SDS.

Uma análise fundamental na caracterização das AgNPs é a difração de raios-X, que infere sobre a estrutura cristalina das AgNPs, bem como sua própria existência. O padrão de raios-X é mostrado na Figura 18. Quatro picos foram identificados $38,2^\circ$, $44,4^\circ$, $64,6^\circ$ e $77,5^\circ$, o que corresponde aos planos do cristal (111), (200), (220), (311) da estrutura cúbica de face centrada apresentada para a prata metálica correspondente ao padrão de difração descrito no Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS-087-0720). Outros picos foram identificados e são correspondentes ao fosfato de prata e ao cloreto de prata. O fosfato e o cloreto são provenientes dos excipientes que foram utilizados para a produção das AgNPs, bem como a glicose e o SDS que apresentam certa quantidade desses materiais em sua composição. Ressalta-se que essa característica não influenciou na atividade microbiológica bem como em outras análises das AgNPs. No difratograma é mostrado o valor observado (em verde) o valor calculado (em vermelho) e a linha base (azul) que é a diferença dos valores observado e calculados. Quanto mais retilínea maior a semelhança entre o que se espera na amostra com o padrão existente (Fayaz *et al*, 2010).

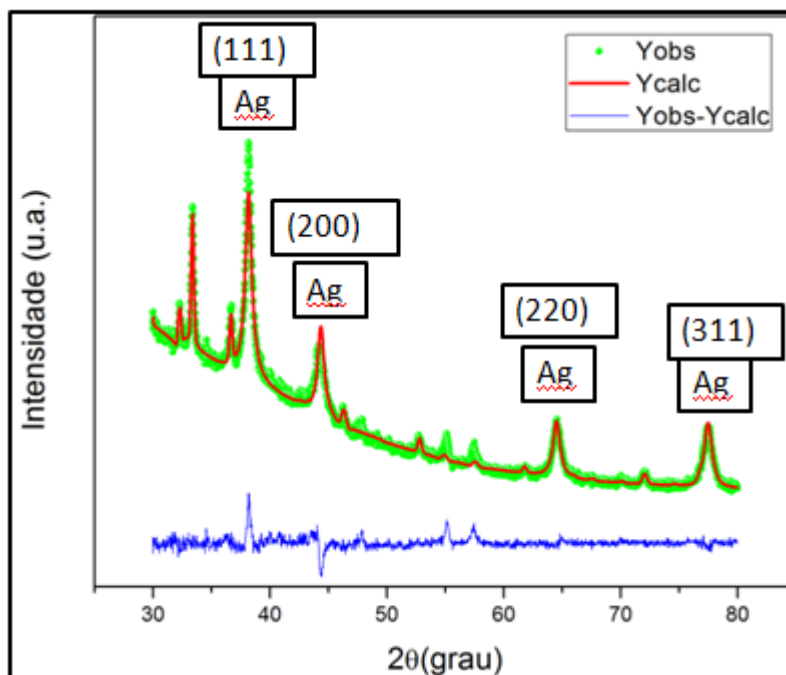


Figura 18: Padrão de difração de raios-X.

Observamos através da técnica do DLS que as nanopartículas sintetizadas possuem tamanho inferior a 100 nm, sendo que estruturas encontradas maiores poderiam ser formadas através da formação de aglomerados durante o processo de síntese das AgNPs (Wang *et al*, 2005). As informações encontradas até aqui informam sobre a interação do estabilizante SDS com a AgNPs, a existência da própria NPAg, de sua carga superficial bem como sua estabilidade. Porém, não é possível ainda inferir nada sobre a sua forma. Tendo em vista o proposto, se faz necessário o uso da técnica de MEV para poder influir sobre a topografia das AgNPs (Lin *et al*, 2014).

Na Figura 19, observamos o MEV das AgNPs sintetizadas com 0,5 g de SDS. Podemos observar que as AgNPs possuem a forma esferoide e que o tamanho médio das populações é semelhante e em torno de 80 nm, como podemos evidenciar na Figura 20 com um aumento de 100000x.

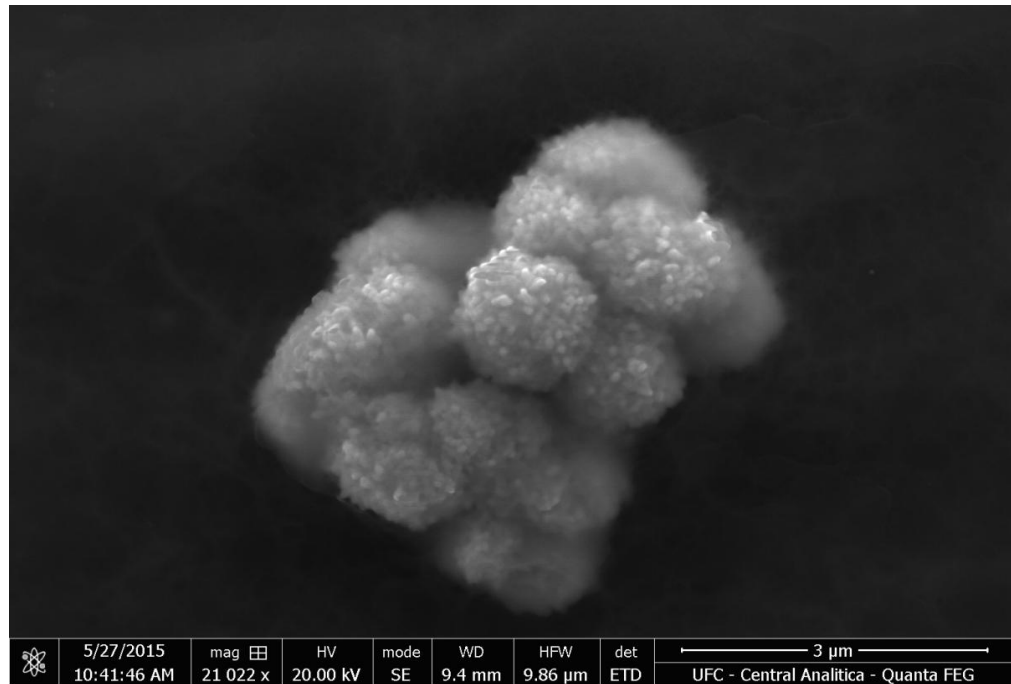


Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura da AgNP com 0,5 g de SDS.

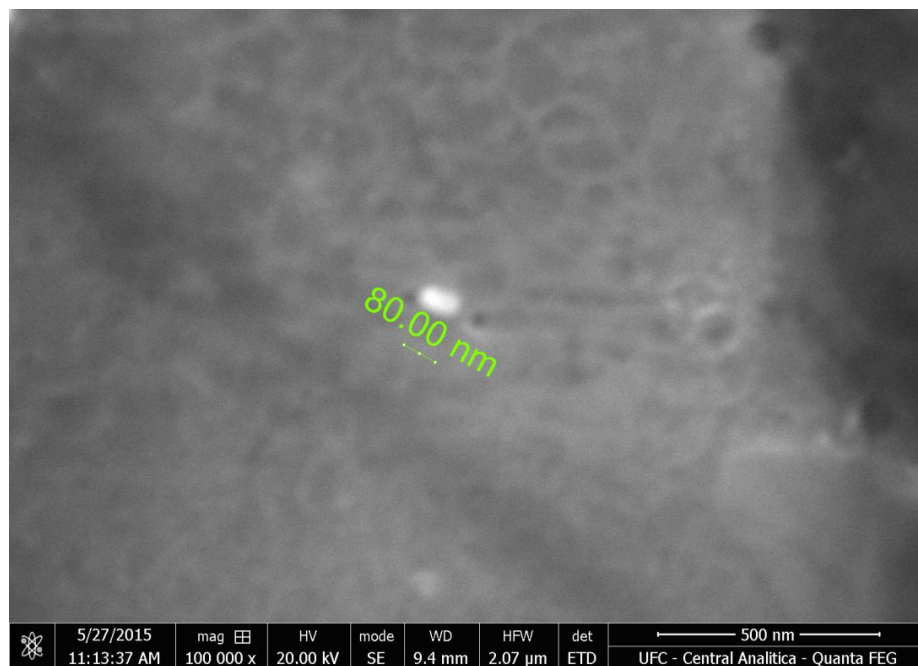


Figura 20: Detalhe do tamanho da AgNP (0,5g SDS).

Na Figura 21 observamos o MEV para as AgNPs sintetizadas com 0,25 g de SDS. Pode ser observado que estas apresentaram um caráter polidisperso em relação às sintetizadas com 0,5 g de SDS. Na Figura 22 evidenciamos a variação maior de tamanho para as AgNPs sintetizadas com 0,25 g de SDS com maior fator de ampliação.

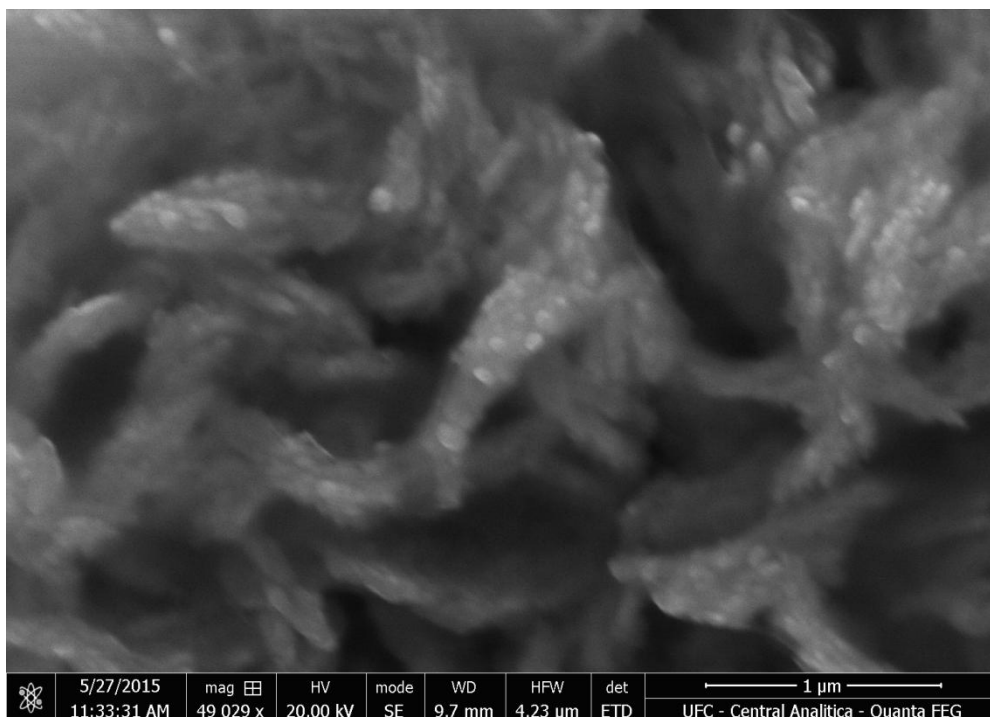


Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura da AgNP com 0,25 g de SDS.

Uma ferramenta importante acoplada ao MEV tem a capacidade de inferir sobre a composição atômica do material a ser analisado. Essa técnica é chamada de microanálise ou EDX, em que podemos observar o componente principal sendo a prata, pois a prata absorve em 3 keV. Os outros elementos encontrados fazem parte dos excipientes existentes nos produtos utilizados. Ressalta-se que não houve qualquer diferença na microanálise das duas AgNPs sintetizadas. O EDX pode ser visualizado na Figura 23.

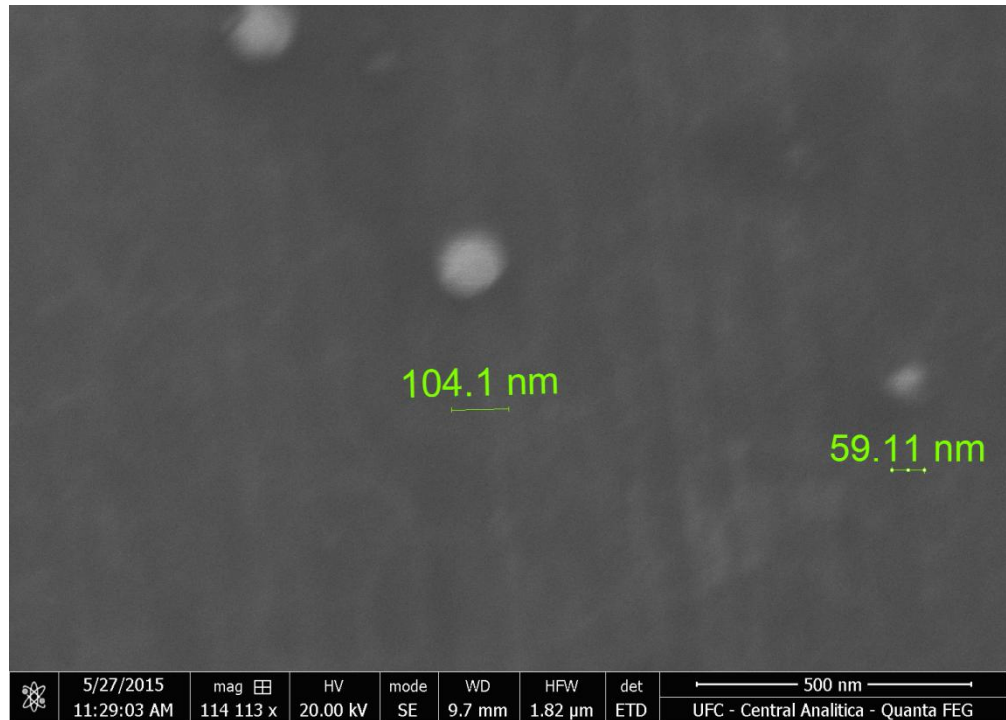


Figura 22: Detalhe do tamanho das AgNPs (0,25g SDS).

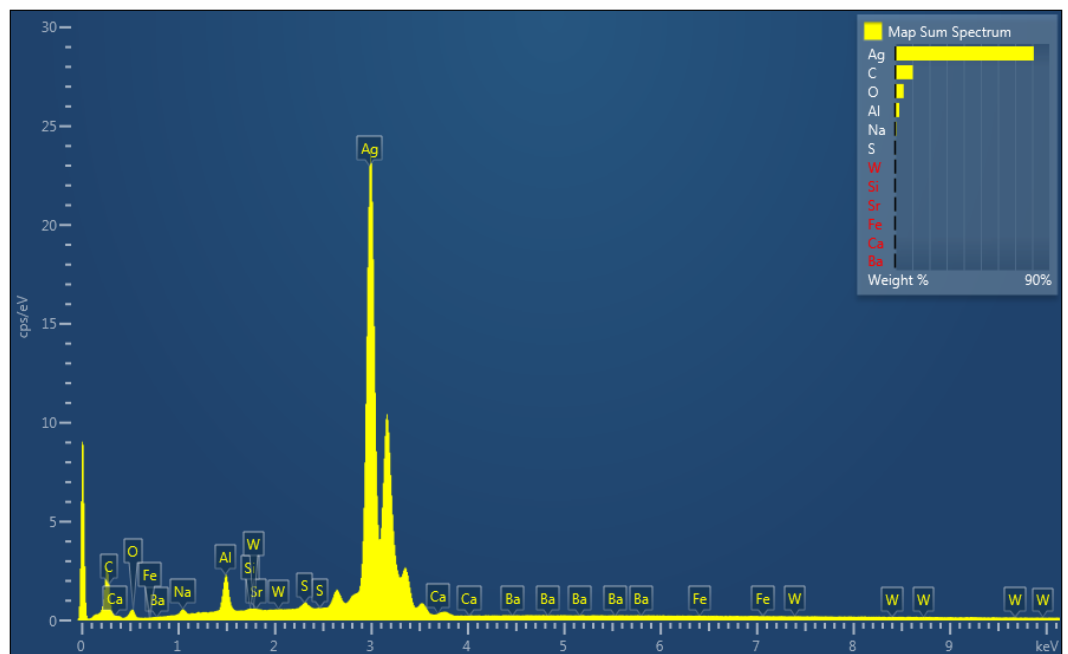


Figura 23: Microanálise das AgNP.

A rotina laboratorial de identificação de *C. parapsilosis* inclui a inoculação dessa cepa em meio não específico e não seletivo, como por exemplo, ágar batata. Na Figura 24 podemos evidenciar a *C. parapsilosis* em ágar batata.

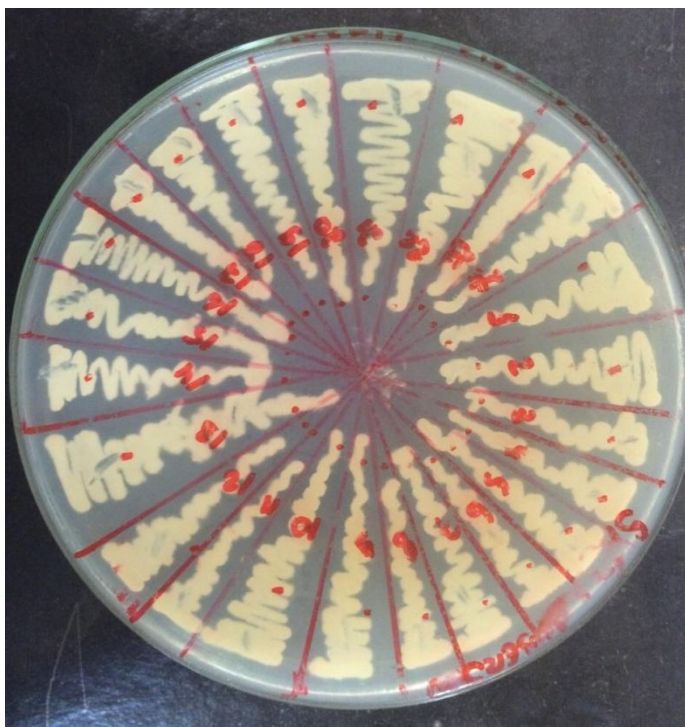


Figura 24: *C. parapsilosis* em meio ágar batata.

A identificação de leveduras do gênero *Candida* é realizada com testes bioquímicos, fenotípicos e moleculares, um método rápido de purificação e identificação presuntiva de *Candida* spp. é a utilização de um meio cromógeno, como mostrado na Figura 25. *C. parapsilosis* aparece nesse meio com uma coloração roxa com o pigmento se difundindo para o meio.

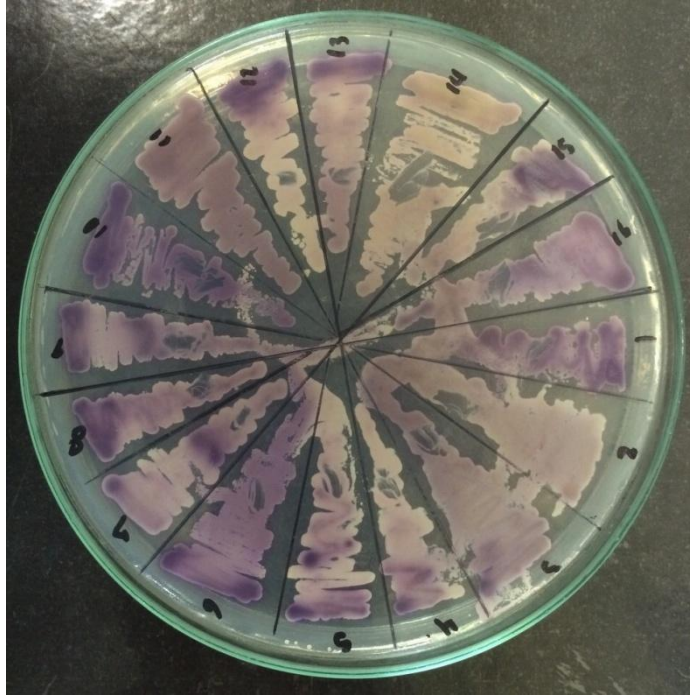


Figura 25: *C. parapsilosis* em meio cromógeno.

Discos de miconazol ainda não foram padronizados e sua venda é realizada por empresas sem autorização, devido a esse fator os discos utilizados no nosso estudo foram produzidos no nosso laboratório e podem ser vistos na Figura 26. Os discos mostrados contém miconazol e AgNPs.



Figura 26: Discos de Miconazol e AgNP.

Foram testadas 50 cepas de *C. parapsilosis*. Como podemos evidenciar na Figura 29 e na Tabela 1 o Miconazol (MIC) e as AgNPs não apresentaram ação sobre o crescimento de *C. parapsilosis* quando usados de forma isolada. Entretanto, ao associarmos as AgNPs ao Miconazol o efeito sinérgico é evidente.

Tabela 1: Perfil de sensibilidade das *C. parapsilosis* às AgNPs.

Placa	Solução 1	Solução 2	Miconazol	NPAg 1 + Mic	NPAg 2 + Mic
1	0	0	33	35	33
2	0	0	27,4	29,7	28,8
3	0	0	22	22	22
4	0	0	22	22	22
5	0	0	32,5	34,9	31,8
6	0	0	32,7	37,5	37,2
7	0	0	36	40	27,7
8	0	0	32,1	36,7	31,3
9	0	0	31,1	32,9	28,9
10	0	0	27,7	45,5	28,1
11	0	0	23,8	40,8	36,2
12	0	0	31,4	51	35,4
13	0	0	31,5	51,6	34,8
14	0	0	31,8	49,2	38,1
15	0	0	27,2	34,1	49
16	0	0	22	40,2	30,4

17	0	0	27,5	46,4	28,2
18	0	0	36	52,6	31,3
19	0	0	22	34,8	33
20	0	0	22	22	31,5
21	0	0	25	58	30
22	0	0	24	56,4	28
23	0	0	36,2	57,5	38,2
24	0	0	22	26	22
25	0	0	22	28	25
26	0	0	33,9	35,4	34,5
27	0	0	42,3	43,3	43
28	0	0	36	36,3	36,1
29	0	0	20	22	22,2
30	0	0	32,3	33,2	33,1

Legenda: MIC: Miconazol disco com 25 μg ; MIC + NPAG: Miconazol (25 μg) + NPAG (25 μL). O diâmetro dos discos utilizados (22 mm) não foram levados em consideração. Os testes foram realizados em três repetições e os desvios padrões foram negligenciados. Quando se avalia o sinergismo entre drogas através do método do disco de difusão, utiliza-se o aumento da área como indicador de ação sinérgica. O aumento da área foi considerado como ação sinérgica e pode ser evidenciado na Figura 27a. Na Figura 29 o efeito sinérgico pode ser observado em detalhes pela medida do halo com paquímetro digital.

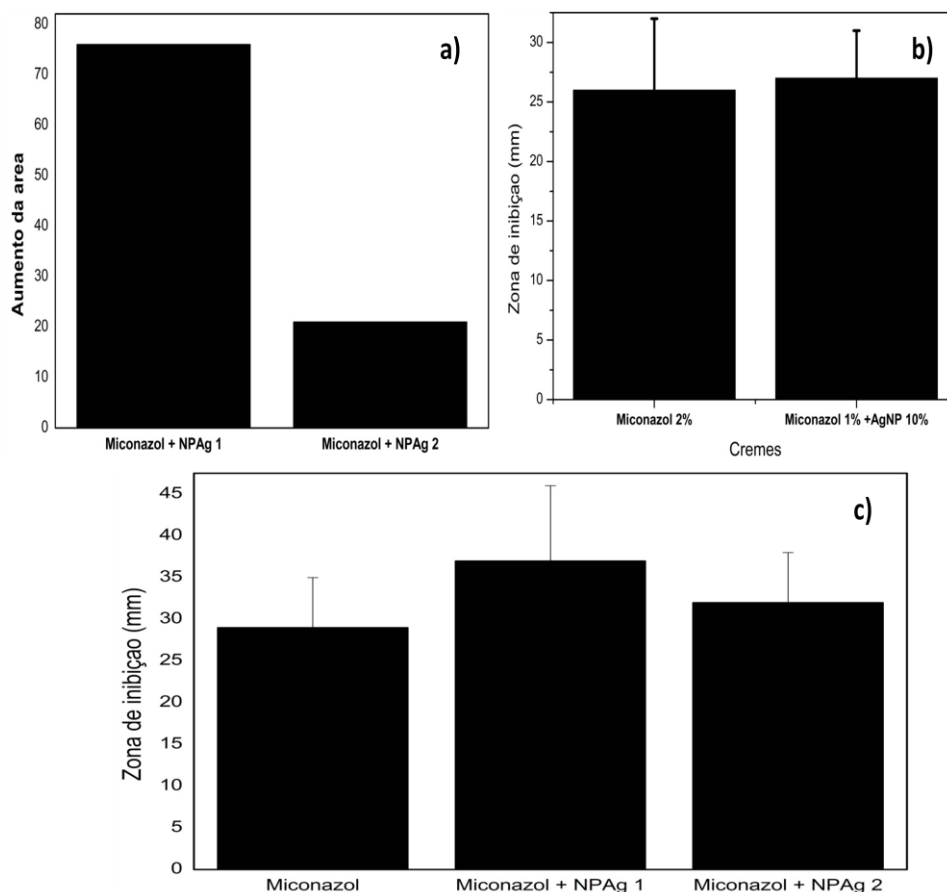


Figura 27: a) Comparação do aumento de inibição das duas soluções de AgNPs; b) Comparação do aumento de inibição do creme produzido com creme com registro no mercado; c) zonas de inibição do miconazol isolado, miconazol + AgNPs 1 e miconazol + AgNPs 2.

O aumento da área foi calculado pela fórmula $(B^2 - A^2)/A^2$, em que A e B são as zonas de inibição do Miconazol sozinho e do Miconazol associado à AgNPs, respectivamente. Na ausência de crescimento fúngico, o tamanho do disco (22 mm) foi usado para calcular o tamanho da área (Birla *et al*, 2009; Fayaz *et al*, 2010).

Na Figura 27a pode-se evidenciar esse aumento. Na Figura 27c podemos observar o tamanho dos halos em função dos três produtos, Miconazol, Miconazol + AgNPs 1 e Miconazol + AgNPs 2, respectivamente. Como os resultados do Miconazol + AgNPs 1 foram mais expressivos em se tratando de aumento de inibição, foi fabricado a partir deste um creme para avaliar o efeito antimicrobiano. O creme produzido foi comparado com um creme registrado no mercado de Miconazol a 2%, mostrando ser muito satisfatório, pois houve aumento do halo de inibição quando comparamos o creme sintetizado com um creme já comercializado. Além disso, apesar

da coloração escura das AgNPs, o creme teve aparência clara o que o torna aceitável para comercialização. Apesar de outros estudos serem necessários, podemos afirmar que o creme sintetizado demonstra ser bastante promissor devido seu efeito evidente e sua alta estabilidade. Na Figura 28 podemos evidenciar o efeito antifúngico do creme sobre *Candida parapsilosis*.

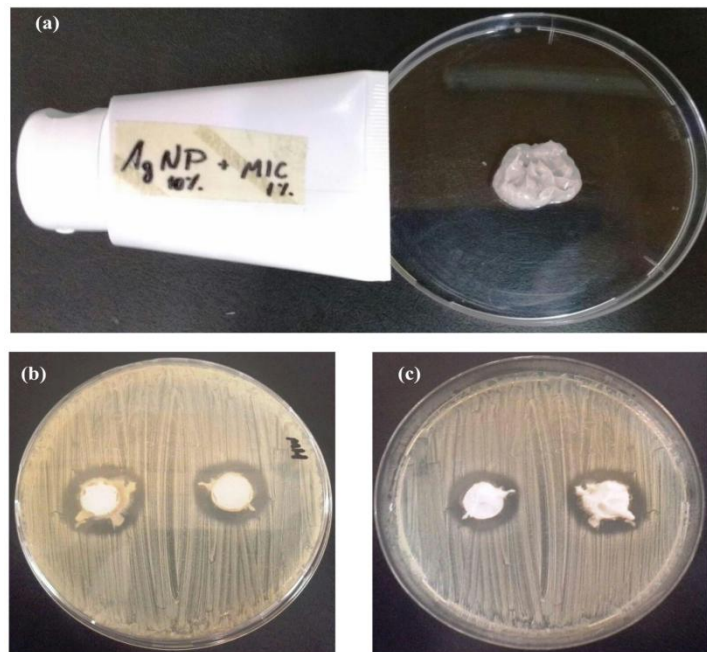


Figura 28: a) Composição dos ativos do creme. b) Vista posterior da placa de petri. c) Vista anterior da placa de petri.

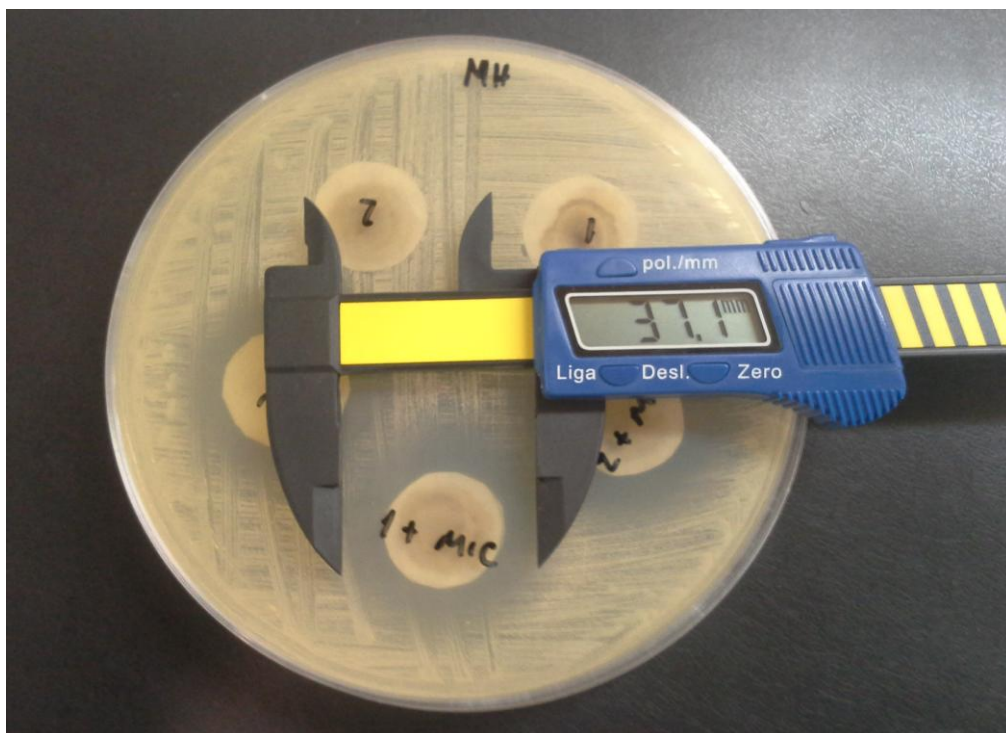


Figura 29: Detalhe do efeito sinérgico entre Miconazol e NPAg.

A busca por novas substâncias com ação antifúngicas são constantes e os efeitos antimicrobianos dos sais de prata são conhecidos desde tempos imemoriais. Muitos estudos tem destacado o papel antimicrobiano das AgNPs, com um mecanismo ainda não totalmente compreendido, os achados são bastante promissores (Ishida *et al*, 2013; Hwang *et al*, 2012).

A importância da *C. parapsilosis* é inegável em infecções sistêmicas, a identificação laboratorial dessa levedura é cada vez mais comum em laboratórios ao redor do mundo (Guinea *et al*, 2014; Kazak *et al*, 2014). A identificação de leveduras do gênero *Candida* em meios como o mostrado na Figura 25 é uma tarefa árdua e que se configura extremamente difícil e até mesmo impossível (Menezes *et al*, 2012). Para se resolver esses problemas na rotina laboratorial dispomos de diversas ferramentas, dentre elas o uso da Biologia Molecular (Menezes *et al*, 2012). No entanto, nem sempre é possível recorrer a essa técnica quando isso não é possível o meio cromógeno é uma alternativa mais barata e de excelentes resultados (Menezes *et al*, 2009b). Na Figuras 25 temos as cepas de *C. parapsilosis* em meio cromógeno. O meio cromógeno é rápido e permite uma identificação segura e não exige grandes investimentos em infraestrutura laboratorial, como a Biologia Molecular, que além da

infraestrutura exige pessoal altamente treinado (Menezes *et al*, 2011). No nosso estudo foi possível identificar todas as cepas de *C. parapsilosis*, essas leveduras aparecem com uma coloração azul que se difunde para o meio de cultura que pode ser visto em detalhes na Figura 25.

Os testes de sensibilidade foram realizados pelo método de disco difusão em ágar, um método clássico com bons resultados (Menezes *et al*, 2011). O grande problema dessa metodologia é que os discos têm que ser fabricados e essa etapa consome tempo e precisa ser realizado por pessoal treinado, pois envolve diversos passos e diluições sucessivas das drogas em estudo. No nosso estudo usamos discos com 25 µL de miconazol e 25 µL de AgNPs. Os discos são mostrados na Figura 26.

Estudos sugerem que AgNPs podem exercer atividade antifúngica pela ruptura da estrutura da membrana celular e inibir o processo normal de divisão celular levando a destruição da integridade da membrana de células leveduriformes (Kim *et al*, 2009). Observamos em nosso estudo que AgNPs sozinhas e o miconazol sozinho não inibiram o crescimento fúngico, isso deve-se ao fato de que as concentrações estão abaixo da concentração inibitória mínima (MIC), no entanto quando juntamos o miconazol com NPAg percebemos o claro efeito sinérgico (Figura 29).

A atividade sinérgica das AgNPs é melhor observado na Figura 27a, na qual percebemos um aumento da área em torno dos discos que continham miconazol e AgNPs. O aumento da área é uma das variáveis mais utilizadas quando comparamos a ação sinérgica de fármacos e outras substâncias quando usamos a metodologia dos discos (Gajbhiye *et al*, 2009; Panacek *et al*, 2009; Shahverdi *et al*, 2007; Thomas *et al*, 2014).

Em estudo analisando o efeito sinérgico de fluconazol e AgNPs, foi observado que a ação sinérgica foi verificada nos cinco fungos testados, sendo o efeito maior observado em *C. albicans* com um aumento de 3,69 na área do disco (Gajbhiye *et al*, 2009). No nosso estudo testamos 50 cepas de *C. parapsilosis* e o aumento da área para miconazol e AgNPs ocorreu todas as cepas testadas sendo que contra uma das cepas a área atingiu 6,638, correspondendo a um aumento de mais de 600% do efeito antifúngico, o que pode representar um efeito avassalador contra uma infecção fúngica (Figura 27).

A atividade das AgNPs contra *Candida* spp está bem documentada, mas os relatos de ações sinérgicas ainda são escassos (Gajbhiye *et al*, 2009; Panacek *et al*, 2009; Thomas *et al*, 2014). Realizamos a avaliação da ação sinérgica do miconazol e de AgNPs, em nenhum outro estudo essa associação tinha sido testada, contra um número elevado de cepas.

Como não ocorreu atividade nos discos contendo somente miconazol ou AgNPs o que demonstra que aumento da área pode ser interpretado como sinergismo. Este trabalho ajuda a esclarecer dúvidas sobre o potencial dessas associações bem como abre porta para novas formulações farmacêuticas tendo em vista o vasto surgimento de microorganismos resistentes às drogas já existentes.

5 CONCLUSÕES

As AgNPs via “química verde” foram sintetizadas com sucesso por uma rota “verde” e sem a geração de produtos tóxicos para o meio ambiente. Estas foram caracterizadas através do UV-vis, Infravermelho com transformada de Fourier, Difração de Raios-X, DLS, ζ , MEV e EDX.

As nanopartículas sintetizadas com 0,5 e 0,25g de SDS apresentaram-se monodispersas e bastante estáveis.

Conseguiu-se isolar 50 cepas de *Candida parapsilosis* de pacientes com infecção fúngica. Com esse material foi realizada uma análise da ação antifúngica do Miconazol isolado, bem como das AgNPs, assim como da associação dos dois em que foi observado uma evidente e promissora ação sinérgica dessa formulação.

Ao fim do trabalho foi desenvolvido um creme com os ativos de AgNPs de 10% e Miconazol 1%, evidenciando seu efeito sinérgico ao ser comparado com um creme já comercializado.

6 REFERÊNCIAS

Ajitha B., *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using *Plectranthus amboinicus* leaf extract and its antimicrobial activity. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc* **128**: 257–62. 2014.

Arvizo *et al.* Identifying new therapeutic targets via modulation of protein corona formation by engineered nanoparticles. *Plos One*, 2012.

Asharani *et al.* DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles. *Future Medicine*. v. 5, p. 51-54, 2010.

Astruc *et al.* Nanoparticles as recyclable catalysis: the frontier between homogeneous and heterogeneous catalysis. *V. 44*, p. 7852-7872, 2005.

Berdal J.E., *et al.* Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a Norwegian secondary hospital. *PLoS One* **9**: e103916. 2014.

Bhaduri G., *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using sunlight. *J. Photochem. Photobiol. A Chem* **258**: 1–9. 2013.

Birla S.S., *et al.* Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol* **48**: 173–9. 2009.

Cao, G.; Wang, Y. *Nanostructures and nanomaterials: Synthesis, properties, and applications*. 2ed. Singapore: World Scientific Publishing Co. 2011.

Carlson *et al.* Cytotoxicity and Genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line A549. *Archives of Toxicology*. v. 85, p. 743-750, 2011.

Cheng K., *et al.* Green synthesis of chondroitin sulfate-capped silver nanoparticles: Characterization and surface modification. *Carbohydr. Polym* **110**: 195–202. 2014.

Chou *et al.* Transition-metal phosphors with cyclometalating ligands: fundamentals and applications. *Chemical Soc. V. 39*, p. 638-655, 2010.

Colombo A.L., *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol* **44**: 2816–23. 2006.

Colombo A.L., *et al.* Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect. Control Hosp. Epidemiol* **28**: 570–6. 2007.

Corzo-Leon D.E., *et al.* Surveillance of *Candida* spp bloodstream infections: epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals. *PLoS One* **9**: e97325. 2014.

Costa V.G., *et al.* Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. *Mycopathologia* **178**: 243–50. 2014.

Dahl *et al.* Mechanobiology and the microcirculation: cellular, nuclear and fluid mechanics. *Microcirculation*, V. 17, p. 179-191, 2010.

Darroudi M., *et al.* Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **6**: 569–74. 2011.

Dias M.F.R.G., *et al.* Treatment of superficial mycoses: review. Part II. *An. Bras. Dermatol* **88**: 937–44. 2013.

Doane T.L., *et al.* Nanoparticle ζ -potentials. *Acc. Chem. Res.* **45**: 317–26. 2012.

Dykman e Khlebtson. Point defects in double helix induced by interaction of silver nanoparticles with DNA. *Physics*. arXiv: 1206.4816, 2012.

Fayaz A.M., *et al.* Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* **6**: 103–9. 2010.

Frattini *et al.* Ra isotopes in trees: their applications to the estimation of heartwood growth rates and tree age. *Global Biogeochemical Cycles*, V. 20, p.4-10, 2009.

Gajbhiye M., *et al.* Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *J. Pharm. Sci* **103**: 1931–44. 2014.

Gbenou, J. D.; Ahounou, J. F.; Akakpo, H. B.; Laleye, A.; Yayi, E.; Gbaguidi, F.; Baba-Moussa, L.; Darboux, R.; Dansou, P.; Moudachirou, M.; Kotchoni, S. O. *Mol. Biol. Rep.* **2013**, *40*, 1127–1134.

Ghosh I.N., *et al.* Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: a case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. *Int. J. Nanomedicine* **8**: 4721–31. 2013.

Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin. Microbiol. Infect* **20 Suppl 6**: 5–10. 2014.

Guzmán M.G., *et al.* Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Int. J. Chem. Biomol. Eng* **23**: 104–111. 2009.

He D., *et al.* Effects of aggregate structure on the dissolution kinetics of citrate-stabilized silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol* **47**: 9148–56. 2013.

Hervés, P. Pérez-Lorenzo M. Liz-Marzán, LM. Dzubielia, J. Yan L. Ballauff M. Catalysis by metallic nanoparticles in aqueous solution: model reactions. *Chem. Soc. Rev* **41**, 5577–5587. 2012. Howes PD, Rana S, Stevens MM. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. *Chem. Soc. Rev* **43**:3835–53. 2014.

Hulkoti *et al.* Biosynthesis of nanoparticles using microbes - a review. *Colloids and surface B: Biointerfaces*. V.121, p. 474-483, 2014.

Hwang I., *et al.* Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J. Med. Microbiol* **61**: 1719–26. 2012.

Ishida K., *et al.* Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **109**: 220–228. 2013.

Jans e Huo. Gold nanoparticles - enabled biological and chemical detection and analysis. *Chem. Soc. Rev.* v. 41, p. 2849-2866, 2012.

Jha RK, Jha PK, Chaudhury K, Rana SVS, Guha SK. An emerging interface between life science and nanotechnology: present status and prospects of reproductive healthcare aided by nano-biotechnology. *Nano Rev* 5:1–19. 2014.

Kamikawa Y., *et al.* In Vitro Antifungal Activity against Oral *Candida* Species Using a Denture Base Coated with Silver Nanoparticles. *J. Nanomater* 2014: 1–6. 2014.

Kazak E., *et al.* An investigation of *Candida* species isolated from blood cultures during 17 years in a university hospital. *Mycoses* 57, 623–9.2014.

Kim K.-J., *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals* 22: 235–42. 2009.

Kumar *et al.* Silver glyconanoparticles functionalized with sugars of sweet sorghum syrup as an antimicrobial agent. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1488 - 1495. 2012.

Li S., *et al.* Triple helical polysaccharide-induced good dispersion of silver nanoparticles in water. *Biomacromolecules* 12: 2864–71. 2011.

Li Z., *et al.* Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Gerodontology* 1–8. 2014.

Lin *et al.* Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology*. V. 32, p. 711-726, 2014.

Liz-Marzán L.M. Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir* 22: 32–41. 2006.

Lockhart S.R. Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clin. Microbiol. Newsl* 36:131–136. 2014.

Marambio *et al.* A review of the antibacterial effects of silver nanoparticles and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticles Research*. v. 12, p.1531-1551, 2010.

Menezes E.A., *et al.* Resistência antifúngica de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 42: 354–355. 2009a.

Menezes E.A., *et al.* Identificação preliminar de algumas espécies do gênero *Candida* ssp. em meio cromógeno: resultados de dois anos de um estudo multicêntrico realizado no Ceará. *Rev. Patol. Trop* **40**: 297–303. 2009b.

Menezes E.A., *et al.* Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil. *J. Bras Patol Med Lab* **48**: 415–420. 2012a.

Menezes E.A., *et al.* Isolation and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* in Ceará, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **54**: 1–3. 2012b.

Menezes E.A., *et al.* *In vitro* synergism of simvastatin and fluconazole against *Candida* species. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **54**: 197–199. 2012c.

Menezes E.A., *et al.* Perfil de suscetibilidade de *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos. *Rev. Patol. Trop* **42**: 49–55. 2013.

Mehta *et al.* Time dependence on nucleation and growth of silver nanoparticles generated by sugar reduction in micellar media. *Journal Colloid interface Science*. v. 343. p. 447-453. 2010.

Mishra M., *et al.* Profile of yeasts isolated from urinary tracts of catheterized patients. *J. Clin. Diagn. Res* **8**: 44–6. 2014.

Mohan S., *et al.* Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties. *Carbohydr. Polym* **106**: 469–74. 2014.

Monteiro D.R., *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Mycoses* **56**: 672–80. 2013.

Mulvaney *et al.* Polymer - coated nanoparticles: A universal tool for biolabelling experiments. *Small*. V. 7, p. 3113-3127, 2011.

Muller *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chemical Review*. v. 108, p. 2064-2110, 2008.

Mu *et al.* Mechanism of growth of colloidal silver nanoparticles stabilized by polyvinyl pyrrolidone in gama-irradiated silver nitrate solution. *Journal of Colloid and Interface Science*. v. 274, p. 89-94, 2004.

Negri M., *et al.* Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **31**: 1399–412. 2012.

Nel *et al.* Air pollution - related: effects of particles. *Science*. v. 308, p. 804-806, 2005.

Neto J.B.A., *et al.* Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds *in vitro* against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. *PLoS One* **9**: e93698. 2014.

Noguez, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *Journal of Physical Chemistry C*, v.111, n.10, p. 3806-3819, 2007.

Noymark *et al.* The role of surfaces in catheter - associated infections. *Chem. Soc. Rev.* v. 38, p. 3435-3448, 2009.

Nucci M., *et al.* Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* **58**: 77–82. 2007.

Otari S.V., *et al.* Green phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Manilkara zapota* (L.) seeds and its inhibitory action against *Candida* species. *Mater. Lett* **116**: 367–369. 2014.

Panáček A., *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **30**:6333–40. 2009.

Peng H., *et al.* Green, microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using bamboo hemicelluloses and glucose in an aqueous medium. *Carbohydr. Polym* **91**: 348–55. 2013.

Pettegrew C., *et al.* Silver Nanoparticle Synthesis Using Monosaccharides and Their Growth Inhibitory Activity against Gram-Negative and Positive Bacteria. *ISRN Nanotechnol* **2014**: 1–8. 2014.

Pfaller M.A., *et al.* Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004-2008. *PLoS One* **9**: e101510. 2014.

Poliakoff *et al.* The production and formulation of silver nanoparticles using continuous hydrothermal synthesis. *Chemical Engineering Science*. V.85, p. 2-10, 2013.

Puig-Asensio M., *et al.* Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin. Microbiol. Infect* **20**: 245–54. 2014.

Puišo J., *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using lingonberry and cranberry juices and their antimicrobial activity. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **121C**: 214–221. 2014.

Sanjenbam P., *et al.* Anticandidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Streptomyces* sp.VITPK1. *J. Mycol. Med* **24**: 211–9. 2014.

Santos CA., *et al.* Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *J. Pharm. Sci* **103**: 1931–44. 2014.

Selvaraj M., *et al.* Highly potential antifungal activity of quantum-sized silver nanoparticles against *Candida albicans*. *Appl. Biochem. Biotechnol* **173**: 55–66. 2014.

Shahverdi A.R., *et al.* Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* **3**: 168–71. 2007.

Sharma *et al.* Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and interface Science*. p. 83-96, 2009.

Shenashen M.A., *et al.* Synthesis, Morphological Control, and Properties of Silver Nanoparticles in Potential Applications. *Part. Part. Syst. Charact* **31**: 293–316. 2014.

Silva C.R., *et al.* Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother* **57**: 1691–700. 2013.

Singh M., *et al.* Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. *Bioprocess Biosyst. Eng* **36**: 407–15. 2013.

Sobel J.D. Genital candidiasis. *Medicine (Baltimore)* **42**: 364–368. 2014.

Spampinato C. Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res. Int* **2013**: 204237. 2013.

Thomas R., *et al.* Antibacterial activity and synergistic effect of biosynthesized AgNPs with antibiotics against multidrug-resistant biofilm-forming coagulase-negative *staphylococci* isolated from clinical samples. *Appl. Biochem. Biotechnol* **173**: 449–60. 2014.

Tomaszewska *et al.* Verification of resistance to three mediated microbial strains and cancerous defense against MCF7 compared to HepG2 through microwave synthesized palnt - mediated silver nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology*, v.6, n.3. **2015**.

Torres M. Moayed S. Gynecologic and other infections in pregnancy. *Emerg. Med. Clin. North Am* **30**: 869–84. 2012.

Vasconcelos A.A., *et al.* Chromogenic medium for direct susceptibility testing of *Candida* spp. isolated from urine. *Mycopathologia* **172**: 125–30. 2011.

Vasconcelos A.A., *et al.* Comparação entre microdiluição e disco difusão para o teste de susceptibilidade aos antifúngicos contra *Candida* spp. *Semin. Ciências Biológicas e da Saúde* **33**: 135–142. 2012.

Vazquez J.A. Sobel J.D. Miconazole mucoadhesive tablets: a novel delivery system. *Clin. Infect. Dis* **54**: 1480–4. 2012.

Viana R.B., *et al.* Infrared Spectroscopy of Anionic, Cationic, and Zwitterionic Surfactants. *Adv. Phys. Chem* **2012**: 1–14. 2012.

Wady A.F., *et al.* Effect of a Silver Nanoparticles Solution on *Staphylococcus aureus* and *Candida* spp. *J. Nanomater* **2014**:1-7. 2014.

Wang H, Qiao X, Chen J, Ding S. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. **Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp** 256:111–5. 2005.

Yamamoto A.C.A., *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá--Mato Grosso, Brazil. *Rev. Iberoam. Micol* **29**: 164–8. 2012.

Yang Z.T., *et al.* Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai. *BMC Infect. Dis* **14**: 241-51 2014.

Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther. Clin. Risk Manag* **10**: 95–105. 2014.

Yehia R.S., *et al.* Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles produced by *Pleurotus ostreatus* and their anticandidal and anticancer activities. *World J. Microbiol. Biotechnol* **30**: 2797–803 (2014).

Zhang Q., *et al.* A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a “magic” reagent? *J. Am. Chem. Soc* **133**: 18931–9. 2011.

Zhang, L *et al.* Ambient light reduction strategy to synthesize silver nanoparticles and silver-coated TiO₂ with enhanced photocatalytic and bactericidal activities. *Langmuir*, v.19, n. 24, p. 9972-10380, 2003.

Zhang, L *et al.* Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures plasmonics, v. 3 n. 4, p. 127-150, 2008.

Zijlstra *et al.*, 2011. Single metal nanoparticles: optical detection, spectroscopy and applications. *Reports on progress in physics*, 2011.