

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO – UFES CENTRO DE CIÊNCIAS DA SÁUDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SADY ROBERTO RODRIGUEZ AVILA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITÓTOXICA DE NANOPARTICULAS DE OURO SINTETIZADAS COM EPIGALOCATEQUINA 3-GALATO (EGCG).

Vitoria, ES

2020

SADY ROBERTO RODRIGUEZ AVILA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITÓTOXICA DE NANOPARTICULAS DE OURO SINTETIZADAS COM EPIGALOCATEQUINA 3-GALATO (EGCG)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espirito Santo, como requisito parcial para obtenção de mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Marco Cesar Cunegundes Guimarães

Vitoria, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Rodriguez Avila, Sady Roberto, 1994-

R696 Atividade antibacteriana e citótoxica de a nanoparticulas de ouro sintetizadas com Epigalocatequina 3-galato (EGCG). / Sady Roberto Rodriguez Avila. - 2020.

130 f. : il.

Orientador: Marco Cesar Cunegundes Guimarães. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -Universidade

Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Nanoparticulas. 2. Testes de toxicidade. 3. Bactéria. 4. Síntese. 5. Chá verde. I. Cunegundes Guimarães, Marco Cesar.

II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

SADY ROBERTO RODRIGUEZ AVILA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITÓTOXICA DE NANOPARTICULAS DE OURO SINTETIZADAS COM EPIGALOCATEQUINA 3-GALATO (EGCG).

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espirito Santo, como requisito parcial para obtenção de mestre em Biotecnologia.

Apresentado em 24 de abril de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães

Universidade Federal do Espirito Santo – UFES

Orientador

Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira

Universidade Federal do Espirito Santo - UFES

Membro Interno

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta

Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF

Membro Externo

VITORIA, ES

2020

DEDICATÓRIA.

Ao meu Pai Mario Roberto Rodriguez

Porque todo o seu trabalho, hoje tem uma recompensa

Sinto muito sua falta.

AGRADECIMENTOS.

A Deus por me permitir chegar até aqui, porque apesar dos maus dias e das adversidades, Ele nunca me abandonou e sempre me protegeu. Obrigado Deus porque você nunca está errado e porque sua vontade (embora em muitos casos seja difícil aceitá-la) sempre acaba sendo perfeita.

Ao meu Pai Mario, que embora você não esteja mais comigo, você sempre se sentiu orgulhoso, me motivou a continuar estudando e me ensinou que não há obstáculo que não possamos atravessar. Você ficaria muito feliz agora.

A minha mãe Marta por me ensinar a andar pelo bom caminho, por se preocupar comigo e sempre me manter em suas orações.

As minhas duas irmãs, a Marie por me amar e apoiar tanto, e a Evelyn por ser minha ajuda incondicional e um dos melhores exemplos a seguir, obrigado as três por serem tão especiais e maravilhosas.

A Emelda e a Marcela por me fazer parte da sua família e em geral a toda minha família pelo apoio e ajuda em qualquer momento.

Aos meus melhores amigos de Honduras que sempre me apoiaram e me deram palavras de encorajamento: Ebed, Winston, Elisa, Jorge e Martha.

Aos melhores amigos internacionais que pude conhecer neste pais. A Fernanda por ser a melhor companheira nesta viagem. A Ingrid por me aconselhar em tudo momento. Ao Jhonnatan por me ensinar a ser um melhor homem. Ao Brendo por sempre me motivar e acompanhar nos dias mais tensos. Aos amigos Tiago, Mayra, Oscar, Alessandra e Roberto, que foram parte dos melhores momentos e experiências no Brasil.

À Organização de Estados Americanos (OEA) por me selecionar para fazer o mestrado. Ao Governo do Brasil e a CAPES pelo financiamento da bolsa. Muito obrigado pela oportunidade.

À Universidade Federal do Espirito Santo por receber-me e fornecer-me as ferramentas necessárias para desenvolver este projeto acadêmico.

Ao professor Marco pela orientação e por me aceitar para trabalhar com ele, para mim foi um grande honor fazer parte do seu grupo de pesquisa. Obrigado pela paciência, empatia, apoio, respeito, por me encorajar a continuar estudando, a buscar novos horizontes, todo o crescimento acadêmico e graças a ele.

A Rafaella pela amizade, parceria e apoio indispensável no desenvolvimento do projeto e a Natane pelos conselhos e ajuda nos experimentos.

Ao Wanderson por ser o melhor cientista no Brasil, por sempre me escutar, me aconselhar, orientar e por ensinar que de alguma maneira ou outra, as coisas sempre vão dar certo com um pouco de fé.

A Laryssa pela ajuda, por me reprender quando fazia as coisas erradas, pela orientação e por se preocupar sempre por mim.

Ao pessoal do LUCCAR pelos agradáveis momentos, pela amizade, pelos aniversários e por tornar os dias difíceis de laboratório difíceis em dias cheios de risos e vontade de continuar trabalhando.

Aos laboratórios que colaboraram no desenvolvimento do meu projeto como LABIOM, LABCAS e NUPECFARMA. Em especial ao professor Ricardo Schuenck, a Naiara e a Lorena pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos.

A Compaixão Internacional em Honduras e ao programa LDP por serem parte da minha formação tanto acadêmica como pessoal, obrigado pelo apoio durante 15 anos.

À banca examinadora por aceitar o convite.

Muito obrigado a todos!

RESUMO.

A resistência aos antibióticos é um problema urgente de saúde mundial. Ao longo do tempo as bactérias têm desenvolvido mecanismos de defesa contra os antibióticos convencionais associado à falta de novas drogas que atenua ainda mais o problema. Portanto, é necessário o desenvolvimento de agentes antibacterianos multialvos, inovadores e mais eficazes para superar essa ameaça à saúde humana. O presente trabalho avaliou a atividade antibacteriana de nanopartículas de ouro reduzidas e estabilizadas com Epigalocatequina 3-Galato (EGCG). As nanopartículas sintetizadas (AuNPs-EGCG) se apresentaram estáveis em condições fisiológicas in vitro, assim como na ressuspensão em vários solventes. A atividade antibacteriana in vitro das AuNPs-EGCG foi evidenciada por uma diminuição no número de células viáveis e inibição do crescimento após 12 horas de tratamento tanto em bactérias Gram positivas como Gram negativas, obtendo valores de concentração mínima inibitória (CMI) que variaram entre 15 e 120 µg.mL⁻¹ em todas bactérias tratadas. Os efeitos antibacterianos da nanoformulação foram gerados pela interação direta com as superfícies das bactérias tratadas, dessa forma provocaram deformações morfológicas que induziram a lise e morte celular. Além disso, a citotoxicidade in vitro das AuNPs-EGCG em fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HaCaT) mostrou altos níveis de viabilidade celular e valores de IC50 de 267.55 e 293.04 µg.mL⁻¹ respetivamente após 24 horas de tratamento com AuNPs-EGCG. A funcionalização da EGCG no núcleo de ouro potencializou sua atividade antibacteriana e diminuiu sua citotoxicidade in vitro. As AuNPs-EGCG manifestam alto potencial para futuras aplicações no campo biomédico como tratamento antibacteriano contra infecções cutâneas.

Palavras-chaves: Nanoparticulas de ouro; Citotoxicidade; Atividade antibacteriana; Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; Epigalocatequina 3-galato.

ABSTRACT.

Antibiotic resistance is an urgent global health problem. Over time, bacteria have developed defense mechanisms against conventional antibiotics associated with the lack of new drugs that further mitigates the problem. Therefore, it is necessary to develop multi-target, innovative and more effective antibacterial agents to overcome this threat to human health. The present work evaluated the antibacterial activity of reduced and stabilized gold nanoparticles with Epigallocatechin 3-Galate (EGCG). The synthesized nanoparticles (AuNPs-EGCG) were stable under physiological conditions in vitro, as well as resuspension in various solvents. The in vitro antibacterial activity of AuNPs-EGCG was evidenced by a decrease in the number of viable cells and growth inhibition after 12 hours of treatment in both Gram positive and Gram negative bacteria, obtaining minimum inhibitory concentration (MIC) values that varied between 15 and 120 µg.mL⁻¹ in all treated bacteria The bactericidal and bacteriostatic effects of the nanoformulation were generated by the direct interaction with the surfaces of the treated bacteria, thus causing morphological deformations that induced cell lysis and death. In addition, the in vitro cytotoxicity of AuNPs-EGCG in murine fibroblast (L929) and human keratinocytes (HaCaT) showed high levels of cell viability and IC50 values of 267.55 e 293.04 µg.mL⁻¹, respectively after 24 hours of treatment with AuNPs-EGCG. The functionalization of EGCG on the gold core enhanced its antibacterial activity and decreased its in vitro cytotoxicity. AuNPs-EGCG have high potential for future applications in the biomedical field as an antibacterial treatment against skin infections.

Keywords: Gold nanoparticles; Cytotoxicity; Antibacterial activity; Gram-positive and Gram-negative bacteria; Epigallocatechin 3-gallate.

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Fatores gerais que promovem a resistência antibacteriana (AR). Os fatores estão relacionados com processos interativos bacterias-ambiente e outros com a falta de ações corretivas e preventivas do pessoal de saúde, paciente e farmacêuticas.

Figura 2. Diagrama da transferência gênica horizontal. As bacterias têm a capacidade de adquirir o DNA de outras bacterias por meio de mecanismos como a transformação (DNA exógeno do meio onde se encontram), transdução (por meio de bacteriófagos) e conjugação (por meio de plasmídeos, transposons e integrons). Adaptado de: (KOENE; BLAAK; HAVELAAR, 2010).

Figura 3. Mecanismo de inativação enzimática de antibióticos β-lactamicos pela enzima β-lactamase. A enzima β-lactamase se liga ao grupo carbonilo do antibiótico por meio de seu aminoácido de serina. A ligação produz uma ruptura do enlace C=O que leva a inativação da molécula e consequentemente perda da sua função antibacteriana. Adaptado de: (D'COSTA; WRIGHT, 2009).

Figura 4. Diagrama de formação de um biofilme e seu ciclo de dispersão. As células planctônicas se aderem em uma superfície que conta com as proteínas, carboidratos e DNA necessário para formar o biofilme. Seguidamente o biofilme cresce e madura para dar lugar a liberação de células bacterianos com características resistentes aos antibióticos. Finalmente o ciclo se renova para formar novos agregados bacterianos. Adaptado de (ESTEVES, 2016).

Figura 5. Diagrama das novas estratégias terapêuticas em estudo para combater a resistência antibacteriana. Os novos enfoques abarcam o estudo de derivados de drogas (modificações a antibióticos clássicos), drogas contra fatores de virulência, drogas sintetizadas por vias especificas e nanoparticulas.

Figura 6. Diagrama de funcionalização superficial de nanopartículas pelo incremento da relação área / volume a partir de um material a granel. A redução do ouro a um estado coloidal incrementa sua área superficial, dessa forma facilita a funcionalização na sua superfície com diversas moléculas como drogas, anticorpos, DNA, marcadores tumorais, entre outros.

Figura 7. Diagrama das principais características físico-químicas das nanopartículas de ouro (AuNPs) que influem no desenvolvimento da atividade citotóxica e antibacteriana. O tamanho, forma e carga superficial são fatores crucias para compreender os mecanismos citotóxicos e antibacterianos das AuNPs.

Figura 8. Principais mecanismos de ação antibacteriana das nanopartículas de Ouro. As AuNPs podem penetrar a membrana bacteriana e induzir danos intracelulares, além elas podem interagir com moléculas na camada bacteriana ou inibir processos de reprodução e metabolismo.

Figura 9. Estrutura molecular da Epigalocatequina 3-Galato (EGCG) proveniente do chá verde. A molécula com anéis polifenólicos (A e B) incluindo uma porção denominada galato (anel D).

Figura 10. Esquema da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e construção das curvas inibição após tratamento com AuNPs-EGCG, EGCG e glutaraldeído nas bacterias em estudo.

Figura 11. Esquema da contagem do número de unidades formadoras de colônias por mililitro de solução (UFC/mL) das bacterias em estudos tratadas com AuNPs-EGCG, EGCG e glutaraldeído.

Figura 12. Espectro de absorção UV/Visível da síntese de AuNPs-EGCG. A síntese foi caracterizada pelo efeito de ressonância plasmonica de superfície em 527 nm. A banda sugere uma boa dispersão e uniformidade de tamanho e forma de acordo ao valor de FWHM.

Figura 13. Esquema do processo de síntese de AuNPs-EGCG (A) Desprotonação do grupo hidroxila da EGCG e redução do ouro a seu estado coloidal. (B) Adsorção da EGCG na superfície do núcleo de ouro por meio de interações eletroestáticas que estabilizam o sistema. (C) Auto-oxidação da EGCG levando à formação de um radical livre e subsequentemente a uma quinona.

Figura 14. Espectro de absorção UV/Vis das AuNPs-EGCG centrifugadas nas condições de 6000, 8000, 10000, 12000 e 14000 rpm durante 5, 10 e 20 minutos (total de 15 experimentos) e posteriormente ressuspendidas em água ultrapura. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 15. Espectro de absorção UV/vis das AuNPs-EGCG centrifugadas a 14000 rpm durante 20 minutos e ressuspendidas em DMSO, tampão PBS e Caldo Mueller-Hinton de cátion ajustado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 16. (A) Espectro de absorção UV/Vis das AuNPs-EGCG em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (B) Gráfico do grau de floculação das AuNPs-EGCG em diferentes concentrações de NaCl, a partir da área entre 600 – 800 nm. Os resultados são representados como a média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata.

Figura 17. (A) Espectro de absorção UV/Vis das AuNPs-EGCG em uma faixa de pH de 1 -13 (B) Gráfico do grau de floculação das AuNPs-EGCG em uma faixa de pH de 1 -13, a partir da área entre 600 – 800 nm. Os resultados são representados como a média \pm erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata. **** *p* < 0.0001 vs. controle.

Figura 18. Espectros de absorção UV/Vis de AuNPs-EGCG armazenadas a 4ºC após 30, 45 e 60 dias da síntese. Leituras realizadas por triplicata.

Figura 19. Viabilidade celular após 24 horas do tratamento com o sal de ouro nas concentrações de 85, 42.5, 21.25, 10.63 e 5.31 µg.mL⁻¹ em fibroblastos murinos (L929) e queratinocitos humanos (HaCaT). A viabilidade celular foi calculada como a porcentagem de células viáveis em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a viabilidade média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata. **p* < 0.05, *** *p* < 0.001 e **** *p* < 0.001 de L929 vs. HaCaT.

Figura 20. Viabilidade celular após 24 horas do tratamento com EGCG e AuNPs-EGCG nas concentrações de 120, 60, 30, 15 e 7.5 µg.mL⁻¹ em (A) fibroblastos murinos (L929) e (B) queratinocitos humanos (HaCaT). A viabilidade celular foi calculada como a porcentagem de células viáveis em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a viabilidade média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata. ** *p* < 0.01 e **** *p* < 0.0001 de EGCG vs. AuNPs-EGCG. **Figura 21.** Percentagens de inibição das oito bacterias em estudo tratadas com uma concentração de 1000 µg.mL⁻¹ de AuNPs-EGCG após 24 horas. A inibição bacteriana foi calculada como a porcentagem de células inibidas em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a inibição média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata.

Figura 22. Curvas de inibição bacteriana do tratamento com AuNPs-EGCG nas concentrações de 120, 60. 30, 15, e 7.5 µg.mL⁻¹ e bactéria não tratada após 12, 24 e 48 horas. (A) *S. aureus* 25923 (B) *S. aureus* 10A (C) *P. aeruginosa* 27853 (D) *P. aeruginosa* 93B (E) *E. coli* ESBL (F) *E. faecalis* 6885. Os resultados são representados como a densidade ótica média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em duplicata. ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001 vs. controle positivo.

Figura 23. Percentagens de inibição bacteriana após 48 hrs de tratamento com AuNPs-EGCG nas concentrações de 120, 60, 30, 15, 7.5 μg.mL⁻¹ contra as bacterias: (A) *S. aureus* 25923. (B) *S. aureus* 10 A. (C). *P. aeruginosa* 27853. (D) P. *aeruginosa* 93B. (E). *E. coli* ESBL. (F). *E. faecalis* 6885. A inibição bacteriana foi calculada como a porcentagem de células inibidas em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a inibição média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em duplicata.

Figura 24. Percentagens de inibição bacteriana após 48 hrs de tratamento com EGCG nas concentrações de 120, 60, 30, 15, 7.5 μg.mL⁻¹ contra as bacterias: (A) *S. aureus* 25923. (B) *S. aureus* 10 A. (C). *P. aeruginosa* 27853. (D) P. *aeruginosa* 93B. (E). *E. coli* ESBL. (F). *E. faecalis* 6885. A inibição bacteriana foi calculada como a porcentagem de células inibidas em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a inibição média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em duplicata.

Figura 25. Colônias bacterianas após 48 horas de tratamento com AuNPs-EGCG (A) Controle de *S. aureus* 10A (B) Tratamento de *S. aureus* 10A (C) Controle de *P. aeruginosa* 27853 (D) Tratamento de *P. aeruginosa* 27853 (D) Controle de *E. coli* ESBL (E) Tratamento de *E. coli* ESBL. Barra de escala de 1 cm. **Figura 26.** Unidades formadoras de colônias bacterianas por mililitro de solução (UFC/mL) após 48 horas de tratamento com AuNPs-EGCG e EGCG utilizando concentrações de 120, 60, 30, 15 e 7.5 µg.mL⁻¹ contra as bacterias: (A) *S. aureus* 25923. (B) *S. aureus* 10 A. (C). *P. aeruginosa* 27853. (D) P. *aeruginosa* 93B. (E). *E. coli* ESBL. (F). *E. faecalis* 6885. O número de UFC/mL é representando como o valor logarítmico de 10.

Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de bacterias gram positivas. (A) Controle não tratado de *Staphylococcus aureus* 10A. (B) Tratamento de *Staphylococcus aureus* 10A com AuNPs-EGCG. (C) Controle não tratado de *Enterococcus faecalis* 6885. (B) Tratamento de *Enterococcus faecalis* 6885 com AuNPs-EGCG. Escala bar de 1 µm.

Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* 93B. (A) Controle não tratado. (B, C e D) Tratamento com AuNPs-EGCG. Escala bar de 1 µm.

Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da bactéria *Escherichia coli* ESBL. (A) Controle não tratado. (B, C e D) Tratamento com AuNPs-EGCG. Escala bar de µm.

Figura 30. Curva padrão da EGCG nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 μg. mL⁻¹ e com leituras a 274nm em espectrofotômetro UV/Vis. A curva apresenta o valor do coeficiente de correlação (R) e a equação da reta obtida (y=mx+b).

LISTA DE TABELAS.

Tabela 1. Antibióticos aprovados pela FDA durante a década 2010s (VENTOLA, 2015), (WATCH, 2018), (DRUGS DEVELOPMENT & APPROVAL PROCESS, 2018) (IMAI et al., 2019).

Tabela 2. Grupo de bacterias gram-positivas e negativas em estudo para ensaios

 antibacterianos

Tabela 3. Resultados dos parâmetros avaliados (FWHM, λ máximo e absorbância máxima) após a centrifugação e ressuspensão de AuNPs-EGCG em água ultrapura.

Tabela 4. Resultados dos parâmetros avaliados (FWHM, λ máximo e absorbância máxima) de AuNPs-EGCG centrifugadas a 14000 rpm / 20 minutos e ressuspendidas em DMSO, tampão PBS e Caldo Mueller Hinton de cátion ajustado.

Tabela 5. Concentração Inibitória Máxima no 50% (IC50) do sal de ouro (HAuCl₄), EGCG e AuNPs-EGCG após 24 horas de tratamento em fibroblastos murinos (L929) e queratinocitos humanos (HaCaT).

Tabela 6. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de AuNPs-EGCG e EGCG correspondente a cada bactéria tratada.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.

Au⁰: Ouro com número de oxidação zero;

Au⁺³: Ouro com número de oxidação +3;

ATP: Trifosfato de adenosina;

AuNPs: Nanopartículas de ouro;

AuNPs-EGCG: Nanopartículas de ouro sintetizadas com Epigalocatequina 3-Galato;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

DMEM: Meio Essencial Mínimo de Dulbecco;

DNA: Ácido desoxirribonucleico;

EGCG: Epigalocatequina 3-galato;

EPM: Erro padrão da média;

FDA: Administração de alimentos e drogas (Food and Drug Administration);

FWHM: Largura de banda à meia altura (Full width at half maximum);

HaCaT: Queratinócitos não tumorigênicos imortalizados humanos;

HAuCl₄: Ácido tetracloroaurico;

HCI: Ácido clorídrico;

HNO₃: Ácido nítrico;

LABCAS: Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana;

LABIOM: Laboratório multiusuário de analises biomoleculares;

LSPR: Ressonância plasmônica de superfície localizada;

LUCCAR: Laboratório de ultraestrutura celular Carlos Alberto Redins;

L929: células de fibroblastos murinos;

MDR: Multirresistência a drogas;

MEV: Microscopia eletrônica de varredura;

MH+: Mueller Hinton de Cátion ajustado;

MTT: Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

mV: Milivolts

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo;

NaOH: Hidróxido de sódio;

nm: Nanômetros;

NPs: Nanopartículas;

PBS: Tampão fosfato - salino (phosphate buffered saline);

pH: Potencial hidrogeniônico;

pKa: constante de ionização de um ácido;

RA: Resistencia antibacteriana;

ROS: Espécies reativas de oxigênio;

rpm: Rotações por minuto;

TPTZ: 2,4,6-Tri (2-piridil) -s-triazina;

UFC: Unidades formadoras de colônias;

UV/Vis: Ultravioleta / visível;

V: Volts.

SUMÁRIO.

1. II	NTRODUÇÃO
2. R	22 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
2.1	Resistencia Antibacteriana: uma emergência global22
2.2	Mecanismos de Resistência Antibacteriana24
2.3	Nanotecnologia
2.4	Citotoxicidade de Nanoparticulas de ouro (AuNPs).
2.5	Nanopartículas de ouro como agentes antibacterianos
2.6	Epigalocatequina 3-Galato (EGCG)41
2 n	anoparticulas de ouro42
2 (I	.6.2 Atividade citotóxica e antibacteriana da Epigalocatequina 3-Galato EGCG)44
3. C	DBJETIVOS
3.1	Objetivo geral
3.2	Objetivos específicos47
4. N	1ÉTODOS E MATERIAIS
4.1	Síntese de AuNPs-EGCG48
4.2 Hin	Ressuspensão de AuNPs-EGCG em agua, PBS, DMSO e caldo Mueller ton de cátion ajustado48
4.3	Grau de Floculação49
4.4	Potencial Zeta49
4.5	Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade celular49
4.6	Avaliação <i>in vitro</i> da Atividade Antibacteriana50
4 N	.6.1 Construção das curvas de inibição e determinação da Concentração Iínima Inibitória (CMI)51

		4.6. mili	.2 litro	Quantificação do número de Unidades Formadoras de Colônias	por
		_			55
	4.	7	Mic	croscopia eletrônica de Varredura (MEV)	54
5.		RE	SUL	TADOS E DISCUSSÃO	55
4	5.	1	Sínt	tese de AuNPs-EGCG	55
4	5.	2	Res	ssuspensão de AuNPs-EGCG em água, PBS, DMSO e Caldo Mu	leller
	Hi	ntoi	n de	e cátion ajustado	57
4	5.	3	Aná	álise da estabilidade das AuNPs-EGCG	62
4	5.	4	Ava	aliação da citotoxicidade in vitro de AuNPs-EGCG	64
	5.	5	Ativ	vidade Antibacteriana <i>in vitro</i> das AuNPs-EGCG	69
		5.5	.1	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) das Au	NPs-
		EG	CG	e EGCG	70
		5.5	.2	Quantificação de UFC/mL do tratamento com AuNPs-EGCG e E	GCG
		nas	bac	cterias em estudo	76
		5.5	.3	Analise morfológica das bacterias tratadas com AuNPs-EGCG por	meio
		de l	Micr	roscopia Eletronica de Varredura (MEV).	79
6.		со	NCL	LUSÕES	85
7.		RE	FER	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
8.		AN	EXO	DS	. 105
	8.	1	Cal	lculo de concentração de AuNPs-EGCG para os testes de citotoxicida	ade e
i	ar	ntiba	acter	riano	. 105
	8.	2	Des	senvolvimento do projeto	. 106
	8.	3	Per	rspectivas de mercado	. 106
	8.	4	Inse	erção social do projeto	. 107
ł	8.	5	Artig	igo	. 108

1. INTRODUÇÃO.

A resistência antibacteriana (RA) representa uma das principais ameaças à saúde pública. Por ano são 35,000 mortes, registrando uma morte cada 15 minutos (TALKINGTON, 2020). Um estudo demostrou que cerca do 70% de bactérias no mundo são resistentes pelo menos a um tipo de antibiótico (ANDERSSON; NICOLOFF; HJORT, 2019). Os microrganismos naturalmente desenvolvem estratégias de defesa contra os antibióticos, seja por meio de transferência de genes resistentes ou por mutações. Esse cenário é ainda agravado pela falta de desenvolvimento de novas drogas antibacterianas altamente efetivas (VENTOLA, 2015). Atualmente o enfoque das grandes companhias farmacêuticas mundiais é criar um antibiótico capaz de atacar bactérias multi-resistentes a drogas, de maneira que não interfira na microbiota intestinal do paciente. Entretanto, além do desafio biotecnológico, existe o desafio do mercado de superar antibióticos convencionais nos ensaios clínicos e gerar um produto lucrativo (ÅRDAL et al., 2019).

Sendo assim, a nanotecnologia representa uma alternativa adequada para transpor essas fronteiras. As nanopartículas possuem um tamanho menor que as células animais e bactérias e uma grande área superficial que as tornam ideais não só para penetrar sistemas biológicos más também transportar moléculas a sítios de interesse (LI, Xiaoning et al., 2014) . A partir de métodos de síntese verde são obtidas nanopartículas estáveis, econômicas e com baixo grau de toxicidade para células humanas, destacando as nanopartículas de ouro que apresentam propriedades bactericidas principalmente pela interação com a parede celular de patógenos (YEH; CRERAN; ROTELLO, 2012).

A epigalocatequina 3-galato (EGCG) é uma molécula orgânica extraída das folhas frescas do chá verde que conta com uma estrutura poli hidroxílica. A EGCG pode agir como agente redutor e estabilizante na síntese de nanopartículas de ouro. A funcionalização da molécula na superfície do ouro permite melhorar sua estabilidade *in vitro* provocada pela degradação em condições ácidas (ZHANG, Le et al., 2014) Além disso, a EGCG possui atividade antibacteriana que consiste na degradação da camada de peptidoglicano e danificação de estruturas intracelulares que levam à morte da bactéria (CD et al., 1999)

Neste estudo foi analisado o efeito citotóxico e antibacteriano *in vitro* de nanopartículas de ouro sintetizadas com EGCG, por meio da avaliação da viabilidade em linhagens celulares cutâneos e determinação da concentração mínima inibitória no tratamento contra bacterias gram-positivas e negativas. A estabilidade do coloide foi avaliada em condições fisiológicas adotando um parâmetro de floculação, assim também na ressuspensão em alguns solventes usados nos ensaios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Resistencia Antibacteriana: uma emergência global.

Nos últimos anos a resistência antibacteriana (RA) foi declarada como uma "preocupação global de saúde pública" por organizações como o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a Sociedade de Doenças Infecciosas de América, o Fórum Econômico Mundial e a Organização Mundial da Saúde (OMS). Essa última tem a competência de gerar um plano de ação global para combater o referido problema, no entanto até agora não houve uma eliminação completa ou significativa (ASLAM et al., 2018). Além da evolução natural dos microrganismos, existem outros fatores mitigadores, alguns deles representam processos interativos bacteriasambiente e outros a falta de ações corretivas e preventivas como parte da negligência do ser humano conforme na Figura 1. (WATKINS; BONOMO, 2016).



Figura 1. Fatores gerais que promovem a resistência antibacteriana (AR). Os fatores estão relacionados com processos interativos bacterias-ambiente e outros com a falta de ações corretivas e preventivas do pessoal de saúde, paciente e farmacêuticas.

Os antibióticos são um dos medicamentos mais comumente prescritos na medicina humana, no entanto mais de 50% do total prescritos são considerados desnecessários (FRIEDEN, 2013). A baixa qualidade das formulações por parte da indústria farmacêutica simboliza concentrações sub-inibitórias *in vivo* que aumentam o

surgimento de novas cepas resistentes. Os médicos promovem práticas erradas, prescrevem medicamentos errados com doses incorretas e os farmacêuticos não fornecem informações suficientes para o uso correto do antibiótico. Por seu lado, os pacientes não se aderem aos esquemas posológicos, interrompem a medicação quando os sintomas diminuem sem primeiro remover completamente o patógeno e o problema da automedicação (GAJDÁCS; ALBERICIO, 2019)

Os países da América Latina têm taxas de resistência antibacteriana mais altas que a Europa e os Estados Unidos, principalmente com bactérias gram-negativas não fermentativas (RELLO; BUNSOW; PEREZ, 2016). Os centros hospitalares brasileiros são atacados principalmente por bactérias como *S. aureus* resistente à meticilina, *Enterococos* resistentes à vancomicina, *S. pneumoniae*, Complexo *Acinetobacter baumannii (ABC)* e *P. aeruginosa* (ROSSI, 2011)

Na última década houve uma diminuição significativa do número de antibióticos aprovados. Isto levou a uma necessidade urgente da descoberta de novos antibacterianos e estratégias de tratamento (LI, Xiaoning et al., 2014). A Tabela 1 mostra alguns dos antibióticos e combinações aprovadas pelo FDA durante a década, a maioria deles já estão distribuídos comercialmente com exceção da darobactina que ainda não está em fase comercial. Esse novo antibiótico surgiu devido à escassez de moléculas capazes de penetrar na membrana externa das bactérias gram-negativas (IMAI et al., 2019). Por outro lado, estudos recentes identificaram uma família de peptidomiméticos de uma toxina bacteriana (PepA1) com propriedades contra patógenos resistente a multidrogas (NICOLAS et al., 2019)

Tabela 1. Antibióticos aprovados pela FDA durante a década 2010s (VENTOLA, 2015), (WATCH, 2018), (DRUGS DEVELOPMENT & APPROVAL PROCESS, 2018) (IMAI et al., 2019).

Molécula	Nome Comercial	Ano de aprovação	Família de antibiótico	Indicações
				Infecções na pele, tecidos
Ceftarolina	Teflaro	2010	Cefalosporina	moles y pneumonia
				adquirida
Tedizolid	Sivextro	2014	Oxazolidinona	Infecções aguda na pele e
Dalbavancina	Dalvance	2014	Glicopeptidio	tecidos moles

Oritavancin	Orbactiv	2014	Glicopeptidio	
Coftolozano/			Cefalosporina /	Pielonefrite aguda,
tazobactam	Zerbaxa	2014	Inibidor β-	infecções intra-abdominais
lazobaciam			lactamase	e urinárias
				Otite externa aguda (AOE)
Finafloxacina	Xtoro	2014	Fluoroquinolona	por <i>P. aeruginosa e S.</i>
				aureus
Coftazidimo/			Cefalosporina /	Pielonefrite aguda,
avibactam	Avycaz	2015	Inibidor β-	infecções intra-abdominais,
avibactani			lactamase	urinárias y pneumonia
Delafloyacina	Baydola	2017	Fluoroquinolona	Infecções na pele e na
Delanoxacilia	Baxuela			estrutura da pele
Secnidazol	Solosec	2017	Nitroimidazol	Vaginose de origem
Geenidazor		2017		bacteriano
Plazomicina	Zemdri 2018	2018	Aminoglucosido	Pielonefrite e infecções
T lazofficina		2010		urinarias complicadas
Omadaciclina	Nuzyra	2018	Tetraciclina	Pneumonia adquirida e
omadacionna		2010		infecções agudas na pele
Evaraciclina	Xerava	2018	Infe Tetraciclina co	Infecções intra-abdominais
	Λειανά	2010		complicadas e urinarias
Cefiderecol	Fetroja	2019	Cefalosporina	Infecções complicadas do
Condercoor		2013		trato urinário (ITU)
				Infecções por cepas de P.
			Derivado de um	aeruginosa, E. coli e K.
Darobactina		2019	nematódo	pneumoniae do tipo
			(Photorhabdus)	selvagem e resistentes a
				antibióticos.

2.2 Mecanismos de Resistência Antibacteriana.

As bactérias podem adquirir resistência aos antibióticos por três vias: adaptativa, adquirida e intrínseca. A resistência adaptativa surge quando as bactérias podem modificar seu transcriptoma em resposta a mudanças no ambiente como aumento na densidade de íons, temperatura e exposição a concentrações não letais de antibióticos, isso confere uma maior capacidade de suportar um antibacteriano (LEE, 2019). Esse tipo de resistência é mais instável porque não se transmite de uma

geração a outra e pode ser revertida no processo de adaptação, por tanto a duração dependerá da mudança ambiental se for temporária ou constante (SALIMIYAN RIZI; GHAZVINI; NOGHONDAR, 2018).

Um mecanismo adaptativo bastante estudado atualmente é a resposta ao estresse ambiental (REA) presente na envoltura das bactérias. Esse mecanismo monitora a biogênese e protege a integridade de tal envoltura em bactérias gram-positivas e negativas (MACRITCHIE; RAIVIO, 2009). A incorporação de D-alanina na parede celular reduz a carga negativa em gram-positivas, desta forma a bactéria não consegue interagir com moléculas carregadas positivamente como drogas e incluso nanopartículas aniônicas. Nas bacterias gram-negativas, a REA pode modificar o conteúdo de lipopolissacarídeos (LPS), maior componente da membrana, lhes permitindo desenvolver concentrações adequadas de LPS que inibem a interação e entrada de moléculas (SALAS OROZCO et al., 2019)

A resistência adquirida é a via mais frequente e de maior importância clínica. Ocorre quando as bactérias adquirem propriedades para resistir às ações de um determinado antibiótico (VIGNOLI; SEIJA, 2000). O mecanismo mais comum desse tipo de resistência é o fenômeno de transferência gênica horizontal onde as bactérias podem receber genes de resistência que lhes permitem desenvolver capacidades como a degradação de enzimas, bombas de efluxo, proteções de proteínas alvo entre outras (CARMINATI et al., 2019). Uma vez que as bactérias adquirem esses genes, elas têm a capacidade de continuar crescendo e se reproduzindo mesmo na presença do antibiótico, e o efeito inibitório só se manifestará em bactérias sensíveis (WRIGHT, Gerard, 2011). O fenômeno se desenvolve por meio de três processos (Figura 2) (1) *Transformação*: algumas espécies de bactérias são naturalmente capazes de adquirir DNA exógeno que é encontrado no meio ambiente através de uma competição com outras bactérias. (2) Transdução: o material genético é transferido por um bacteriófago (vírus que infectam bactérias) que utiliza a maquinaria da bactéria para se reproduzir. (3) Conjugação: as bactérias usam elementos genéticos móveis (MGEs) como veículos para compartilhar a informação. Os veículos mais utilizados são os plasmídeos, transposons e integrons. Eles representam os motores da evolução bacteriana e são cruciais para a disseminação da resistência em organismos clinicamente relevantes (MUNITA et al., 2016).



Figura 2. Diagrama da transferência gênica horizontal. As bacterias têm a capacidade de adquirir o DNA de outras bacterias por meio de mecanismos como a transformação (DNA exógeno do meio onde se encontram), transdução (por meio de bacteriófagos) e conjugação (por meio de plasmídeos, transposons e integrons). Adaptado de: (KOENE; BLAAK; HAVELAAR, 2010).

A resistência intrínseca ocorre como consequência das características estruturais ou funcionais das bactérias. Para alguns tipos de bactérias é normal ter esse tipo de resistência (BLAIR et al., 2015). Essa resistência pode ser expressada por diversos mecanismos, por exemplo algumas bactérias são capazes de inibir os efeitos dos antibióticos reduzindo a permeabilidade da sua membrana externa e limitando a entrada de antibióticos através da redução de porinas ou substituindo essas porinas por canais mais seletivos (COX; WRIGHT, 2013). Isso ocorre principalmente com

antibióticos hidrofílicos que conseguem facilmente atravessar a membrana por difusão através de porinas (LÖWE et al., 2020).

Outro mecanismo é a superexpressão de bombas de saída de antibióticos que também podem ser o resultado de uma resistência adquirida por transferência entre plasmídeos. Algumas dessas bombas são multiestruturais, ou seja, capazes de transportar vários substratos e são conhecidas como bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas (MDR). Esse mecanismo é catalogado como alarmante por sua condição de ser facilmente transmitido e disseminado para outros patógenos de importância clínica (BLAIR et al., 2015).

Por vias adquirida e intrínseca, as bactérias podem modificar estruturalmente o sitio de ação de um antibiótico adicionando alguns grupos químicos, que levam a uma perda de seu efeito. Essa atividade pode ser adotada tanto por bactérias Grampositivas como Gram-negativas, onde os antibióticos atuam principalmente em proteínas ou enzimas (LAMBERT, 2005). Na maioria dos casos, as bactérias conseguem modificar esses locais diretamente no nível do DNA.

A maioria dos antibióticos são suscetíveis à hidrólise de seus grupos químicos, principalmente ésteres e amidas que concentram grande parte de sua atividade biológica. Certas enzimas são capazes de alterar as referidas ligações e causar a diminuição do efeito terapêutico de maneira intrínseca (WRIGHT G. D., 2005). Um exemplo clássico é a *Staphylococcus aureus*, que consegue inativar a penicilina por meio da enzima β-lactamase serina (Figura 3) (FISHER; MEROUEH; MOBASHERY, 2005). Estudos de degradação enzimática têm destacado a família de enzimas transferases como novas protagonistas na resistência antibacteriana. Ativamente no citosol se encontram as aciltransferases, fosfotransferases, tioltransferases, nucleotiltransferases, ADP-ribosiltransferases e glicosiltransferases (WRIGHT, G. D., 2005).



Figura 3. Mecanismo de inativação enzimática de antibióticos β-lactamicos pela enzima βlactamase. A enzima β-lactamase se liga ao grupo carbonilo do antibiótico por meio de seu aminoácido de serina. A ligação produz uma ruptura do enlace C=O que leva a inativação da molécula e consequentemente perda da sua função antibacteriana. Adaptado de: (D'COSTA; WRIGHT, 2009).

Outras enzimas como TetO e TetM são responsáveis de catalisar a separação do antibiótico ao ribossomo, dessa forma impede que o efeito antibacteriano seja completado. Esse mecanismo é aplicado principalmente para as tetraciclinas, drogas inibidoras da síntese proteica. Portanto, o ribossomo poderia sintetizar proteínas mesmo na presença do antibiótico (CONNELL et al., 2003)

Atualmente um fenômeno muito estudado para compreender mecanismos coletivos de resistência entre as bactérias, é o sensor de quorum (QS). Trata-se de um sistema de comunicação onde as bactérias podem apresentar alterações fenotípicas marcantes quando se encontram em altos níveis de densidade populacional (SAEKI et al., 2020). Quando a densidade bacteriana é reduzida, as bactérias produzem e secretam moléculas sinalizadoras (autoindutores) em baixa quantidade, mas à medida que o número de bactérias aumenta, a concentração de autoindutores atinge um nível limiar que induz a expressão de uma série de genes que geram mudanças no comportamento do grupo bacteriano, o transformando menos susceptível aos antibióticos (SOLA et al., 2012).

O sistema QS está envolvido na geração de vários fatores de virulência como a formação de biofilmes. Esses são grupos bacterianos que crescem em uma matriz de exopolissacarídeos (polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular) em uma superfície que fornece nutrientes para esse crescimento, tal agrupamento facilita a expressão dos fatores de virulência da bactéria e fornece mecanismo de defesa. A Figura 4 mostra o ciclo de formação de um biofilme, desde a agrupação de células planctônicas até a liberação de bactérias resistentes para a reprodução em novas superfícies. Os biofilmes representam a maior parte das infeções microbianas que causam endocardite, otite média, osteomielite e infecção do trato biliar (MAHMOUD; ALKHALEEFAH; SHERIF, 2013). A formação de um biofilme representa uma ameaça indiscutível, em vista de que os tratamentos antibacterianos não erradicam completamente esses agrupamentos. Os antibióticos convencionais são simplesmente formulados para atacar células isoladas ou planctônicas e não conseguem atacar diretamente o biofilme (DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2015)



Figura 4. Diagrama de formação de um biofilme e seu ciclo de dispersão. As células planctônicas se aderem em uma superfície que conta com as proteínas, carboidratos e DNA necessário para formar o biofilme. Seguidamente o biofilme cresce e madura para dar lugar a liberação de células bacterianos com características resistentes aos antibióticos. Finalmente o ciclo se renova para formar novos agregados bacterianos. Adaptado de (ESTEVES, 2016).

Em resumo, as bactérias usam diferentes vias para expressar sua resistência aos antibióticos, comunicando-se coletivamente entre si para formar biofilmes ou individualmente usando enzimas degradadoras ou modificadores de estruturas ou simplesmente acoplando-se a ambientes que lhes permitam desenvolver esses sistemas de defesa contra os antibióticos.

Para conseguir transpor esses mecanismos de AR é necessário utilizar sistemas antibacterianos que sejam mais eficazes e com efeitos mais longos. Os antibióticos sintéticos já contam com muitos relatórios de AR, em vista desse problema diversos grupos de pesquisa começaram a desenvolver novos antimicrobianos a partir de produtos naturais, a modificar os antibióticos existentes e a desenvolver peptídeos antimicrobianos. Algumas dessas estratégias já são ativamente adotadas, mas até agora não houve um resultado significativo (LI et al., 2014). Atualmente existem novos grupos de drogas em estudo (Figura 5) que poderiam ser viáveis para combater o problema de resistência aos antibióticos.



Derivados de Drogas:

Modificação da estrutura básica de antibióticos conhecidos ou desenvolvimento de inibidores de um específico mecanismo de resistência (novos β-lactamases ou inibidores da bomba de efluxo).



Drogas Antivirulentas:

Anticorpos ou compostos que bloqueiam ou inibem fatores de virulência



Drogas Especificas:

Antibióticos com uma base genômica, distribuição por bacteriófagos ou utilizando enzimas fágicas



Nanoparticulas

Uso de NP em revestimentos antibacterianos para dispositivos implantáveis, em sistemas de administração de antibióticos, em sistemas de detecção de bactérias para gerar diagnósticos microbianos, em vacinas antibacterianas para controlar infecções bacterianas e uso direto em bacterias resistentes

Figura 5. Diagrama das novas estratégias terapêuticas em estudo para combater a resistência antibacteriana. Os novos enfoques abarcam o estudo de derivados de drogas (modificações a antibióticos clássicos), drogas contra fatores de virulência, drogas sintetizadas por vias especificas e nanoparticulas.

2.3 Nanotecnologia.

De acordo com relatórios, o mercado global de nanotecnologia será valorizado em US \$ 2.231,4 milhões em 2025, crescendo a uma taxa anual composta de 10,5% de 2019 a 2025 (TEWARI; BAUL, 2019), principalmente nas indústrias de energia, alimentos, agricultura, saúde e dispositivos médicos. Em 2017, foi relatado um crescimento significativo devido ao aumento do financiamento de governos e de setores privados. A maioria desses investimentos é direcionada à área médica para o diagnóstico e tratamento de doenças crônicas como câncer, resistência a antibióticos e distúrbios cardíacos (WOOD, 2019) por tanto o campo nanotecnológico representa um lugar prometedor para estudar e desenvolver as soluções a tais problemas de saúde mundial.

O engenheiro do Instituto de tecnologia de Massachusetts (MIT), Eric Drexler definiu a nanotecnologia como uma disciplina que estuda a caracterização, produção e aplicação de materiais, estruturas, dispositivos e sistemas em dimensões na escala nanométrica (DREXLER et al., 1992).

Dentro da nanotecnologia, existem as categorias de nano-ferramentas (nanotools), nanodispositivos (nanodevices) e nanomateriais.(IQBAL; PREECE; MENDES, 2012). Os nanomateriais são aqueles que possuem propriedades morfológicas com dimensões inferiores a 100 nm. Dentro dos nanomateriais mais representativos e com maior campo de estudo estão as nanopartículas (NPs).

As nanopartículas são dispersões coloidais com um tamanho entre 1-100 nanômetros em duas ou três dimensões (MOHANRAJ; CHEN, 2006), dependendo dos graus de liberdade de movimento das partículas carregadas através de sua estrutura (DE RANIERI, 2013). Existem vários tipos de nanopartículas por exemplo polímeros a partir de materiais como pilopirrol, polianilina, poliacetilenos (PECHER; MECKING, 2010), nanopartículas metálicas como ouro (SHAMAILA et al., 2016), prata (MORONES et al., 2005), zinco (SIRELKHATIM et al., 2015), titânio (WEIR et al., 2012), etc., nanopartículas magnéticas como ferro (GUPTA; GUPTA, 2005) e cobalto (SARGENTELLI; FERREIRA, 2010) e outras como nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e pontos quânticos (HOLTZ, 2009)

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm se destacado por apresentar propriedades excepcionais no campo da biomedicina. Há 150 anos as primeiras nanopartículas de

ouro foram sintetizadas impulsionadas pelo trabalho de Faraday que foi a primeira pessoa em observar que as propriedades do ouro coloidal eram diferentes do ouro a granel (GILJOHANN et al., 2010). Quando o ouro é reduzido a seu estado neutro, esse apresenta excelentes propriedades óticas e elétricas, ótima relação superfície / volume, biocompatibilidade com alguns materiais, baixa toxicidade e múltiplas possibilidades de funcionalização na sua superfície (RODRÍGUEZ BAÑO, 2019) como é mostrado na Figura 6.

As propriedades das AuNPs dependem da forma, carga, estrutura cristalina, revestimento superficial, contaminação residual (dependendo do método de síntese) e da tendência para formar agregados. A medida que o tamanho das nanopartículas diminui, a área superficial se torna maior, por exemplo uma partícula de 5 nm possui 30% de seus átomos na superfície, entretanto uma partícula de 3 nm possui 50% de seus átomos na superfície (SOCIETY et al., 2004). O agrupamento de átomos na superfície aumenta a energia superficial, isso permite o desenvolvimento de fenômenos como umidade, capilaridade, hidrofilicidade, adsorção e adesão, portanto a diminuição do tamanho das AuNPs pode aumentar a reatividade / conjugação com outros átomos e / ou moléculas, devido a que a maioria das reações ocorrem na superfície (BAKIU, 2019).



Figura 6. Diagrama de funcionalização superficial de nanopartículas pelo incremento da relação área / volume a partir de um material a granel. A redução do ouro a um estado coloidal incrementa sua área superficial, dessa forma facilita a funcionalização na sua superfície com diversas moléculas como drogas, anticorpos, DNA, marcadores tumorais, entre outros.

As AuNPs podem absorver e dispersar a luz visível fortemente provocando desta forma que a onda eletromagnética cause uma excitação ressonante dos elétrons livres presentes nas partículas de ouro em um determinado comprimento de onda (frequência). Esse fenômeno gera uma oscilação coletiva conhecida como Plasmon de Superfície, que leva à localização do campo livre de íons positivos em direção à superfície do metal, devido a isso o efeito também é conhecido como Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) (PETRYAYEVA; KRULL, 2011). As frequências dos plasmons ocorrem na região ultravioleta (UV) para metais alcalinos e alguns metais de transição, como Cu, Ag e Au que exibem frequências plasmáticas na região visível (LU et al., 2009). Essa propriedade permite que várias técnicas analíticas que se baseiam nessa interação, possam detectar e visualizar as AuNPs em vários meios, por exemplo a técnica da espectrofotometria UV/Vis.

O efeito de LSPR é mais potencializado em nanopartículas do que em qualquer outro material, por exemplo alguns fluoróforos químicos (EL-SAYED; HUANG; EL-SAYED, 2005). Isso ocorre porque ao contrário de muitos compostos fluorescentes, as nanopartículas plasmônicas não se foto-degradam. Em vista disso, as AuNPs podem servir como marcadores fortes e robustos para biossensores, imunoensaios e imagens celulares (CHOI, Yeonho; KANG; LEE, 2009). Os campos de optoeletrônica, sensores, nanocatálise e nanomedicina fazem muito uso das aplicações geradas pelo ouro devido a sua natureza inerte e biocompatibilidade com outros materiais. (ZARGAR; HATAMIE, 2013),

Quando as AuNPs absorvem a energia da luz ressonante, elas liberam calor de acordo o comprimento de onda, esse evento pode induzir um efeito fototérmico útil em aplicações de fototerapia térmica contra células cancerígenas e bacterianas. (MOHAMED et al., 2017). A combinação de nanopartículas plasmônicas com uma fonte de energia laser pode induzir danos irreparáveis na bactéria. (ZHAROV et al., 2006).

2.4 Citotoxicidade de Nanoparticulas de ouro (AuNPs).

As nanoparticulas de ouro contam com uma banda de condução com seis elétrons livres que as tornam ideais para interagir com moléculas da membrana celular eucariota como tióis e aminas (VIJAYAKUMAR; GANESAN, 2012). A forte ligação de AuNPs com tais grupos funcionais lhes permite aderir na membrana e subsequentemente ser ingeridas para interagir com estruturas intracelulares como proteínas, lipídeos e DNA principalmente. No entanto a ruptura da membrana celular e armazenamento intracelular podem representar efeitos negativos para a funcionalidade das células dependendo do grau de toxicidade que as AuNPs podem induzir (VIJAYAKUMAR; GANESAN, 2012). Por exemplo, dentro das células as AuNPs podem incrementar a sínteses de proteínas proapoptotóicas (STECKIEWICZ et al., 2019)

A citotoxicidade das nanoparticulas de ouro pode depender do tamanho, forma, carga e funcionalização superficial, tempo de incubação, concentração, método de síntese, grau de agregação e linhagem celular testado (KHLEBTSOV; DYKMAN, 2011). Geralmente a citotoxicidade das AuNPs é tamanho-dependente, ou seja, a maior tamanho, maiores efeitos tóxicos na célula (VIJAYAKUMAR; GANESAN, 2013). Isto é devido a que o tamanho é um parâmetro que controla a eficácia da endocitose ou a ligação à forma B do DNA (KHLEBTSOV; DYKMAN, 2011). De acordo com um estudo, AuNPs de 5 nm mostraram maior citotoxicidade que 15 nm em fibroblastos murinos (CORADEGHINI et al., 2013). No entanto, em células do epitélio bronquial as AuNPs de 20 nm manifestaram maiores efeitos tóxicos que 14 nm (VETTEN et al., 2013) demostrando que a citotoxicidade também pode ser influenciada por outros fatores.

Em relação à forma, um estudo realizado em osteoblastos (células do tecido ósseo) demostrou que as AuNPs com forma de estrela possuem maior citotoxicidade em comparação com ás formas de bastão e esféricas (menos citotóxicas) (STECKIEWICZ et al., 2019). Outro estudo realizado em células HeLa confirmou que as AuNPs esféricas têm maior absorção celular em comparação com os bastões (CHITHRANI; GHAZANI; CHAN, 2006). Por tanto a forma esférica pode danificar células cancerosas em maior grau sem alterar a viabilidade de células normais.

As AuNPs com carga catiônica apresentam maior citotoxicidade que suas análogas aniônicas (ALBANESE; CHAN, 2011). Os sistemas aniônicos se ligam com menor eficiência às superfícies celulares do que moléculas neutras ou catiônicas, devido às forças de repulsão eletrostáticas da membrana celular eucariota que se encontra carregada negativamente (CHENEVIER et al., 2000). O ingresso de AuNPs aniônicas está mediada pela absorção inespecífica de proteínas séricas na superfície do metal; essas proteínas induzem as nanopartículas a entrar nas células através do processo de endocitose (CHITHRANI; GHAZANI; CHAN, 2006).

Em relação à concentração, a citotoxicidade das AuNPs está intimamente correlacionada com a quantidade de partículas dentro da célula (DENG; YAO; GAO, 2017). Em concentrações muito elevadas (> 600 µg.mL⁻¹), as AuNPs podem penetrar facilmente a membrana e acumular-se em organelas como os vacúolos (PERNODET et al., 2006). Por tanto a viabilidade celular pode ser afeitada a medida aumenta a concentração de AuNPs. Os sistemas biológicos podem responder fortemente à superfície funcionalizada de AuNPs. De acordo com a composição química dessa superfície, as AuNPs podem danificar a integridade da membrana e induzir um vazamento citoplasmático (DENG; YAO; GAO, 2017). Por outro lado, a agregação entre as partículas pode desfavorecer a absorção na membrana por endocitose e dessa forma facilitar o acumulo de partículas na membrana citoplasmática (ALBANESE; CHAN, 2011)

Os mecanismos biológicos de citotoxicidade podem variar de acordo ás características físico-químicas das AuNPs. Uma das principais vias de citotoxicidade é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KUMAR et al., 2017); (LEE; AHN; PARK, 2019) e de nitrogênio (RNS) (JIA et al., 2009) que induzem estresse oxidativo dentro da célula. Além disso a alteração do metabolismo oxidativo nas células está relacionado com danos em estruturas do citoesqueleto como o DNA (LEE, et al., 2019), mitocôndria e ativação de MPA quinases que induzem apoptoses celular (SURAPANENI; BASHIR; TIKOO, 2018).

Em alguns casos os efeitos tóxicos podem ser provocados diretamente pela molécula ou moléculas funcionalizadas na superfície das AuNPs, no entanto o processo de opsonização (adsorção de substâncias de alto peso molecular nos macrófagos em corrente sanguínea ou em um meio de cultura) pode anular esses efeitos (KHLEBTSOV; DYKMAN, 2011)

2.5 Nanopartículas de ouro como agentes antibacterianos.

A atividade antibacteriana das nanopartículas metálicas está determinada por três importantes características: Tamanho, forma e carga superficial (Figura 7) e em alguns casos pelo grau de agregação, composição superficial e concentração de NPs. Geralmente essas características são dependentes do agente redutor e estabilizante usado na síntese (MERZA et al., 2012).



Figura 7. Diagrama das principais características físico-químicas das nanopartículas de ouro (AuNPs) que influem no desenvolvimento da atividade citotóxica e antibacteriana. O tamanho, forma e carga superficial são fatores crucias para compreender os mecanismos citotóxicos e antibacterianos das AuNPs.

A parede celular de bactérias Gram-positivas possui uma espessa camada de peptidoglicano com um tamanho entre 15–100 nm. Ela está composta principalmente por ácidos teicóicos poliméricos e uma membrana citoplasmática por baixo. Por outro lado, as bactérias Gram-negativas têm uma membrana citoplasmática, uma fina camada de peptidoglicano entre 20–50 nm e ambas são protegidas por uma bicamada lipídica hidrofóbica de lipopolissacarídeos (LPS) (GUPTA et al., 2019). As AuNPs com tamanhos entre 6 – 40 nm exibem uma maior atividade antibacteriana tamanho– dependente em comparação com a tamanhos maiores (SHAMAILA et al., 2016). Estudos que utilizaram AuNPs com tamanhos dentro dessa faixa, mostraram resultados eficazes (DUDHANE et al., 2019); (KATAS et al., 2019); (CHUMS-ARD et al., 2019). Por tanto um tamanho pequeno de NPs (inferior ao tamanho da membrana bacteriana principalmente) pode facilitar os efeitos antibacterianos pela interação ou entrada das NPs na bactéria.

Um estudo que testou diferentes formas de NPs, encontrou que as formas não esféricas mostraram maior efeito antibacteriano contra *S. Aureus*, especialmente as formas de nano flores (PENDERS et al., 2017). Entretanto outro estudo utilizou AuNPs completamente esféricas para obter resultados efetivos contra *Corynebacterium*
pseudotuberculosis (MOHAMED et al., 2017) e contra *E. faecalis* (FOLORUNSO et al., 2019). Um estudo estabeleceu que em alguns casos a forma da nanoparticula não tem muita importância para poder desenvolver o efeito antibacteriano, devido à capacidade de AuNPs de liberar íons que atacam as defesas da bactéria que não vai depender se a NP é esférica ou não (SALAS OROZCO et al., 2019)

Em condições de pH fisiológico, as bactérias geralmente presentam uma carga negativa devido á dissociação de vários grupos orgânicos. No caso das bactérias gram-positivas, a dissociação é provocada pelos grupos fosfatos presentes nas cadeias poliméricas dos ácidos teicóicos, esses grupos são o ponto de ligação de moléculas catiônicas. Por outro lado, a presença de fosfatos e carboxilatos como componentes dos lipopolissacarídeos presentes nas bactérias Gram-negativas, são os responsáveis da carga negativa (NEU, 1992). A carga das bactérias pode chegar a ser mais negativa que as células mamíferas. Por tanto a interação com nanopartículas carregadas positivamente é gerada principalmente por forças eletroestáticas (STOIMENOV et al., 2002).

As moléculas anfipáticas (um extremo hidrofílico e outro hidrofóbico) conseguem penetrar a membrana celular bacteriana quando elas estão funcionalizadas principalmente em superfícies catiônicas das AuNPs (VERMA et al., 2008). Entretanto, AuNPs com compostos unicamente hidrofóbicos mostraram maior toxicidade na membrana negativa de bactérias resistentes a multidrogas (LI, Xiaoning et al., 2014). As nanopartículas com carga neutra podem apresentar um efeito bactericida de nível intermédio em comparação com NPs catiônicas e aniônicas (NABAVIZADEH et al., 2017). A grande desvantagem das NPs catiônicas é que elas podem apresentar maior citotoxicidade em células humanas em comparação com NPs negativas e neutras devido a que afetam a integridade da membrana plasmática junto com um dano a nível mitocondrial e lisossômico (LÓPEZ-LORENTE; CÁRDENAS; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, 2019). Um estudo demostrou que as NPs carregadas negativamente manifestaram baixa toxicidade em fibroblastos e mesmo assim foram capazes de matar cepas gram negativas e positivas (SALVIONI et al., 2017). A carga superficial das nanopartículas é o fator mais importante para desenvolver a atividade antimicrobiana, em visto de que as bactérias podem regular a carga elétrica de sua membrana, permitindo-lhes repelir ou permitir o ingresso de NPs (SALAS OROZCO et al., 2019). Por tanto a interação com a membrana bacteriana pode ser originada

por qualquer tipo de carga presente na superfície das AuNPs. Em vista disso, não existe um modelo ideal de AuNPs para ser utilizada em ensaios antibacterianos, os resultados podem variar de acordo com a molécula responsável pela redução e capeamento e do tipo de bactéria em estudo.

As AuNPs podem agir mediante diferentes mecanismos de ação reportados na literatura (Figura 8) como ser a produção de espécies reativas de oxigênio que são citotóxicos paras as bactérias (SALVIONI et al., 2017); (MOHAMED et al., 2017); alteração do funcionamento de estruturas intracelulares como o ribossomos (SHAMAILA et al., 2016), o DNA (ZHAO, Yuyun et al., 2010) e enzimas (SARDAR et al., 2009); ruptura da parede celular bacteriana (KATAS et al., 2019); (CHUMS-ARD et al., 2019); inativação de proteínas de transporte e cadeia de transporte de elétrons na membrana (ORTIZ-BENÍTEZ et al., 2019); incorporação de íons metálicos dentro da bactéria (SATYANARAYANA REDDY et al., 2010); inibição de fatores de crescimento, comunicação e reprodução como a formação de biofilmes (YU, Qilin et al., 2016); (SINGH, Priyanka et al., 2018), entre outros.



Figura 8. Principais mecanismos de ação antibacteriana das nanopartículas de Ouro. As AuNPs podem penetrar a membrana bacteriana e induzir danos intracelulares, além elas podem interagir com moléculas na camada bacteriana ou inibir processos de reprodução e metabolismo.

Entretanto as bactérias podem se defender dos efeitos das nanopartículas mediante dois mecanismos: (1) Produção de uma matriz extracelular que pode causar aglomeração e desativação das nanopartículas. Por exemplo a bactéria *E. coli* é capaz de sintetizar sustâncias extracelulares (SEC) como proteínas e enzimas especificas que modificam o tamanho e o potencial zeta das NPs, desta forma induzem agregação entre elas (FAGHIHZADEH et al., 2018). (2). De acordo ao entorno fisiopatológico, as bactérias podem formar uma corona de biomoléculas com funções similares as SEC, que interagem com as nanopartículas e desta forma impedem o contato com os patógenos e diminuem o efeito bactericida (SIEMER et al., 2019). Por tanto é necessário o controle de vários fatores durante o processo de síntese das AuNPs para prever uma inativação imediata no local infeccioso.

Quando uma bactéria adquire resistência contra um determinado antibiótico, todos os outros antibióticos com estrutura química similar poderiam ser susceptíveis aos mecanismos de defensa das bactérias. A grande vantagem das nanopartículas sobre os antibióticos convencionais é que elas podem executar vários mecanismos em uma mesma bactéria, dificultando a adaptação das bactérias contra as NPs (GUPTA et al., 2019). Dessa forma se diminuem as probabilidades de desenvolver resistência em comparação com os antibióticos não tratados.

As AuNPs apresentam menor toxicidade em células humanas em comparação com as NPs de prata. Os coloides de prata estão associadas com a penetração e acumulação na membrana mitocondrial causando um enfraquecimento da função mitocondrial (KATAS et al., 2019). Além disso já foram reportados vários casos de resistência bacteriana para nanopartículas de prata por *E. coli* (JOSHI; NGWENYA; FRENCH, 2012), *S. aureus* (CHOPRA, 2007) e *Salmonella* (SILVER, 2003). Em vista dessas dificuldades, o ouro tem ganhado maior reconhecimento para estudos antibacterianos que a prata, graças à segurança biológica que o núcleo de ouro fornece (YEH; CRERAN; ROTELLO, 2012).

Além de todas essas propriedades mencionadas, as nanopartículas de ouro também são excelentes veículos de drogas que facilmente passam pelas membranas celulares. Quando os antibióticos se acumulam na superfície das NPs, elas podem atacar especificamente alvos biológicos após sofrer uma modificação pelo acoplamento da molécula (ZHAO, Yuyun et al., 2010). As nanopartículas de ouro

podem se ligar a cadeias individuais de DNA de maneira não destrutiva, isto abre caminhos para aplicações de diagnóstico médico já que permite que elas passem pela vasculatura e localizem-se em qualquer órgão-alvo (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010). As propriedades físico-químicas das AuNPs lhes permitem inclusive atravessar a barreira hematoencefálica para atacar infecções neurológicas como a meningite (RIZVI et al., 2018).

As características de estabilidade, seletividade e funcionalidade facilitam a interação NPs- antibiótico e o desenvolvimento do efeito no local de ação (SARDAR et al., 2009). Essas interações podem ser de tipo não covalentes ou covalentes, onde já foi demonstrado que ambas ligações melhoram os efeitos contra as bactérias, diminuindo a concentração mínima inibitória (CMI) em comparação com o uso de antibacterianos livres (LI, Xiaoning et al., 2014).

Recentemente foi demonstrado que a síntese verde de NPs representa o método mais efetivo para obter NPs estáveis, monodispersas, econômicas, de rápida síntese e com baixos níveis de toxicidade. Diferentes recursos biológicos podem ser utilizados para a biossíntese de nanopartículas de ouro, por exemplo bactérias como cepas de *Lactobacillus casei* (KATO; YOSHIMURA; SUZUKI, 2019), *Escherichia coli* (SRIVASTAVA et al., 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (HUSSEINY et al., 2007) e *Thermomonospora sp.* (AHMAD et al., 2003), por leveduras como *Magnusiomyces ingens* (ZHANG, Xuwang et al., 2016), fungos como *Fusarium Oxysporum* (THAKKER; DALWADI; DHANDHUKIA, 2013) e filamentos de fungos termofílicos (MOLNÁR et al., 2018), algas como *Sargassum wightii* (SINGARAVELU et al., 2007) e *Chlorella vulgaris* (ANNAMALAI; NALLAMUTHU, 2015) e também utilizando extratos de plantas como *aloe vera* (MURALIKRISHNA; PATTANAYAK; NAYAK, 2014), *avena sativa* (ARMENDARIZ et al., 2004), *coffea arabica* (KEIJOK et al., 2019), virola olifeira (MILANEZE et al., 2016) romã (DASH; BAG, 2014) e derivados do chá verde.

A eficiência das nanopartículas em testes antibacterianos está baseada em duas grandes questões: (1) a mobilização das nanopartículas através de sistemas e tecidos é muito mais eficiente que a dos antibióticos, portanto haverá maior quantidade de ingrediente ativo no local de infecção e (2) as nanopartículas podem superar os mecanismos de defensa que a bactéria criou contra os antibióticos, inibir a formação

de biofilmes e comunicação intracelular e incrementar o potencial de ação de antibióticos (BAPTISTA et al., 2018)

2.6 Epigalocatequina 3-Galato (EGCG).

O chá verde é originário da China e representa uma das bebidas mais consumidas no mundo juntamente com a água e à frente de café, vinho, cerveja e bebidas carbonadas (RIETVELD; WISEMAN, 2003). Comumente se consume como infusão das folhas de *Camellia sinensis* (SHARMA; KOSANKAR, 2018). Dentro da cultura chinesa, o chá verde é um dos recursos naturais mais elogiados e apreciados. Desde os tempos antigos o chá verde começou a ser usado para tratar problemas desde dores de cabeça até depressão. No livro "Chá verde: o segredo natural para uma vida mais saudável " a autora Nadine Taylor afirmou que o chá verde tem sido usado como medicamento na China pelo menos 4000 anos atrás. Existe também um antigo provérbio chinês que diz: "É melhor não comer por três dias do que não tomar chá por um", indicando a importância do chá na vida cotidiana dos chineses (SINIJA; MISHRA, 2008).

O motivo pelo qual o chá preto não possui as propriedades biológicas do chá verde é porque esse último não passa pelo processo de fermentação, que segundo vários autores o termo apropriado seria "oxidação". As folhas do chá verde não são expostas ao ar enquanto secam, senão que são cozidas no vapor para que seus compostos fiquem estáveis. Esse vapor consegue destruir as enzimas responsáveis pela decomposição dos pigmentos coloridos nas folhas e permite que o chá preserve seus polifenóis naturais. O conteúdo de compostos fenólicos oxidados no chá preto é de 25% contra 0% no chá verde. (CHACKO et al., 2010). Os compostos químicos do chá verde em maior abundância e importância em termos de efeitos terapêuticos / biológicos são os polifenóis que estão presentes na forma de flavonoides e flavonóis. Eles estão aproximadamente entre 20-40% do conteúdo total no chá verde, dos quais o 60-80% correspondem a catequinas (RETO et al., 2007).

Existem 4 tipos de catequinas encontradas no chá verde que são: epicatequina (CE), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigalocatequina galato (EGCG). Esses compostos correspondem a isômeros *cis* das catequinas por tanto podem ser chamadas simplesmente como epicatequinas. A epigalocatequina 3-galato (EGCG) é o principal componente fenólico encontrado nas folhas frescas secas

do chá verde e corresponde a mais do 50% da massa total de catequinas (NAGLE; FERREIRA; ZHOU, 2006). A maioria das pesquisas sugerem que a EGCG é a responsável pela maioria dos benefícios potenciais à saúde atribuídos ao consumo de chá verde. A EGCG apresenta atividade antioxidante (ELBLING et al., 2005), antibacteriana (KNIDEL et al., 2019), antiviral (STEINMANN et al., 2013), antifúngica (PARK et al., 2006), antifibrinolitica (BHATTACHARYA et al., 2014), hipoglicemiante e hipolipemiante (ROGHANI; BALUCHNEJADMOJARAD, 2010), anti-inflamatória (KALAISELVI et al., 2013), efeito neuroprotetor (WEINREB et al., 2009), anti-obesidade (MOON et al., 2007), antitumoral (NAGLE; FERREIRA; ZHOU, 2006) (CHACKO et al., 2010) e remineralizador ósseo (VALI; RAO; EL-SOHEMY, 2007)

2.6.1 Epigalocatequina 3-galato como agente redutor e estabilizante de nanoparticulas de ouro.

Estudos *in vitro* indicam que o potencial terapêutico da EGCG pode variar em concentrações entre 0,5 – 500 µg.mL-1(CAI et al., 2018), entretanto a molécula apresenta uma baixa biodisponibilidade depois de uma administração oral. A EGCG pode experimentar uma baixa absorção, escassa distribuição sanguínea, baixo direcionamento, acumulo nos principais tecidos e metabolismo da primeira passagem; que inclusive com administrações intravenosas a molécula não consegue concentrações terapeuticamente efetivas. O incremento da dose de EGCG pode melhorar sua disponibilidade sistêmica, no entanto estudos experimentais em animais revelaram que as catequinas apresentam alta toxicidade doses-dependente a partir de 200µg.mL-1(MURAKAMI, 2014).

Geralmente as catequinas são muito instáveis em condições fisiológicas por causa de mudanças de pH, oxigênio, presença de iones metálicos e outros fatores de estresse. Essa instabilidade corresponde a seus grupos hidroxilas que facilmente interagem com compostos degradantes (SINGH, Brahma N.; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2011b). Diversos autores têm concordado que para erradicar esse problema é necessário utilizar um veículo que transporte a EGCG até o local de ação e que evite a rápida degradação dentro de nosso organismo.

Os nanocarreadores são sistemas de transporte de moléculas alvo ou drogas na sua superfície que agem mediante processos de direcionamento levando os substratos a um sitio de interesse. Os sistemas de transporte em base a nanoparticulas Figuram como candidatos ideais para proteger a EGCG de condições ameaçantes e melhorar sua estabilidade (KRUPKOVA; FERGUSON; WUERTZ-KOZAK, 2016). Foi comprovado que a acetilação de todos os grupos hidroxilas livres da EGCG melhorou a estabilidade, absorção celular, biodisponibilidade e atividade antitumoral em comparação com a molecular original (LAMBERT, D. et al., 2006). Portanto a proteção acetato na EGCG poderia ser representativa a um processo de redução / ligação entre a catequina e um núcleo de ouro, ou seja, as nanoparticulas de ouro seriam capazes de fornecer uma melhora na viabilidade em condiciones ameaçantes para a molécula.

A EGCG tem uma alta capacidade de formar complexos com metais por meio de seus grupos hidroxilas, especialmente usando seu grupo galato (GRANJA et al., 2017). O sal de ouro tem um potencial redox de 990mV e a EGCG tem um potencial de 420mV, isso significa que a conjugação entre os dois compostos é termodinamicamente favorável (ZHANG et al., 2014).

Depois do processo de nucleação, as nanoparticulas metálicas se caracterizam por se agregar, crescer em grandes "clusters" e eventualmente se precipitar. Para superar tal problema, é necessário o uso de agentes estabilizantes que sejam não tóxicos, não imunogênicos, biocompatíveis e que possam garantir a integridade das nanoparticulas dentro de um sistema biológico (KATAS et al., 2019). A vantagem de utilizar EGCG na síntese verde de NPs é que ela tem uma dupla função como agente redutor e agente estabilizante.

A EGCG na superfície das AuNPs é capaz de manter a estabilidade sem mostrar agregação durante meses. As moléculas antioxidantes como a EGCG conseguem proteger os núcleos metálicos de condições estressantes e retardam sua degradação humoral. Esses benefícios contribuem a uma liberação controlada das drogas e a melhorar sua biodisponibilidade (CAI et al., 2018)

A EGCG representa uma molécula ideal para síntese de nanoparticulas de ouro porque diminui a necessidade de usar agentes químicos tóxicos adicionais durante a produção e consegue manter suas propriedades biológicas ainda acoplada na superfície de um núcleo de ouro.

2.6.2 Atividade citotóxica e antibacteriana da Epigalocatequina 3-Galato (EGCG).

A EGCG pode penetrar facilmente a membrana citoplasmática eucariota graças a seu caráter lipossolúvel. Dessa forma pode danificar componentes como proteínas, lipídeos e DNA (ELBLING et al., 2005). No entanto a molécula também é capaz de induzir a morte celular a partir de uma destruição severa da membrana (YU; SHEN; XIONG, 2005).

As principais vias citotóxicas da EGCG são a quelação com metais por meio de seus grupos hidroxilas do anel B e D (Figura 9). A ligação com metais incrementa a citotoxicidade por vias apoptóticas (YU; SHEN; XIONG, 2005). A EGCG também pode induzir estresse oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Devido a sua instabilidade em condições *in vitro*, a EGCG facilmente pode ser oxidada levando à formação de radicais livres (WEISBURG et al., 2004). De acordo com um estudo a EGCG pode causar formação de peroxido de hidrogênio por interação com sais no meio (ROQUES et al., 2002), esse produto contribui à atividade citotóxica da molécula.

Outro mecanismo relatado é o colapso do potencial da membrana mitocondrial. Dessa forma a EGCG consegue reduzir os níveis intracelulares de ATP, ativar algumas enzimas degradativas e liberar ativadores da caspase que vão induzir apoptose celular (ZHANG et al., 2008). A EGCG também pode interagir com receptores de membrana relacionados com a proliferação celular (TAKADA et al., 2002); (UESATO et al., 2001) e promover a redução dos telômeros (WEISBURG et al., 2004).

Geralmente a atividade citotóxica *in vitro* da EGCG está relacionada com o combate de células cancerosas. A atividade quimiopreventiva da EGCG foi comprovada pela grande afinidade da molécula para inibir a proliferação de linhas celulares de carcinoma do que células normais (BABICH et al., 2005)



Figura 9. Estrutura molecular da Epigalocatequina 3-Galato (EGCG) proveniente do chá verde. A molécula com anéis polifenólicos (A e B) incluindo uma porção denominada galato (anel D).

A atividade antibacteriana da EGCG pode estar relacionada com sua estrutura molecular (Figura 9). Foi estabelecido que as catequinas com a porção galato tem maior efeito antibacteriano do que aquelas sem essa porção (KAJIYA et al., 2004). As catequinas têm duas formas de imagens no espelho, uma forma (+) e outra forma (-), onde as catequinas (+) tem efeito antioxidante e as catequinas (-) induzem oxidação e morte celular (BRAICU et al., 2013; PADIYARA; INOUE; SPRENGER, 2018), isso poderia ser um mecanismo prejudicial para as bacterias. No entanto, tais efeitos anti e pró-oxidantes dependem da dose, tempo de administração e interação com outros compostos (HIGDON; FREI, 2003; PARK et al., 2006).

O mecanismo antibacteriano exato da EGCG não tem sido totalmente elucidado. Entretanto já foi estabelecido que a EGCG pode agir como um composto bactericida em certas concentrações e bacteriostático em concentrações diferentes (ROCCARO et al., 2004). Geralmente a EGCG consegue se aderir diretamente à camada peptidoglicana das paredes bacterianas causando danos aos peptídeos reticulados e, portanto, danificando as paredes celulares (MAHMOUD; ALKHALEEFAH; SHERIF, 2013).

Alguns autores estabelecem que a EGCG é mais efetiva contra bacterias Gram positivas devido a que a membrana externa das gram negativas pode prever até certo ponto a união da EGCG à camada de peptidoglicano (NIKOO; REGENSTEIN;

AHMADI GAVLIGHI, 2018). Mediante microscopia de força atômica (AFM) foi confirmado que a EGCG se liga diretamente na camada de peptidoglicano de Gram positivas como a *S. aureus*, causando danos na parede celular. Por outro lado, o dano provocado na parede celular de Gram negativas como a *E. coli*, foi principalmente induzido por produção de peroxido de hidrogênio. Por tanto o mecanismo antibacteriano da EGCG pode variar de acordo a morfologia da bactéria (CUI, Yidan et al., 2012).

A EGCG também pode danificar proteínas de membrana e conteúdo citoplasmático como lipídeos e enzimas (ZHAO, Lin et al., 2013). A EGCG consegue se ligar a proteínas bacterianas especificas que são resistentes à solubilização com detergentes iônicos. O principal alvo encontrado na bactéria *E. coli* são as porinas (proteínas da membrana externa) e na bactéria *Bacillus subtilis* são proteínas de membrana transportadoras como o oligopeptídeo ABC (NAKAYAMA et al., 2015). Outro estudo revelou que a EGCG se liga nas subunidades ATP B da DNA girase bacteriana, prevenindo o superenrolamento do DNA e por conseguinte induzindo a morte celular (REFLAN; MEIDYAWATI; INDRAWATI, 2019).

Foi também demostrado que a EGCG pode alterar a morfologia celular das bacterias, como resultado de efeitos perturbadores no processo de divisão celular (NIKOO; REGENSTEIN; AHMADI GAVLIGHI, 2018). Quando a EGCG ingressa na bactéria pode provocar uma inibição enzimática, vazamento do conteúdo celular, aumento da permeabilidade e indução de estresse oxidativo (EFENBERGER-SZMECHTYK; NOWAK; CZYZOWSKA, 2020)

A EGCG pode colaborar em conjunto com outros antibióticos em processos onde o efeito dos antibióticos não é suficiente para atingir uma resposta terapêutica (KAYA et al., 2019). Foi demostrado que com a penicilina houve uma inibição da enzima penicilinase por ambos compostos, isto gerou um aumento da ação terapêutica antibacteriana (HEMAISWARYA; KUMAR; DOBLE, 2008). A EGCG também é capaz de restaurar a susceptibilidade de certos antibióticos contra patógenos multirresistentes como o Aztreonam (fármaco β-lactamico). Por tanto a EGCG não tem somente a capacidade de induzir a morte celular bacteriana, senão também ela pode tornar as bactérias mais sensíveis aos efeitos dos antibióticos (RAHARDIYAN, 2019).

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo geral.

Analisar mediante ensaios *in vitro* a atividade citotóxica e antibacteriana de nanoparticulas de ouro reduzidas com epigalocatequina 3-galato (EGCG).

3.2 Objetivos específicos.

- Sintetizar nanoparticulas de ouro estáveis em condições fisiológicas e na ressuspensão em água, PBS, DMSO e caldo Mueller-Hinton de cátion ajustado.
- Avaliar a citotoxicidade das AuNPs-EGCG e da EGCG em fibroblastos murinos (L929) e queratinocitos humanos (HaCaT).
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e o número de unidades formadoras de colônia por mL de solução (UFC/mL) após 48 horas de tratamento com AuNPs-EGCG e EGCG nas bacterias em estudo.
- Verificar a presença de alterações morfológicas nas bacterias em estudo por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4. MÉTODOS E MATERIAIS.

4.1 Síntese de AuNPs-EGCG.

Para a síntese de AuNPs-EGCG utilizou-se uma solução 2.5×10^{-4} M de ácido tetracloroaurico (HAuCl₄) e (-) Epigalocatequina 3-Galato (E4143 \ge 95% pureza HPCL), ambos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Merck Co. Ltda., Brasil). A proporção de síntese foi 3:1 de ouro para extrato. As AuNPs-EGCG foram sintetizadas usando as seguintes condições: Concentração de EGCG: 0.17 mg/mL, pH da solução de EGCG: 7.2, tempo de reação: 10 minutos, temperatura: 25°C e rotação: 600 rpm (SCHUENCK, 2018).

A vidraria utilizada foi previamente lavada 3 vezes com água regia (1 HNO₃:3 HCl), 3 vezes com água destilada e 1 vez com água ultrapura para conseguir tirar qualquer resíduo que possa interferir no processo. Tanto a síntese de AuNPs-EGCG, solubilização da EGCG, preparação de soluções e ensaios foram realizados com água ultrapura.

4.2 Ressuspensão de AuNPs-EGCG em agua, PBS, DMSO e caldo Mueller Hinton de cátion ajustado.

A comportamento das nanoparticulas foi estudado em solventes de uso comum em ensaios antibacterianos e de citotoxicidade celular. Uma alíguota de 1 mL de AuNPs-EGCG foi centrifugada em 6.000, 8.000, 10.000, 12.000 e 14.000 rpm (ou 7.231, 9.642, 12.052, 14.462 e 16.873 rcf) durante 5, 10 e 20 minutos (um total de 15 experimentos), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressupendido em 1 mL de água ultrapura. Como controle se utilizou 1 mL de nanoparticulas não submetidas a centrifugação. As nanoparticulas foram homogeneizadas е lidas em espectrofotômetro UV/Vis (Hibrido Synergy H1) de 200 - 800 nm com intervalos de 1nm. Os gráficos foram obtidos pelo software Origin Pro 8.5.0. A partir das condições ótimas com água ultrapura, as AuNPs-EGCG foram centrifugadas e resuspendidas nos seguintes meios líquidos: Dimetilsulfóxido 10% (DMSO), Tampão fosfato-salino 0.1 M (PBS) e caldo Mueller Hinton de cátion ajustado (MH+) (22 gramas em 1 litro de água). Os resultados foram analisados no software Origin Pro 8.5.0 versão livre avaliando os parâmetros de largura de banda à meia altura (FWHM), lambda máximo (λ) e absorbância máxima (Abs. Max.).

4.3 Grau de Floculação.

Com a finalidade de estudar a estabilidade das nanoparticulas em condições fisiológicas, foi utilizado um parâmetro de floculação para determinar o nível de agregação entre elas (MULVANEY, 1996). Uma alíquota de 1 mL de AuNPs-EGCG foi centrifugada a 14.000 rpm (16.873 rcf) por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi resuspendido em 1 mL de diferentes soluções de cloreto de sódio (NaCl) e pH. As concentrações de NaCl foram 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 mM e as soluções aquosas de pH foram de 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 (ajustando com HCl e NaOH 0.1 M). Como controle se utilizou 1 mL de AuNPs-EGCG centrifugado e ressuspendido em água ultrapura. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente e em triplicata. As amostras foram lidas em espectrofotômetro UV/Vis (Hibrido Synergy H1) de 200 – 800 nm com intervalos de 1nm. Os gráficos foram analisados no software Origin Pro 8.5.0 e construídos no *GraphPad Prism 6* versão livre.

4.4 Potencial Zeta.

Para determinar a carga superficial, as AuNPs-EGCG foram analisadas em duplicata no instrumento analisador de partículas Microtac Zetatrac modelo MN401 utilizando aproximadamente de 2mL do coloide. Os valores foram expressos em mV.

4.5 Ensaio in vitro de citotoxicidade celular.

Para avaliar a citotoxicidade das AuNPs-EGCG foi utilizado o ensaio de MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). O método se baseia na redução mitocondrial-dependente do composto de MTT a formazan para conseguir medir a respiração celular como um indicador de viabilidade celular. O teste foi realizado em duas linhagens celulares cutâneas: células de fibroblastos murinos (L929) (ATCC® CRL-6364[™]) e queratinócitos não tumorigênicos humanos (HaCaT) (BCRJ código: 034).

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² contendo meio essencial mínimo de dulbecco (DMEM) (Sigma Aldrich) suplementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina / estreptomicina como antibiótico. O DMEM utilizado para as células HaCaT foi high glicose e para células L929 foi low glicose. As células foram mantidas a 37°C em uma incubadora umidificada contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) (COM-19ICVU- Panasonic).

A suspenção celular foi preparada em uma concentração de 7x10⁴ para células HaCaT e 8x10⁴ para células L929, e logo foram distribuídas em placas de cultura 96 poços contendo 150 µL de células/poço. Imediatamente as placas foram incubadas a 37°C por 24 hrs para as células crescerem. No dia seguinte, 50 µL de amostra entrou em contato com as células aderidas na placa, testando por triplicata 5 diferentes No caso de AuNPs - EGCG e a EGCG foram utilizadas concentrações. concentrações de 120, 60, 30, 15 e 7.5 µg.mL⁻¹ e para a solução de ouro (HAuCl₄) foram utilizadas concentrações de 85, 42.5, 21.25, 10.63 e 5.31 µg.mL⁻¹. Os cálculos para concentrar as AuNPs-EGCG se encontram detalhados no Anexo 8.1. Também foi preparado um controle positivo (células sem nenhuma amostra), branco de DMSO e brancos de nanoparticula para eliminar a interferência da coloração. Depois de 24 hrs de incubação, o sobrenadante de cada poço foi retirado e foi adicionado 100 µL de MTT (1mg/mL) e novamente as placas foram incubadas durante 2 hrs para o MTT entrar na mitocôndria. Depois disso o MTT foi retirado de cada poço e foi adicionado 100 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan formados. Subsequentemente a absorbância foi medida em 595 nm usando um espectrofotômetro UV/Vis. A densidade óptica média (DO, absorbância) foi utilizada para calcular a porcentagem de viabilidade celular da seguinte forma: porcentagem de viabilidade celular = (Atratamento - Abranco) / (Acontrol - Abranco) × 100% (onde A = absorbância). O 50% da concentração inibitória máxima (IC50) de cada amostra foi calculado mediante o software Microsoft Excel 2016 para cada linhagem celular.

4.6 Avaliação in vitro da Atividade Antibacteriana.

A atividade antibacteriana *in vitro* das AuNPs-EGCG e da EGCG foi avaliada em quatro diferentes bacterias (Tabela 2), correspondentes a grupos gram positivos e negativos com cepas ATCC e clínicas. O grupo de patógenos selecionados para o teste correspondem em sua maioria ao grupo ESKAPE (*Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e espécies *Enterobacter*). Essas bacterias têm sido amplamente estudadas porque são a principal causa de infecções nosocomiais e por ter resistência a múltiplas drogas (YUSSOF et al., 2019)

Inicialmente se realizou uma triagem para avaliar o espectro de ação antibacteriano das AuNPs- EGCG utilizando uma concentração de 1000 µg.mL⁻¹. O teste se realizou usando o método de microdiluição em caldo. Foram preparadas suspensões

bacterianas equivalentes a 0.5 na escala McFarland (~ $1.5x10^8$ UFC/mL). Uma alíquota de 20 µL da suspensão bacteriana foi inoculada em 180 µL de AuNPs-EGCG (1000 µg.mL⁻¹) em uma placa de 96 poços com três repetições biológicas. As placas se incubaram a 37°C em estufa bacteriológica. Após 24 horas foi medida a densidade ótica (OD) da suspensão bactéria a 600 nm. Como controle se utilizou uma suspensão não tratada. Foram calculadas percentagens de inibição no software *GraphPad Prism* 6 para determinar quais bacterias em estudo são susceptíveis ao tratamento com concentrações elevadas de AuNPs-EGCG.

 Tabela 2. Grupo de bacterias gram-positivas e negativas em estudo para ensaios antibacterianos.

Tipo de Bactéria	Cepa ATCC	Cepa Clínica
Gram (+)	Staphylococcus aureus 25923	Staphylococcus aureus 10A
	Enterococcus faecalis 29212	Enterococcus faecalis 6885
Gram (-)	Pseudomonas aeruginosa 27853	Pseudomonas aeruginosa 93B
	Escherichia coli 25922	Escherichia coli ESBL

4.6.1 Construção das curvas de inibição e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada através do método de microdiluição em caldo de acordo com a metodologia estabelecida pelo manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

As bacterias foram cultivadas em ágar nutriente por 24 horas a 37° C. A partir do crescimento em placa foram preparadas suspensões em caldo Mueller Hinton de cátion ajustado (MH+), equivalente a escala 0.5 McFarland (~1.5x10⁸ UFC/mL). As suspensões foram diluídas em uma proporção de 1:10 de bactéria para amostra (JR.; CHAN; KRIEG, 1996). Um volume de 0.15 mL de bactéria foi inoculado em 1.5 mL de amostra, obtendo um volume final de 1.65 mL. A concentração bacteriana final foi de ~1.5x10⁷ UFC/mL. Avaliaram-se 5 concentrações de amostra de AuNPs-EGCG e de EGCG (120, 60, 30, 15 e 7.5 µg.mL⁻¹) diluídas em caldo MH+, acompanhado de um controle não tratado e uma solução de glutaraldeído 2.5% como controle negativo (GORMAN; SCOTT; RUSSELL, 1980). A concentração de AuNPs-EGCG foi realizada de acordo ao Anexo 8.1. As suspensões foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C.

Uma alíquota de 200 µL de cada amostra (~3x10⁶ UFC/mL) foi transferida a uma microplaca de 96 poços com duas repetições biológicas. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37⁰C. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV/Vis (Hibrido Synergy H1) a 600 nm (comprimento de onda especifico que não prejudica ou dificulta o crescimento bacteriano) no tempo zero e após 12, 24 e 48 horas para analisar o crescimento da bactéria em função do tempo. Juntamente foram lidos os brancos das diferentes concentrações de cada amostra. As curvas de inibição foram construídas no software *GraphPad Prism* 6. O detalhamento deste procedimento experimental pode ser verificado no esquema apresentado na Figura 10



Figura 10. Esquema da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e construção das curvas inibição após tratamento com AuNPs-EGCG, EGCG e glutaraldeído nas bacterias em estudo.

4.6.2 Quantificação do número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/ML)

O número de UFC/mL foi determinado usando o método de contagem em placas (Figura 11) (MOHAMED et al., 2017). Adicionou-se 3 mL/poço de meio de cultura ágar Mueller Hinton em uma placa 12 poços. As placas foram levadas a incubação a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica para verificar a esterilidade do meio de cultura. Uma alíquota de 20µL de cada suspensão bacteriana descrita no protocolo 4.6.1 após 48 horas de tratamento, foi plaqueada no ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Foram tiradas fotos de cada poço com um enfoque de oito mil vezes utilizando o software LAS EZ do estereomicroscópio Leica Microsystems ®. Cada foto foi analisada no software Image J para determinar o número de colônias em cada imagem. Para determinar o número de UFC/mL utilizouse a seguinte formula:

UFC/ mL = número de colônias x (1 / nível de diluição) x (1 / volume da alíquota)

Onde: Nível de diluição: 1: 10 por tanto seria 10⁻¹



Figura 11. Esquema da contagem do número de unidades formadoras de colônias por mililitro de solução (UFC/mL) das bacterias em estudos tratadas com AuNPs-EGCG, EGCG e glutaraldeído.

4.7 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das bacterias após tratamento com AuNPs-EGCG foi avaliado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O teste foi realizado com as cepas clinicas e com o tratamento correspondente ao valor de CMI das AuNPs-EGCG para cada bactéria. O teste foi acompanhado de um controle não tratado de cada bactéria.

As suspensões de E. coli e P. aeruginosa foram centrifugadas a 3000 rpm (3.616 rcf) por 2 minutos, a S. aureus foi centrifugada a 6000 rpm (7.231 rcf) por 1 minutos e a E. faecalis a 6000 rpm (7.231 rcf) por 4 minutos. Após cada etapa do protocolo, as suspensões foram centrifugadas e os sobrenadantes foram descartados. O pellet formado de bacterias foi lavado com PBS e com um tampão fixador (glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.2) durante 24 horas. Após fixação, as amostras foram lavadas novamente com tampão cacodilato 0.1 M e pós-fixadas com tetroxido de ósmio (OsO₄) 1% e uma solução de tampão cacodilato mais ferrocianeto de potássio 2.5% por 40 minutos. Foi realizado novamente uma lavagem com tampão cacodilato e água. As amostras foram desidratadas com banhos de álcool de 30, 50, 70, 90 e 100%. Após desidratação, aproximadamente 10 µL de amostra foi goteada em uma lamínula de vidro e foi levada para secar durante 1 hora e meia em ponto crítico (Autosamdri®-815). Posteriormente foram metalizadas com ouro durante 2 minutos no Denton Vacuum Desk V HP. As imagens foram obtidas por meio do microscópio eletrônico de varredura JSM-6610LV, JEOL, Usa Inc. operado a 20kv, usando aumentos de 10.000X e 20.000X para obter informações sobre a interação das AuNPs-EGCG com as bacterias tratadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese de AuNPs-EGCG

As nanoparticulas foram sintetizadas e caracterizadas via o plasmon de superfície apresentado no espectro de absorção na região UV/Vis. A síntese de AuNPs-EGCG foi confirmada pela mudança de coloração a vermelho da solução coloidal. O efeito de LSPR observado em 527 nm (o maior ponto de absorbância) é produto da oscilação coletiva dos elétrons induzidos pelo campo eletromagnético conforme na Figura 12. Esse fenômeno depende do tamanho, forma, morfologia, composição e ambiente dielétrico das nanoparticulas produzidas. O valor de estreitamento da banda (FWHM) sugere que as nanoparticulas sintetizadas se encontram monodispersas na solução sem sinais de agregação. As AuNPs-EGCG apresentaram maiormente uma forma esférica (razão de aspecto 1.10) e um tamanho de aproximadamente 14.54 nm (SCHUENCK, 2018).



Figura 12. Espectro de absorção UV/Visível da síntese de AuNPs-EGCG. A síntese foi caracterizada pelo efeito de ressonância plasmonica de superfície em 527 nm. A banda sugere uma boa dispersão e uniformidade de tamanho e forma de acordo ao valor de FWHM.

As nanoparticulas foram sintetizadas pelo método de oxido-redução onde a EGCG agiu como agente redutor, por tanto a catequina se oxidou e o ouro se reduziu a seu

estado neutro. A EGCG se caracteriza por ter grupos hidroxilas altamente nucleofílicas que facilmente podem sofrer uma desprotonação em água.

No primeiro passo do processo de síntese, a EGCG libera átomos de hidrogênio e desta forma incrementa-se a nuvem eletrônica ao redor do oxigênio do grupo hidroxila. Alternativamente o ouro (Au⁺³) adquire um par de elétrons dos átomos de oxigênio da EGCG que levam a redução a produtos intermediários como Au⁺² e Au⁺¹ e finalmente à formação de Au⁰ (ouro coloidal) como pode ser observado na Figura 13A.

O produto final da síntese é um coloide onde o ouro se encontra revestido por uma nuvem de moléculas de EGCG ligadas por meios de interações eletroestáticas que estabilizam o sistema. De acordo com um estudo de ressonância magnética nuclear de prótones (H⁻¹ NMR), os principais pontos de interação da molécula de EGCG são as hidroxilas do anel B e do grupo galato (anel D). As hidroxilas do anel A apresentam maior blindagem em processos oxido-redução (CHANDRA et al., 2012). Por tanto isso poderia indicar que alguns grupos hidroxilas do anel B e do grupo galato participam no processo de redução do ouro e que as hidroxilas do anel A ficam disponíveis na superfície metálica após da síntese tal como o representa o esquema da Figura 13B.

Quando a EGCG é desprotonada, ela gera um radical livre. No entanto, esse composto intermediário experimenta rapidamente um processo de deslocalização de elétrons para formar um produto mais estável correspondente a uma quinona conforme na Figura 13C. Em condições *in vitro* a EGCG pode sofrer um processo de auto-oxidação, onde a catequina produz superóxido radicais (O₂⁻) capazes de reagir com outras moléculas de EGCG e desta forma produzir H₂O₂ toxico para a célula. A auto-oxidação da EGCG tende a reduzir sua vida meia dentro das células (ISHI et al., 2011), que vai reverberar na biodisponibilidade *in vitro* da molécula.



EGCG



Figura 13. Esquema do processo de síntese de AuNPs-EGCG (A) Desprotonação do grupo hidroxila da EGCG e redução do ouro a seu estado coloidal. (B) Adsorção da EGCG na superfície do núcleo de ouro por meio de interações eletroestáticas que estabilizam o sistema. (C) Auto-oxidação da EGCG levando à formação de um radical livre e subsequentemente a uma quinona.

5.2 Ressuspensão de AuNPs-EGCG em água, PBS, DMSO e Caldo Mueller Hinton de cátion ajustado.

O comportamento das AuNPs-EGCG resuspendidas foi analisado por meio das bandas de absorção formadas na região UV/Vis e avaliando parâmetros relacionados com o rendimento máximo (absorbância máxima), a dispersão (FWHM) e o controle

da forma e tamanho (lambda máxima). A Figura 14 mostra os espectros de absorção UV/Vis obtidos da centrifugação e ressuspensão de NPs em água. Observa-se a formação de bandas plasmônicas em cada experimento indicando que as NPs conseguiram sedimentar-se com sucesso após centrifugação mantendo o efeito de LSPR. Entretanto as diferentes formas das bandas de absorção são o resultado de variações na concentração e dispersão do *pellet* ressuspendido.



Figura 14. Espectro de absorção UV/Vis das AuNPs-EGCG centrifugadas nas condições de 6000, 8000, 10000, 12000 e 14000 rpm durante 5, 10 e 20 minutos (total de 15 experimentos) e posteriormente ressuspendidas em água ultrapura. Os experimentos foram realizados em triplicata.

De acordo com os resultados da Tabela 3, após da centrifugação as AuNPs-EGCG mostraram um ligeiro deslocamento hipsocrômico (também conhecido como deslocamento azul) com respeito ao lambda máximo do controle, que foi devido a um efeito de solvatocromismo (AL-SHERBINI, 2013). O fenômeno de solvatocromismo ocorre principalmente em complexos metálicos dependendo do grau de polaridade do solvente. O solvatocromismo é induzido por mudanças na coloração do soluto quando esta dissolvido em um determinado solvente. Essas mudanças alteram a densidade de elétrons das substancias (DE SOUZA; CORIO, 2019). Por tanto a diminuição da

cor vermelha das AuNPs-EGCG junto com a alta polaridade da agua, podem induzir uma deslocalização a estados de maior energia (comprimentos de onda menores). Essas mudanças podem ser manifestadas com leves variações de tamanho e forma por causa da formação de pequenos agregados na solução tal como é observado na Tabela 3 onde se mostram variações nos valores de FWHM, indicando que em alguns casos as NPs podem ficar mais polidispersas depois de ser centrifugadas. Usualmente essas mudanças de entalpia no sistema estão relacionadas com uma diminuição do tamanho das nanoparticulas (KHAN et al., 2011).

Tabela 3. Resultados dos parâmetros avaliados (FWHM, λ máximo e absorbância máxima) após a centrifugação e ressuspensão de AuNPs-EGCG em água ultrapura.

Rotação / Tempo	FWHM	λ máximo	Abs. Max.
Controle	54,2519	527	0,4364
6000 rpm / 5 min	38,0309	521	0,0782
8000 rpm / 5 min	45,4955	522	0,1133
10000 rpm / 5 min	49,5316	524	0,1495
12000 rpm / 5 min	49,4562	524	0,1969
14000 rpm / 5 min	51,9155	522	0,2389
6000 rpm / 10 min	54,2918	522	0,2539
8000 rpm / 10 min	54,3059	523	0,3414
10000 rpm / 10 min	54,2425	523	0,3756
12000 rpm / 10 min	53,8241	525	0,3931
14000 rpm / 10 min	53,8645	523	0,3952
6000 rpm / 20 min	54,3263	522	0,2083
8000 rpm / 20 min	54,3415	523	0,3565
10000 rpm / 20 min	54,2384	523	0,3696
12000 rpm / 20 min	54,1925	525	0,3815
14000 rpm / 20 min	53,5898	525	0,3992

As AuNPs-EGCG que foram submetidas às rotações testadas durante 10 e 20 minutos apresentaram um bom rendimento (Abs. Máx.) e dispersão mais uniforme (FWHM)

com respeito ao controle. Por ser um solvente prótico, a água apresenta uma constante dielétrica elevada, ligações de hidrogênio e dois polos elétricos que podem interagir com cargas catiônicas e aniônicas presentes na superfície das NPs. Essas características fazem que as AuNPs-EGCG sejam facilmente recuperadas em água devido a sua alta capacidade de solvatação (LIU et al., 2016). Por outro lado, os experimentos executados durante 5 minutos apresentaram menor concentração, indicando que um grande volume de NPs ficou submerso no sobrenadante. Nestas condições se observou um alargamento da banda plasmônica à medida foi diminuindo as condições de tempo e rotação. O tempo de centrifugação foi um fator determinante no processo, devido a que a maior tempo, maior foi o volume de NPs sedimentadas.

De acordo com os resultados da Tabela 3 as condições de rotação de 14000 rpm / 20 minutos apresentaram o valor maior de absorbância e um valor ótimo de FWHM, indicando que as nanoparticulas tiveram uma boa dispersão e maior rendimento após ressuspensão. Essas condições foram selecionadas para a ressuspensão nos próximos solventes que são usados em ensaios de citotoxicidade e antibacterianos.



Figura 15. Espectro de absorção UV/vis das AuNPs-EGCG centrifugadas a 14000 rpm durante 20 minutos e ressuspendidas em DMSO, tampão PBS e Caldo Mueller-Hinton de cátion ajustado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Conforme no espectro UV/Vis da Figura 15, pode ser observado a presença da curva correspondente ao efeito de ressonância plasmonica na superfície das AuNPs-EGCG em todas as ressuspensões realizadas. Entretanto observa-se também uma notável diminuição da banda de absorção com respeito ao controle tal como foi demostrado no parâmetro de absorbância máxima das NPs da Tabela 4, devido a interações com os solventes testados.

Tabela 4. Resultados dos parâmetros avaliados (FWHM, λ máximo e absorbância máxima) de AuNPs-EGCG centrifugadas a 14000 rpm / 20 minutos e ressuspendidas em DMSO, tampão PBS e Caldo Mueller Hinton de cátion ajustado.

Solvente	FWHM	λ máximo	Abs. Máx.
Controle	54,13288	527	0,43313
DMSO	55,38419	525	0,31985
Tampão PBS	55,23362	525	0,33615
Caldo Mueller Hinton de cátion ajustado	53,79163	526	0,34156

A interação com solventes nucleofilicos pode gerar uma diminução na circulação de dos eletróns livres na superficie das NPs. Os eletróns livres do solvente podem incrementar a carga eletronica das NPs e dessa forma induzir uma diminuição a sua condutividade, tambem manifestada com uma diminução do efeito plasmônico (LSPR) (KHAN et al., 2011). O DMSO é um solvente polar aprótico que possui em sua estrutura um centro de enxofre e um oxigenio altamente nucleofílicos. Além disso sua capacidade de solvatação limita-se a interagir unicamente com cátions sem formação de pontes de hidrogênio (RODRÍGUEZ-GATTORNO et al., 2002). Por tanto, o contato com DMSO pode gerar uma diminuição do volume de AuNPs-EGCG ressuspendidas, refletido com uma dimunição do valor de absorbância máxima e da banda de absorção como foi evidenciado na Figura 15.

O caldo MH+ possui um ajuste de cátions de calcio e magnesio livres em solução aquosa. Tal solvente pode agir como um sistema eletrofilico capaz de estabilizar a carga eletrônica em torno das NPs. Esse fenômeno tambem ocorre com o tampão PBS por causa da carga iônica presente na solução isotônica. Ambos solventes apresentaram os maiores valores de rendimiento (Abs. Máx.) após ressuspensão. Como foi observado na ressupensão em água, as AuNPs-EGCG tambem apresentaram um deslocamento azul nos outros solventes testados, indicando a formação de pequenos agregados durante a centrifugação conforme na Tabela 4. Por tanto as AuNPs-EGCG apresentaram uma ótima estabilidade e rendimento nas

maiores condições de centrifugação testadas e na ressuspensão em solventes próticos e eletrofilicos.

5.3 Análise da estabilidade das AuNPs-EGCG.

A estabilidade das AuNPs-EGCG foi analisada simulando condições fisiológicas de sais e de pH, utilizando um parâmetro de floculação que mede a capacidade das AuNPs-EGCG de formar agregados em altos níveis de estresse iônico a partir de um método semi-quantitativo baseado no espectro de absorção entre 600 – 800 nm (MULVANEY, 1996).

A Figura 16A mostra que as AuNPs-EGCG não apresentaram formação de agregados em nenhuma concentração de cloreto de sódio testada. Como pode ser observado as bandas de absorção não mostraram alterações com respeito ao controle. A área abaixo da curva no intervalo de 600 a 800 nm se manteve estável com respeito ao controle sem mostrar algum tipo de deslocamento na banda de absorção como pode ser visto no gráfico da Figura 16B (p < 0.05). A concentração de 200 mM representa o dobro da concentração normal de sódio em sangue. Por tanto as AuNPs-EGCG mostraram uma ótima estabilidade em presença de uma elevada concentração de solução salina.



Figura 16. (A) Espectro de absorção UV/Vis das AuNPs-EGCG em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (B) Gráfico do grau de floculação das AuNPs-EGCG em diferentes concentrações de NaCl, a partir da área entre 600 – 800 nm. Os resultados são representados como a média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata.

Em relação ao pH, as AuNPs-EGCG se mantiveram estáveis nas condições de pH de 1 - 9, sem mostrar alterações no intervalo de 600 - 800 nm das bandas de absorção tal como pode ser observado na Figura 17 (p < 0.05). Esse resultado é favorável para a EGCG porque em pH ácidos (2 - 5.5), a molécula pode experimentar um processo de epimerização a sua forma trans (KRUPKOVA; FERGUSON; WUERTZ-KOZAK, 2016). Essa alteração estrutural inativa a EGCG e desta forma se diminui a biodisponibilidade *in vitro.* Por tanto o sistema coloidal de ouro poderia ser uma solução viável para transpor esse problema.



Figura 17. (A) Espectro de absorção UV/Vis das AuNPs-EGCG em uma faixa de pH de 1 -13 (B) Gráfico do grau de floculação das AuNPs-EGCG em uma faixa de pH de 1 -13, a partir da área entre 600 – 800 nm. Os resultados são representados como a média \pm erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata. **** *p* < 0.0001 vs. controle.

Em condições mais básicas (11 – 13) as AuNPs –EGCG manifestaram floculação tal como pode ser observado no intervalo de 600 – 800 nm das bandas de absorção correspondentes (Figura 17A). A agregação formada também pode ser evidenciada pelo incremento da área abaixo da curva no intervalo de estudo conforme na Figura 17B (p < 0.0001). Observa-se que a maiores níveis de pH existe maior agregação entre as NPs. A desestabilização em pH extremamente básicos pode ser explicada pela desprotonação dos grupos hidroxilas da EGCG. Esse evento pode induzir uma oxidação de tais grupos funcionais e, por conseguinte uma perda da função estabilizante da EGCG.

As partículas coloidais dispersas em solução estão carregadas eletricamente devido a suas características iônicas. O potencial zeta das NPs é o resultado da magnitude das forças eletrostáticas e de repulsão estéricas presentas na sua superfície. Esse tipo de interações desempenham um papel importante na estabilização das NPs contra a agregação (RASMUSSON; ROUTH; VINCENT, 2004). O potencial zeta das AuNPs-EGCG foi de -24.3 mV, indicando as NPs apresentam uma carga negativa em solução. Esse resultado também demostra que o coloide é estável em solução, porque a medida os valores de potencial zeta se afastam de zero, incrementa-se sua estabilidade e por tanto menor facilidade de agregação (SCHUENCK, 2018). A carga negativa pode ser explicada pela presença de grupos hidroxilas altamente nucleofílicas que em meio aquoso são facilmente desprotonadas (ZHANG, Liangliang; LIU; WANG, 2019).

As AuNPs-EGCG podem manter sua estabilidade por longos períodos de tempo em temperatura ambiente, sem mostrar mudanças de coloração ou formação de precipitados na solução (ZHANG, Le et al., 2014). Como pode ser visto na Figura 18, as bandas de absorção das AuNPs-EGCG armazenadas a 4ºC até por 2 meses demostraram que as nanoparticulas se mantiveram estáveis sem manifestar formação de agregados.





5.4 Avaliação da citotoxicidade in vitro de AuNPs-EGCG

O efeito citotóxico do sal de ouro (HAuCl₄), EGCG e AuNPs-EGCG foi avaliado por meio do ensaio *in vitro* de MTT em células de fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos não tumorigênicos imortalizados humanos (HaCaT). A molécula de EGCG pode apresentar concentrações efetivas *in vitro* que variam de 1-100 µg.mL-1(CAI et al., 2018). A partir dessa faixa, as AuNPs-EGCG foram concentradas de acordo com a quantidade de EGCG presente na superfície das NPs (Anexo 8.1). No caso do sal de ouro, as concentrações se basearam na concentração utilizada para a síntese de AuNPs-EGCG (2,5x10⁻⁴ M)



Figura 19. Viabilidade celular após 24 horas do tratamento com o sal de ouro nas concentrações de 85, 42.5, 21.25, 10.63 e 5.31 µg.mL⁻¹ em fibroblastos murinos (L929) e queratinocitos humanos (HaCaT). A viabilidade celular foi calculada como a porcentagem de células viáveis em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a viabilidade média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata. **p* < 0.05, *** *p* < 0.001 e **** *p* < 0.001 de L929 vs. HaCaT.

O sal de ouro apresentou percentagens de viabilidade que variaram entre 39 - 78% em células L929 conforme na Figura 19. Na máxima concentração testada de ouro, a citotoxicidade foi de 59.88%, no entanto a partir da concentração de 42.5 µg.mL⁻¹ a viabilidade celular aumento para 72%, ou seja, uma diminuição de citotoxicidade a 28%. Os efeitos do ouro nas células L929 foram dose-dependentes. Um estudo recente de citotoxicidade em células L929 de AuNPs presente em bebidas dietéticas, demostrou que o ouro não desenvolveu nenhum efeito toxico significante após 24 hrs a partir de uma concentração de 10 µg.mL-1(CHAICHERD; KILLINGSWORTH; PISSUWAN, 2019).

O ouro apresentou menor grau de citotoxicidade em células HaCaT em comparação com as células L929 em todas as concentrações testadas, tal como pode ser visto na

Figura 19 (p < 0.05, p < 0.001 e p < 0.0001). Em todas as concentrações testadas, a viabilidade das células HaCaT permaneceu por encima de 78.3%. A citotoxicidade do ouro nessa linhagem também foi dose-dependente, onde a mínima concentração testada (7,5 µg.mL⁻¹) apresentou um alto percentagem de viabilidade celular (96.33 %). As diferenças de viabilidade celular poderiam estar relacionadas ás diferenças físico-químicas entre as linhas celulares testados, onde a linhagem humana foi menos susceptível aos efeitos tóxicos do ouro metálico em comparação com as células murinas.



Figura 20. Viabilidade celular após 24 horas do tratamento com EGCG e AuNPs-EGCG nas concentrações de 120, 60, 30, 15 e 7.5 μ g.mL⁻¹ em (A) fibroblastos murinos (L929) e (B) queratinocitos humanos (HaCaT). A viabilidade celular foi calculada como a porcentagem de células viáveis em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a viabilidade média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata. ** *p* < 0.01 e **** *p* < 0.0001 de EGCG vs. AuNPs-EGCG.

O tratamento com AuNPs-EGCG mostrou altos níveis de viabilidade em células L929 e HaCaT (Figura 20A e B). Observa-se que a partir de concentrações de 30 µg.mL⁻¹, a EGCG começou a diminuir a viabilidade das células L929 em comparação com as AuNPs-EGCG que mantiveram os níveis de viabilidade por encima do 70.8%. A concentração de 120 µg.mL⁻¹ de EGCG foi extremamente toxica para as células apresentando um 93.97% de citotoxicidade, entretanto as AuNPs-EGCG mostraram apenas um 29.2% de citotoxicidade nessa mesma concentração (p < 0.0001). O tratamento com 30 µg.mL⁻¹ de AuNPs-EGCG mostrou o maior nível de proliferação celular (82.1%). As percentagens de viabilidade em células L929 variaram entre 71 e 82% com o tratamento de AuNPs-EGCG.

Nas células HaCaT, as AuNPs-EGCG mostraram maiores percentagens de viabilidade em todas as concentrações testadas em comparação com as células L929 conforme na Figura 20A e B. As percentagens de viabilidade em células HaCaT variaram entre 78 e 98% com o tratamento de AuNPs-EGCG, onde a concentração de 120 μ g.mL⁻¹ apresentou a maior porcentagem de citotoxicidade celular (22%). Igual que nas células L929, a máxima concentração de EGCG testada mostrou o maior nível de citotoxicidade, alterando a proliferação celular em um 70.1%, entretanto o tratamento com AuNPs-EGCG mostrou um 22% (*p* < 0.0001). A concentração de 7.5 μ g.mL⁻¹ de EGCG apresentou uma porcentagem de proliferação celular de 118.85 %, por tanto nessa concentração houve um estimulo da função mitocondrial das células HaCaT, mostrando maior crescimento celular que o controle não tratado. Em ambas linhagens celulares o tratamento com AuNPs-EGCG foi menos toxico que EGCG em todas as concentrações testadas conforme na Figura 20 (*p* < 0.01 e *p* < 0.0001).

Observa-se que a citotoxicidade de AuNPs-EGCG e EGCG em ambas linhagens celulares testados foi dose-dependente, por tanto a maior concentração, maior será o dano celular. De acordo com um estudo, os efeitos tóxicos das AuNPs tendem a ser dose-dependente em células humanas, onde a viabilidade celular pode diminuir a um 50% a partir de uma concentração de AuNPs de 200 µg.mL-1(LI; WANG; CHENG, 2017). A toxicidade de AuNPs é evidenciada pelo deterioro na membrana citoplasmática assim como na função mitocondrial, dessa forma a proliferação celular é diminuída (STECKIEWICZ et al., 2019). No entanto vários autores afirmaram que as AuNPs são inofensivas para as células humanas (HAUCK; GHAZANI; CHAN, 2008); (SHUKLA et al., 2005); (CHITHRANI; GHAZANI; CHAN, 2006); (VILLIERS et al., 2010). Em termos de biocompatibilidade e citotoxicidade, as AuNPs se destacam do resto de nanoparticulas metálicas (KHLEBTSOV; DYKMAN, 2011).

Um estudo demostrou que por meio do método de síntese verde podem ser obtidas AuNPs com altos níveis de sobrevivência celular em células L929 (FRANCIS et al., 2019) e em células HaCaT. Com concentrações <100 µg.mL⁻¹, as percentagens de proliferação celular podem chegar a ser ≥88% (PATIL et al., 2019). Além disso também foi demostrado que o uso de materiais de tipo vegetal não tóxicos como agentes redutores de AuNPs pode diminuir os níveis de morte celular em comparação com agentes químicos (BOLDEIU et al., 2019).

Os valores de IC50 para cada amostra após tratamento em ambas linhagens celulares se encontram na Tabela 5. Observa-se que as amostras tratadas em células HaCaT apresentaram concentrações mais elevadas para inibir o 50% da população celular em comparação com as células L929, tal como foi evidenciado também nas porcentagens de viabilidade celular.

Tabela 5. Concentração Inibitória Máxima no 50% (IC50) do sal de ouro (HAuCl₄), EGCG e AuNPs-EGCG após 24 horas de tratamento em fibroblastos murinos (L929) e queratinocitos humanos (HaCaT).

Células / Amostra	Sal de ouro	EGCG	AuNPs-EGCG
L929	117.67	47.14	267.55
HaCaT	291.35	98.91	293.04

*Valores expressados em µg.mL⁻¹.

De acordo com os resultados do sal metálico, o processo de redução do ouro a tamanhos de escala "nano" melhorou a sua citotoxicidade in vitro, especialmente nas células L929 onde o valor de IC50 para as AuNPs-EGCG foi de 267.55 µg.mL⁻¹ comparado com o IC50 do sal de ouro (117.67 µg.mL⁻¹). De acordo com um estudo, a citotoxicidade das AuNPs pode ser diminuída eliminando por meio de centrifugação os íons de Au⁺³ (ouro que não foi reduzido) presentes na solução coloidal (DASARI; ZHANG; YU, 2015). Por tanto a forma a granel do ouro pode manifestar maior efeito toxico do que o coloide. No entanto, outros estudos determinaram que o ouro apresenta o mesmo potencial de toxicidade tanto na forma iônica assim como (BOTHA; JAMES; WEPENER, 2015); nanopartícula (CHAICHERD; KILLINGSWORTH; PISSUWAN, 2019), tal como pode ser observado nos resultados das células HaCaT, onde o sal de ouro apresentou um valor de IC50 próximo ao valor das AuNPs-EGCG.

Em relação a EGCG, a citotoxicidade *in vitro* da molécula foi diminuída quando ela se encontra funcionalizada na superfície do ouro em comparação a sua forma original, tal como foi evidenciando pelo incremento das percentagens de viabilidade e valores de IC50 no tratamento com AuNPs-EGCG. De acordo com um estudo, o acoplamento

de derivados do chá verde em sistemas coloidais de ouro pode reduzir os efeitos tóxicos das moléculas em queratinocitos em comparação a condições isoladas (KUMAR BAN; PAUL, 2019). Algumas moléculas podem manifestar alta toxicidade em sua forma original, no entanto quando estão conjugadas em uma superfície de ouro, sua citotoxicidade tende a decrescer (PISSUWAN et al., 2007).

Conforme a norma ISO 10993-5:2009, uma sustância se considera não citotóxica quando a viabilidade celular in vitro é maior a 70%, ou seja, a porcentagem de células mortas não deve superar o 30% (ISO, 2009). Por tanto as AuNPs-EGCG podem ser consideradas produtos não citotóxicos nas linhagens celulares testados, devido a que as percentagens de viabilidade celular foram >71% para células L929 e >78% para células HaCaT em todas as concentrações testadas.

De acordo com um estudo *in vivo* realizado com um segmento da pele da pata traseira de ratos, foi demostrado que as AuNPs de 22 nm absorveram-se maiormente em comparação com tamanhos superiores (> 200 nm). Além disso também demostrou que as AuNPs apresentam um bom movimento transdérmico em pele fina (RAJU et al., 2018). Por tanto as AuNPs-EGCG poderiam ser alternativa segura e efetiva em tratamentos a nível cutâneo.

5.5 Atividade Antibacteriana in vitro das AuNPs-EGCG.

O efeito antibacteriano *in vitro* das AuNPs-EGCG e EGCG foi avaliado por meio de curvas de inibição bacteriana, determinação da concentração mínima inibitória de cada amostra, quantificação do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e analisando a interação da bactéria com as AuNPs-EGCG por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Figura 21. Percentagens de inibição das oito bacterias em estudo tratadas com uma concentração de 1000 μ g.mL⁻¹ de AuNPs-EGCG após 24 horas. A inibição bacteriana foi calculada como a porcentagem de células inibidas em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a inibição média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em triplicata.

O gráfico da Figura 21 mostra a triagem realizada com as 8 bacterias em estudo para verificar a susceptibilidade da bactéria ao tratamento com AuNPs-EGCG em uma concentração de 1000 µg.mL⁻¹. As bacterias *E. coli* 25922 e *E. faecalis* 29212 (ambas cepas ATCC), manifestaram apenas percentagens de inibição de 24.16% e 26.3% respetivamente. Entretanto as outras seis bacterias foram inibidas por encima do 83% da população bacteriana.

De acordo ao teste de citotoxicidade, as AuNPs-EGCG apresentaram valores de IC50 de 267.55 e 293.04 µg.mL⁻¹ em células L929 e HaCaT respetivamente. Por tanto, a concentração testada na triagem supera o valor que inibe o 50% das células animais do teste. Com base nesses dados, as cepas ATCC de *E. coli e E. faecalis* foram descartadas do teste porque não mostraram níveis de susceptibilidade significativos após tratamento com uma concentração elevada (1000 µg.mL⁻¹). Por tanto ambas bacterias não seriam adequadas para o testar o efeito antibacteriano das AuNPs-EGCG em concentrações menores.

5.5.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) das AuNPs-EGCG e EGCG.

A partir da densidade ótica medida em 600 nm das bacterias tratadas com AuNPs-EGCG e EGCG foram construídas curvas de inibição após 12, 24 e 48 horas de tratamento conforme na Figura 22. As bacterias mostraram uma inibição notável do crescimento após 12 horas de tratamento com AuNPs-EGCG com respeito ao controle (p < 0.0001). Entretanto nas concentrações abaixo de 60 µg.mL⁻¹, as bacterias grampositivas tratadas (*S. aureus* e *E. faecalis*) foram capazes de apresentar um leve crescimento após 24 e 48 horas como pode ser visto na Figura 22A, B e F. Observase que as bacterias *S. aureus* 25923 e *E. faecalis* 6885 apresentaram valores de densidade ótica mais elevados e próximos ao controle nas concentrações de 7.5 e 15 µg.mL⁻¹ (p < 0.01 e < 0.001) indicando um menor grau de inibição após 48 horas de tratamento.

No caso das bacterias gram-negativas tratadas, o efeito antibacteriano das AuNPs-EGCG se mantive até 48 horas com respeito ao controle (p < 0.0001). Por tanto as bacterias *P. aeruginosa* e *E. coli* foram mais susceptíveis ao tratamento com todas concentrações testadas de AuNPs-EGCG do que as gram-positivas conforme na Figura 22C, D e E.



Figura 22. Curvas de inibição bacteriana do tratamento com AuNPs-EGCG nas concentrações de 120, 60. 30, 15, e 7.5 µg.mL⁻¹ e bactéria não tratada após 12, 24 e 48 horas. (A) *S. aureus* 25923 (B) *S. aureus* 10A (C) *P. aeruginosa* 27853 (D) *P. aeruginosa* 93B (E) *E. coli* ESBL (F) *E. faecalis* 6885. Os resultados são representados como a densidade ótica média \pm erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em duplicata. ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001 e **** *p* < 0.0001 vs. controle positivo.

A partir da densidade ótica em 600 nm no tempo de 48 horas de tratamento, foram calculadas percentagens de inibição do crescimento para cada bactéria em estudo como pode ser visto na Figura 23. Observa-se que todas as bacterias foram susceptíveis ao tratamento com AuNPs-EGCG em todas as concentrações testadas, demostrando dessa forma a atividade bacteriana das nanoparticulas nas seis bacterias em estudo. As bacterias *S. aureus* 10A, *P. aeruginosa* (ambas cepas) e *E. coli* ESBL apresentaram percentagens de inibição por encima de 80% em todas as
concentrações testadas. Por outro lado, as bactérias *S. aureus* 25923 e *E. faecalis* 6885 apresentaram maior resistência ao tratamento com AuNPs-EGCG com percentagens de inibição dose-dependente. Nas concentrações de 7.5 e 15 µg.mL⁻¹ as percentagens de inibição foram embaixo do 50% do controle não tratado.



Figura 23. Percentagens de inibição bacteriana após 48 hrs de tratamento com AuNPs-EGCG nas concentrações de 120, 60, 30, 15, 7.5 μg.mL⁻¹ contra as bacterias: (A) *S. aureus* 25923. (B) *S. aureus* 10 A. (C). *P. aeruginosa* 27853. (D) P. *aeruginosa* 93B. (E). *E. coli* ESBL. (F). *E. faecalis* 6885. A inibição bacteriana foi calculada como a porcentagem de células inibidas em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a inibição média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em duplicata.

No tratamento com EGCG, observa-se que a maioria das bacterias em estudo foram menos susceptíveis (Figura 24) em comparação aos resultados apresentados com AuNPs-EGCG. A cepa clínica de *S. aureus* foi a bactéria mais sensível ao tratamento, apresentando percentagens de inibição entre 83 – 93% em todas as concentrações testadas conforme na Figura 24. Esse efeito pode ser devido à alta afinidade da molécula para interagir diretamente com a camada de peptidoglicano em alguns patógenos como a *S. aureus* (CD et al., 1999) . Por outro lado, as bacterias *P. aeruginosa* (ambas cepas), *E. coli* e *E. faecalis* mostraram maior resistência ao tratamento em comparação com os resultados de AuNPs-EGCG, principalmente nas concentrações de 7.5 e 15 µg.mL⁻¹ onde as percentagens de inibição foram embaixo do 50% da população bacteriana tratada. Observa-se que os efeitos inibitórios da



EGCG também foram dose-dependente, ou seja, a maior concentração testada, houve maior inibição do crescimento bacteriano.

Figura 24. Percentagens de inibição bacteriana após 48 hrs de tratamento com EGCG nas concentrações de 120, 60, 30, 15, 7.5 µg.mL⁻¹ contra as bacterias: (A) *S. aureus* 25923. (B) *S. aureus* 10 A. (C). *P. aeruginosa* 27853. (D) P. *aeruginosa* 93B. (E). *E. coli* ESBL. (F). *E. faecalis* 6885. A inibição bacteriana foi calculada como a porcentagem de células inibidas em comparação com os controles não tratados. Os resultados são representados como a inibição média ± erro padrão da média (EPM) de experimentos independentes em duplicata.

A concentração mínima inibitória (CMI) é a menor concentração de um agente antibacteriano que inibe o crescimento de um microrganismo após incubação. (MANN; MARKHAM, 1998). A partir da densidade ótica, os valores de CMI podem ser expressados como a concentração onde as bacterias são inibidas em um 90%. Os valores de CMI de AuNPs-EGCG e EGCG se encontram na Tabela 6.

O valor de CMI das AuNPs-EGCG variou de acordo com a cada bactéria tratada. O tratamento com AuNPs-EGCG foi altamente efetivo nas bacterias *S. aureus* 10A e *P. aeruginosa* 27853 apresentando um valor de CMI de 15 µg.mL⁻¹. Por tanto a partir dessa concentração o 90% da população bacteriana se encontra inibida em solução. No entanto, a inibição do 90% da população de *S. aureus* 25923 e *E. faecalis* 6885 requereu a maior concentração de AuNPs-EGCG testada (120 µg.mL⁻¹). As bacterias *P. aeruginosa* 93B e *E. coli* ESBL apresentaram valores intermédios de CMI de 60 e 30 µg.mL-1 respetivamente.

Com respeito a EGCG, as AuNPs-EGCG apresentaram menores valores de CMI no tratamento das bacterias *P. aeruginosa* (ambas cepas), *E. coli* e *E. faecalis*. No caso da cepa clínica de *S. aureus*, a bactéria apresentou a mesma susceptibilidade no tratamento com ambas amostras. No entanto, para a cepa ATCC o tratamento com EGCG inibiu o 90% da população bacteriana em uma concentração menor (60µg.mL⁻¹) que as AuNPs-EGCG (120 µg.mL⁻¹).

Por tanto as AuNPs-EGCG foram mais efetivas no tratamento antibacteriano que a EGCG com exceção da bactéria *S. aureus* 25923. A atividade antibacteriana da EGCG foi potencializada quando se encontra funcionalizada em um núcleo de ouro (AuNPs-EGCG) em comparação a condições isoladas. Esse efeito é evidenciado pela diminuição dos valores CMI das AuNPs-EGCG em comparação com a EGCG.

 Tabela 6. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de AuNPs-EGCG e EGCG correspondente a cada bactéria tratada.

Bacteria	AuNPs-EGCG	EGCG
S. aureus 25923	120	60
S. aureus 10A	15	15
P. aeruginosa 27853	15	60
P. aeruginosa 93B	60	120
E. coli ESBL	30	120
E. faecalis 6885	120	120

* Os valores estão expressados em unidades de µg.mL-1

O valor da CMI de AuNPs pode variar de acordo ao agente redutor, tamanho e tipo de bactéria. AuNPs com tamanho entre 7-34 nm apresentaram CMI entre 3 – 7.6 µg.mL-1em algumas bacterias gram negativas e positivas (SHAMAILA et al., 2016). No entanto, AuNPs maiores (30nm) apresentaram um valor de CMI de 200 µg.mL-1(MOHAMED et al., 2017). Outros estudos confirmaram que a atividade antibacteriana de AuNPs pode ser manifestada a partir de 3 µg.mL-1(ZAWRAH; ABD EL-MOEZ, 2011) e 550 µg.mL-1(NAIMI-SHAMEL; POURALI; DOLATABADI, 2019). Antibioticos como ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, vancomicina podem diminuir seus valores de CMI quando se encontram conjugados na superfície de AuNPs (ROSHMI et al., 2015). Por outro lado, a EGCG pode apresentar valores de CMI a partir de 7.81 µg.mL⁻¹ e 62.5 µg.mL⁻¹ para *S. aureus* (KNIDEL et al., 2019), 250 µg.mL⁻¹ para *P.* *aeruginosa* (BAZZAZ et al., 2016) e 400 µg.mL⁻¹ para *E. coli* (JEON et al., 2014) dependendo do tipo de cepa bacteriana.

Por tanto as AuNPs são capazes de potenciar os efeitos antibacterianos das moléculas conjugadas na sua superfície, principalmente pela redução de seus valores de CMI em alguns patógenos. Além disso as nanoparticulas de ouro podem agir como excelentes sistemas de transporte e liberação de agentes antibacterianos em sítios de interesse (GHOSH et al., 2008) graças a suas características físico-químicas que facilitam a passagem através dos tecidos.

5.5.2 Quantificação de UFC/mL do tratamento com AuNPs-EGCG e EGCG nas bacterias em estudo.

Para verificar o efeito inibitório das AuNPs-EGCG observado no teste anterior, foi determinado o número de unidades formadoras de colônia por mililitro pelo método de contagem em placa após 48 horas de tratamento.

As bacterias que se encontram viáveis em solução conseguem se multiplicar por fissão binária em condições controladas para formar uma colônia visível a partir de milhares de células descendentes (SYED; PRASAD; SATISHA, 2016). Por tanto as colônias quantificadas na placa correspondem unicamente a aquelas células que sobreviveram ao tratamento e que por tanto conseguem se reproduzir para formar uma colônia.

A Figura 25 mostra as colônias formadas pelas bacterias após 48 horas de tratamento com AuNPs-EGCG. Como pode ser visualizado, as bacterias gram-negativas em estudo não tratadas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) formaram massas celulares com colônias mais aglomeradas (Figura 25C e D), indicando uma maior taxa de reprodução em comparação com a *S. aureus*. A bactéria *E. faecalis* apresentou um crescimento mais lento formando colônias mais pequenas dificilmente visíveis. Observa-se que em cada tratamento com AuNPs-EGCG houve uma redução visivelmente notável do número de colônias conforme na Figura 25B, D, F, indicando o efeito antibacteriano das AuNPs que reduz o número de células viáveis na solução.



Figura 25. Colônias bacterianas após 48 horas de tratamento com AuNPs-EGCG (A) Controle de *S. aureus* 10A (B) Tratamento de *S. aureus* 10A (C) Controle de *P. aeruginosa* 27853 (D) Tratamento de *P. aeruginosa* 27853 (D) Controle de *E. coli* ESBL (E) Tratamento de *E. coli* ESBL. Barra de escala de 1 cm.

A partir da contagem do número de colônias bacterianas na placa, foi calculado o número de unidades formadoras de colônias em solução por mililitro (UFC/mL) após tratamento com AuNPs-EGCG e EGCG como pode ser visualizado na Figura 26.

Observa-se que na maioria houve um decrescimento gradual do número de células bacterianas viáveis à medida que a concentração de amostras aumentou. Por tanto os efeitos das AuNPs-EGCG e da EGCG nas bacterias em estudo foram dosedependentes. A bactéria P. aeruginosa apresentou um crescimento mais acelerado no tratamento com EGCG em comparação com AuNPs-EGCG. De acordo com os gráficos, em todas as bacterias tratadas as AuNPs-EGCG apresentaram maior efeito inibitório na reprodução das células viáveis em comparação com a EGCG. O número de colônias bacterianas quantificadas na placa foi menor com o tratamento de AuNPs-EGCG do que EGCG em todas as concentrações testadas.



Figura 26. Unidades formadoras de colônias bacterianas por mililitro de solução (UFC/mL) após 48 horas de tratamento com AuNPs-EGCG e EGCG utilizando concentrações de 120, 60, 30, 15 e 7.5 µg.mL⁻¹ contra as bacterias: (A) *S. aureus* 25923. (B) *S. aureus* 10 A. (C). *P. aeruginosa* 27853. (D) P. *aeruginosa* 93B. (E). *E. coli* ESBL. (F). *E. faecalis* 6885. O número de UFC/mL é representando como o valor logarítmico de 10.

Como foi evidenciado também nas curvas de inibição bacteriana (Figura 22), as AuNPs-EGCG mostraram efeitos inibitórios na reprodução das células bacterianas viáveis após 48 horas de tratamento (Figura 26). De acordo com um estudo, as AuNPs podem inativar as funções de estruturas intracelulares nas bacterias e dessa forma alguns componentes vitais são interrompidos, por exemplo o grupo tiol que é necessário para a replicação bacteriana (BAKER; SATISH, 2012). As bacterias podem responder rapidamente às mudanças do ambiente químico após exposição com AuNPs, no entanto com o passar do tempo elas podem perder a capacidade de espalhar-se ou reproduzir-se em presença das AuNPs. Outro estudo demostrou que quando a concentração de AuNPs incrementa, as colônias bacterianas podem se tornar mais pequenas (CUI, Yan et al., 2012). A diminuição do número de colônias viáveis pode ser mais susceptível em bacterias gram-negativas que em positivas (SYED; PRASAD; SATISHA, 2016) tal como foi comprovado com nossa amostra de nanoparticulas.

5.5.3 Analise morfológica das bacterias tratadas com AuNPs-EGCG por meio de Microscopia Eletronica de Varredura (MEV).

Com base aos resultados obtidos, a susceptibilidade do tratamento com AuNPs-EGCG variou entre as bacterias em estudo. As percentagens de inibição e o número de UFC/mL indicam que o efeito antibacteriano das AuNPs-EGCG foi mais potente em algumas bacterias que outras. Por tanto a atividade antibacteriana das AuNPs-EGCG pode depender da morfologia das bacterias, especialmente das propriedades físico-químicas das membranas bacterianas.

As AuNPs facilmente conseguem penetrar a membrana celular das bacterias gramnegativas em comparação com а membrana das gram-positivas (BALASUBRAMANIAN; KALA; PUSHPARAJ; KUMAR, 2019). Isso pode ser devido a que a membrana das gram-negativas está composta de uma fina camada de peptidoglicano em comparação com a camada grossa das gram-positivas. A camada de peptidoglicano é um componente importante da patologia das bactérias (SHAMAILA et al., 2016). Por tanto uma camada mais grossa pode reduzir o grau de penetração das AuNPs-EGCG através da parede celular e consequentemente uma diminuição do efeito antibacterianos nas bacterias S. aureus e E. faecalis.

Além disso os ácidos teicóicos e lipoteicóicos presentes nas bacterias gram-positivas podem impedir em certo grau a interação das AuNPs-EGCG por ação de forças de repulsão entre a carga negativa superficial das nanoparticulas e a carga negativa desses ácidos (CAUDILL et al., 2020). Por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) se analisaram algumas alterações morfológicas nas bacterias causadas pelo tratamento com AuNPs-EGCG para estudar os diferentes mecanismos antibacterianos que elas realizam.

Como pode ser visto na Figura 27, as bacterias gram positivas sofreram deformações estruturais como respeito ao controle não tratado. Esses efeitos podem ser devido a que as AuNPs-EGCG apresentam um tamanho de 14.54nm, as quais são menores que a capa superficial externa do envelope celular bacteriano denominado "Capa S" e que tem um tamanho de 25 nm aproximadamente. Essas diferenças de tamanho facilitam a adesão das nanoparticulas na superfície celular das bacterias e dessa

forma elas podem induzir deformações que causam a morte celular desses microrganismos (BALASUBRAMANIAN; KALA; PUSHPARAJ; KUMAR, 2019).

A presença dos "buracos" na parede celular das bacterias gram-positivas tratadas, podem ser descritas como fissuras causadas pela penetração das AuNPs-EGCG através de uma membrana porosa. A porosidade da membrana é resultado do deterioro estrutural provocado pelas tratamento (RAI; PRABHUNE; PERRY, 2010). Por tanto a interação das AuNPs-EGCG com a camada grossa de peptidoglicano pode incrementar a porosidade da membrana formando "buracos", tal como pode ser observado na Figura 27B e D. Os buracos podem permitir o ingresso das AuNPs-EGCG para o interior da bactéria, que consequentemente induzem o vazamento do conteúdo celular e morte bacteriana.

As AuNPs podem interagir com substratos presentes na parede celular da *S. aureus*. Esses substratos pertencem a processos de metabolismo celular, transporte de moléculas, integridade da membrana e processos transcriptômicos celulares (ZHENG et al., 2017). A interação das nanoparticulas com substratos de metabolismo oxidativo pode causar um desequilíbrio entre as enzimas pró-oxidantes e antioxidantes. Como resultado, algumas estruturas intracelulares podem ser danificadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma e que provocam a morte da bacterias. Esse mecanismo também pode ocorrer na *E. faecalis*, onde a desestabilização da membrana é induzida pela formação de grandes poros por causa de danos em estruturas intracelulares (VIJAYAKUMAR et al., 2017).



Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de bacterias gram positivas. (A) Controle não tratado de *Staphylococcus aureus* 10A. (B) Tratamento de *Staphylococcus aureus* 10A com AuNPs-EGCG. (C) Controle não tratado de *Enterococcus faecalis* 6885. (B) Tratamento de *Enterococcus faecalis* 6885 com AuNPs-EGCG. Escala bar de 1 µm.

As AuNPs podem interagir com enzimas hidrofílicas presentes na superfície da bactéria *P. aeruginosa* por médio de interações eletroestáticas (YU, Qilin et al., 2016). A nuvem elétrica na superfície das nanoparticulas pode facilitar a ligação com os grupos iônicos das enzimas e proteínas extracelulares. As enzimas que circulam na camada externa da *P. aeruginosa* são consideradas potentes fatores de virulência para se defender contra os efeitos dos antibióticos (ROCHA et al., 2019). Por tanto, as AuNPs-EGCG podem alterar as funções de tais enzimas e dessa forma diminuem os mecanismos de defesa da *P. aeruginosa* contra as invasões. Como resultado as AuNPs-EGCG se acumulam na membrana externa e posteriormente conseguem ingressar na bactéria.

Em bacterias gram-negativas, as AuNPs penetram as bacterias através dos canais de porina da membrana por biossorção e difundem-se através da matriz de bicamada de membrana graças a seu pequeno tamanho. Dessa forma elas conseguem perturbar a integridade da membrana (DING et al., 2018). As AuNPs podem induzir a formação de vesículas (em forma de bolhas) na membrana externa da *P. aeruginosa* que

causam ruptura da membrana e ao vazamento descontrolado do conteúdo citoplasmático (HAYDEN et al., 2012) tal como pode ser observado na Figura 28D.

As formas defeituosas multicelulares também podem ocorrer pela interação das AuNPs com receptores enzimáticos presentes na membrana das bacterias (MASHBURN-WARREN; MCLEAN; WHITELEY, 2008) conforme na Figura 28B. As autolisinas são enzimas autolíticas que participam na degradação do peptidoglicano (MAHMOUD; ALKHALEEFAH; SHERIF, 2013). Por tanto as AuNPs podem agir inativando o inibidor de autolisinas ou ativando a ação dessas enzimas. O acumulo de autolisinas na parede celular provoca que as bacterias não se separem corretamente durante o crescimento levando à formação de deformações na camada da bactéria como é observado na Figura 28C. Ambos mecanismos antibacterianos podem ocorrer para bacterias gram-negativas e positivas.





A bactéria *E. coli* também apresentou deformações morfológicas pela interação das AuNPs-EGCG com sua membrana externa de acordo com a Figura 29B. As AuNPs podem formar agregados na camada superficial negativa da *E. coli*. O surgimento desses agregados depende da concentração de lipídeos e proteínas presentes na superfície das bacterias (HONG et al., 2019).

Os agregados celulares na bactéria *E. coli* são conhecidos como vesículas da membrana externa (OMVs) (BADWAIK et al., 2012). Esse fenômeno ocorre pela capacidade das AuNPs de ligar-se em pontos de menor densidade de carga negativa ou pontos menos hidrofóbicos na membrana da bactéria. A partir desse mecanismo as AuNPs conseguem perturbar a integridade da membrana externa da *E. coli*, levando a um incremento da sua permeabilidade. Dessa forma, a bactéria consegue filtrar seu conteúdo citoplasmático para o espaço extracelular conforma na Figura 29D. A fragilidade da membrana externa também pode permitir que as AuNPs-EGCG sejam transloucadas para o interior da bactéria causando uma lise celular (LIN et al., 2002) como pode ser observado na Figura 29C. Esse mecanismo antibacteriano também ocorre na *P. aeruginosa.*

Além disso a bactéria *E. coli* é susceptível a mudanças de pH e concentração de íons metálicos. As condições normais de pH para as bacterias podem variar entre 7.2 – 7.4 (CLEMENTS et al., 2012). Por tanto a carga iônica da solução de AuNPs-EGCG (aproximadamente um pH 6.4) junto com a interação com os íons de ouro na solução, podem representar uma ameaça para a sobrevivência da bactéria nessas condições.



Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da bactéria *Escherichia coli* ESBL. (A) Controle não tratado. (B, C e D) Tratamento com AuNPs-EGCG. Escala bar de 1 µm.

O mecanismo de ação antibacteriano da EGCG consiste em inibir a ATPase que hidrolisa o ATP. Dessa forma inibe o superenrolamento do DNA e por tanto a bactéria

não consegue se reproduzir (GRADIŠAR et al., 2007). Assim também, a EGCG age por ligação direta na camada de peptidoglicano das bacterias, induzindo danos na reticulação de peptídeos e danos à parede celular (ZHAO, Wei-hua et al., 2001). Isso representa um maior espetro de ação para bacterias gram-positivas que negativas. Tal como foi evidenciado nos resultados onde a molécula mostrou maior efeito antibacteriano contra a *S. aureus*.

Por outro lado, a atividade antibacteriana das AuNPs-EGCG em bacterias grampositivas e negativas consiste na interação com a superfície das bacterias (parede celular ou membrana externa). Geralmente as AuNPs-EGCG modificam o potencial de membrana e reduzem as atividades do complexo ATP sintase. Desta forma se diminui a produção de ATP, e por consequência a redução dos processos metabólicos nas bacterias que podem levar à uma morte celular (SHAMAILA et al., 2016).

6. CONCLUSÕES

- As AuNPs-EGCG foram sintetizadas a partir de um método de síntese verde que foi simples, não toxico e de baixo custo.
- As AuNPs-EGCG apresentaram um bom comportamento na ressuspensão dos solventes testados e utilizados para ensaios de citotoxicidade e antibacterianos *in vitro*
- As AuNPs-EGCG mostraram uma ótima estabilidade *in vitro* contra condições de estresse iônico a partir da variação de concentrações de solução salina e o pH do meio.
- As AuNPs-EGCG apresentaram baixos níveis de citotoxicidade *in vitro* com altos valores de IC50 de 267.55 e 293.04 µg.mL⁻¹ correspondentes ao tratamento em fibroblastos murinos (L929) e queratinocitos humanos (HaCaT) respetivamente.
- As AuNPs-EGCG apresentaram valores de CMI que variaram entre 15 e 120 µg.mL⁻¹ em todas as bacterias gram-positivas e gram-negativas tratadas.
- As AuNPs-EGCG apresentaram efeito inibitório na reprodução de células bacterianas viáveis por meio da redução do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).
- A funcionalização da EGCG no sistema coloidal de ouro melhorou a sua citotoxicidade *in vitro* e potencializou o efeito antibacteriano por meio do incremento dos valores de IC50 nas células cutâneas e diminuição dos valores de CMI nas bacterias tratadas.
- As AuNPs-EGCG apresentam alto potencial para ser aplicadas no campo biomédico como antibacterianos em lesões cutâneas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, Absar et al. Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, thermomonospora sp. Langmuir, v. 19, n. 8, p. 3550–3553, 2003.
- [2] AL-SHERBINI, Al-Sayed Abdel-Majied. Solvatochromic Behavior of Gold Nanoparticles in Different Solvents. Nano Science and Nano Technology an Indian Journal, v. 7, n. 4, p. 147–155, 2013.
- [3] ALBANESE, Alexandre; CHAN, Warren C.W. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. ACS Nano, v. 5, n. 7, p. 5478–5489, 2011.
- [4] ANDERSSON, Dan I.; NICOLOFF, Hervé; HJORT, Karin. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. Nature Reviews Microbiology, v. 17, n. 8, p. 479–496, 2019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0218-1>.
- [5] ANNAMALAI, Jayshree; NALLAMUTHU, Thangaraju. Characterization of biosynthesized gold nanoparticles from aqueous extract of Chlorella vulgaris and their anti-pathogenic properties. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 5, n. 5, p. 603–607, 2015.
- [6] ÅRDAL, Christine et al. Antibiotic development economic, regulatory and societal challenges. Nature Reviews Microbiology, 2019. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41579-019-0293-3>.
- [7] ARMENDARIZ, Veronica et al. Size controlled gold nanoparticle formation by Avena sativa biomass: Use of plants in nanobiotechnology. Journal of Nanoparticle Research, v. 6, n. 4, p. 377–382, 2004.
- [8] ASLAM, Bilal et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infection and Drug Resistance, v. 11, p. 1645–1658, 2018.
- [9] BABICH, H. et al. Differential in vitro cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. Toxicology in Vitro, v. 19, n. 2, p. 231–242, 2005.
- [10]BADWAIK, Vivek D. et al. Size-dependent antimicrobial properties of sugarencapsulated gold nanoparticles synthesized by a green method. Nanoscale Research Letters, v. 7, p. 1–11, 2012.

- [11]BAKER, Syed; SATISH, S. Endophytes: Toward a Vision in Synthesis of Nanoparticle for Future Therapeutic Agents. Internationa Journal of Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterial, v. 1, n. 2, p. 67–77, 2012.
- [12]BAKIU, Rigers. Nanotechnology Interaction with Environment. Handbook of Environmental Materials Management, p. 2233–2256, 2019.
- [13]BALASUBRAMANIAN, Subramanian; KALA, Soosaimichael Mary Jelastin; PUSHPARAJ, Thomas Lurthu; KUMAR, Paulraj Vijaya. Biofabrication of gold nanoparticles using cressa cretica leaf extract and evaluation of catalytic and antibacterial efficacy. Nano Biomedicine and Engineering, v. 11, n. 1, p. 58– 66, 2019.
- [14] _____. Biogenic synthesis of gold nanoparticles from waste watermelon and their antibacterial activity against Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis. Saudi Pharmaceutical Journal, v. 11, n. 7, p. 1265–1276, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.11.010>.
- [15]BAZZAZ, Bibi Sedigheh Fazly et al. Effect of catechins, green tea extract and methylxanthines in combination with gentamicin agair staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa-Combination therapy against resistant bacteria. Journal of Pharmacopuncture, v. 19, n. 4, p. 312–318, 2016.
- [16]BHATTACHARYA, Susmita et al. Effect of (-)-epigallocatechin gallate on the fibrillation of human serum albumin. International Journal of Biological Macromolecules, v. 70, p. 312–319, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.003>.
- [17]BLAIR, Jessica M A et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
- [18]BOLDEIU, Adina et al. Comparative analysis of honey and citrate stabilized gold nanoparticles: In vitro interaction with proteins and toxicity studies. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 197, n. October 2018, p. 111519, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111519>.
- [19]BOTHA, Tarryn L.; JAMES, Tanyn E.; WEPENER, Victor. Comparative Aquatic Toxicity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold Using a Species Sensitivity Distribution Approach. Journal of Nanomaterials, v. 2015, p. 1–16, 2015.

[20] BRAICU, Cornelia et al. The relationship between the structure and biological

actions of green tea catechins. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3282–3289, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.122>.

- [21]CAI, Zhuo Yu et al. Bioavailability of tea catechins and its improvement.Molecules, v. 23, n. 9, p. 10–13, 2018.
- [22]CARMINATI, Andrea et al. Bacterial Resistance Algorithm. An Application to CVRP. Bioinspired Systems and Biomedical Applications to Machine Learning., v. 11487, p. 137–145, 2019. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-19651-6>.
- [23]CAUDILL, Emily Rose et al. Wall Teichoic Acids Govern Cationic Gold Nanoparticle Interaction with Gram-Positive Bacterial Cell Walls. Chemical Science, 2020.
- [24]CD, Chie a et al. Antibacterial Activity of Epigallocatechin Gallate against Staphylococcus. Med. Bull. Fukuoka Univ., v. 26, n. 4, p. 31–33, 1999.
- [25]CHACKO, Sabu M. et al. Beneficial effects of green tea: A literature review. **Chinese Medicine**, v. 5, p. 1–9, 2010.
- [26]CHAICHERD, Sunisa; KILLINGSWORTH, Murray C.; PISSUWAN, Dakrong. Toxicity of gold nanoparticles in a commercial dietary supplement drink on connective tissue fibroblast cells. SN Applied Sciences, v. 1, n. 4, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s42452-019-0354-2>.
- [27]CHANDRA, Goutam Kumar et al. Interaction of (-)-epigallocatechin gallate with lysozyme-conjugated silver nanoparticles. Applied Spectroscopy, v. 66, n. 7, p. 744–749, 2012.
- [28]CHENEVIER, Pascale et al. Interaction of cationic colloids at the surface of J774 cells: A kinetic analysis. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 3, p. 1298–1309, 2000.
- [29]CHITHRANI, B. Devika; GHAZANI, Arezou A.; CHAN, Warren C.W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. Nano Letters, v. 6, n. 4, p. 662–668, 2006.
- [30]CHOPRA, Ian. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 59, n. 4, p. 587–590, 2007.
- [31]CHUMS-ARD, Wisut et al. Biogenic synthesis of gold nanoparticles from waste watermelon and their antibacterial activity against Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis. International Journal of Research in Medical Sciences, v. 7, n. 7, p. 2499, 2019.

- [32]CLEMENTS, Abigail et al. Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71–87, 2012.
- [33]CLSI. M07. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Eleventh edition. **CLSI document M07-A11**, p. 112, 2018.
- [34]CONNELL, Sean R. et al. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 47, n. 12, p. 3675–3681, 2003.
- [35]CORADEGHINI, Rosella et al. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts. **Toxicology Letters**, v. 217, n. 3, p. 205–216, 2013.
- [36]COX, Georgina; WRIGHT, Gerard D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. International Journal of Medical Microbiology, v. 303, n. 6–7, p. 287–292, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>.
- [37]CROZIER, Alan. Plant Secondary Metabolites. [S.I: s.n.], 2007.
- [38]CUI, Yan et al. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. **Biomaterials**, v. 33, n. 7, p. 2327–2333, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.057>.
- [39]CUI, Yidan et al. AFM Probing the Mechanism of Synergistic Effects of the Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) with Cefotaxime against Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing Escherichia coli. PLoS ONE, v. 7, n. 11, 2012.
- [40]D'COSTA, Vanessa; WRIGHT, Gerard D. Biochemical Logic of Antiobiotic Inactivation and Modification. Antimicrobial Drugs Resistance, v. 8, p. 81–95, 2009.
- [41]DASARI, TP Shareena; ZHANG, Y; YU, H. Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Gold (I) and (III) Ions and Gold Nanoparticles. Biochemistry and Pharmacology, v. 4, n. 6, p. 199, 2015.
- [42]DASH, Shib Shankar; BAG, Braja Gopal. Synthesis of gold nanoparticles using renewable Punica granatum juice and study of its catalytic activity. Applied Nanoscience (Switzerland), v. 4, n. 1, p. 55–59, 2014.
- [43]DE LA FUENTE-NÚÑEZ, César; HANCOCK, Robert E.W. Using anti-biofilm peptides to treat antibiotic-resistant bacterial infections. **Postdoc Journal**, v. 3, n. 2, p. 1–8, 2015.

- [44] DE SOUZA, Michele Lemos; CORIO, Paola. Solvatochromism and ionochromism of the nile blue dye a through raman, infrared and uvvis spectroscopies. Quimica Nova, v. 42, n. 9, p. 1091–1097, 2019.
- [45] DENG, Jun; YAO, Mengyun; GAO, Changyou. Cytotoxicity of gold nanoparticles with different structures and surface-anchored chiral polymers. Acta Biomaterialia, v. 53, p. 610–618, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.082>.
- [46]DING, Feng et al. Size-Dependent Inhibitory Effects of Antibiotic Drug Nanocarriers against Pseudomonas aeruginosa. ACS Omega, v. 3, n. 1, p. 1231–1243, 2018.
- [47]DREXLER, Eric et al. Unbounding the future: the nanotechnology revolution. **Choice Reviews Online**, v. 29, n. 07, p. 29-3855-29–3855, 1992.
- [48]DRUGS DEVELOPMENT & APPROVAL PROCESS. Novel Drug Approvals for 2018. U.S. Food and Drug Administration (FDA), n. January, p. 1–36, 2018.
- [49] DUDHANE, Amol A. et al. Synthesis and characterization of gold nanoparticles using plant extract of Terminalia arjuna with antibacterial activity. International Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 15, n. 2, p. 75–82, 2019.
- [50]ECDPC. Surveillance of antimicrobial resistance European centre for disease prevention and control. [S.I: s.n.], 2019. v. 317.
- [51] EFENBERGER-SZMECHTYK, Magdalena; NOWAK, Agnieszka; CZYZOWSKA, Agata. Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 0, n. 0, p. 1–30, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722060>.
- [52] ELBLING, Leonilla et al. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. FASEB Journal, v. 19, n. 7, p. 807–809, 2005.

[53]ESTEVES, Cesar. Biofilme.

- [54]FISHER, Jed F.; MEROUEH, Samy O.; MOBASHERY, Shahriar. Bacterial resistance to β-lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. Chemical Reviews, v. 105, n. 2, p. 395–424, 2005.
- [55] FRANCIS, S. et al. Green synthesized metal nanoparticles as a selective inhibitor of human osteosarcoma and pathogenic microorganisms. Materials Today Chemistry, v. 13, p. 128–138, 2019. Disponível em:

https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.04.013>.

- [56] FRIEDEN, Tom. Antiobiotic Resistance Threats in the United States, 2013. . [S.I: s.n.], 2013. Disponível em: https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- [57]GAJDÁCS, Márió; ALBERICIO, Fernando. Antibiotic resistance: from the bench to patients. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 8–11, 2019.
- [58]GHOSH, Partha et al. Gold nanoparticles in delivery applications. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 60, n. 11, p. 1307–1315, 2008.
- [59]GILJOHANN, David A. et al. Gold nanoparticles for biology and medicine. Angewandte Chemie - International Edition, v. 49, n. 19, p. 3280–3294, 2010.
- [60]GORMAN, S. P.; SCOTT, EILEEN M.; RUSSELL, A. D. Antimicrobial Activity, Uses and Mechanism of Action of Glutaraldehyde. Journal of Applied Bacteriology, v. 48, n. 2, p. 161–190, 1980.
- [61]GRADIŠAR, Helena et al. Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. Journal of Medicinal Chemistry, v. 50, n. 2, p. 264–271, 2007.
- [62]GRANJA, Andreia et al. Therapeutic potential of epigallocatechin gallate. International Journal of Green Pharmacy, v. 11, n. 3, p. S364–S370, 2017.
- [63]GUPTA, Akash et al. Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 2, p. 415–427, 2019.
- [64]HAGIWARA, Akihiro et al. Modulation of N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl) Nitrosamine-Induced Rat Urinary Bladder Carcinogenesis By Post-Treatment With Combinations of Three Phenolic Antioxidants. Journal of Toxicologic Pathology, v. 2, n. 1, p. 33–39, 2009.
- [65] HAUCK, Tanya S.; GHAZANI, Arezou A.; CHAN, Warren C.W. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. Small, v. 4, n. 1, p. 153–159, 2008.
- [66] HAYDEN, Steven C. et al. Aggregation and interaction of cationic nanoparticles on bacterial surfaces. Journal of the American Chemical Society, v. 134, n. 16, p. 6920–6923, 2012.
- [67] HEMAISWARYA, Shanmugam; KUMAR, Anil; DOBLE, Mukesh. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Science Direct, v. 15, p. 639–652, 2008.

[68] HIGDON, Jane V.; FREI, Balz. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects,

Metabolism, and Antioxidant Functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 89–143, 2003.

- [69] HONG, Jiwon et al. Analysis of the Escherichia coli extracellular vesicle proteome identifies markers of purity and culture conditions. Journal of Extracellular Vesicles, v. 8, n. 1, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1632099>
- [70] HUSSEINY, M. I. et al. Biosynthesis of gold nanoparticles using Pseudomonas aeruginosa. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 67, n. 3–4, p. 1003–1006, 2007.
- [71]IBRAHIM, Y.A.; MUSA, A.; YAKASAI, I.A. Spectrophotometric method for determination of catechins in green tea and herbal formulations. Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 16, n. 1, p. 25–30, 2017.
- [72]IMAI, Yu et al. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens.
 Nature, v. 576, n. April, 2019. Disponível em: .
- [73] IQBAL, Parvez; PREECE, Jon A.; MENDES, Paula M. Nanotechnology: The "Top-Down" and "Bottom-Up" Approaches. **Supramolecular Chemistry**, 2012.
- [74]ISHI, Takeshi et al. Human serum albumin as an antioxidant in the oxidation of (-)-epigallocatechin gallate: Participation of reversible covalent binding for interaction and stabilization. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 75, n. 1, p. 100–106, 2011.
- [75] JEON, Jiehyun et al. The antimicrobial activity of (-)-epigallocatehin-3-gallate and green tea extracts against Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli isolated from skin wounds. Annals of Dermatology, v. 26, n. 5, p. 564–569, 2014.
- [76] JIA, Hong Ying et al. Potential oxidative stress of gold nanoparticles by induced-NO releasing in serum. Journal of the American Chemical Society, v. 131, n.
 1, p. 40–41, 2009.
- [77] JOSHI, Nimisha; NGWENYA, Bryne T.; FRENCH, Christopher E. Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances. Journal of Hazardous Materials, v. 241–242, p. 363– 370, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.057>.
- [78]JR., Michael J. Pelczar; CHAN, E.C.S; KRIEG, Noel R. Microbiologia: Conceitos e aplicações. 2da Edição ed. [S.I: s.n.], 1996.

- [79]KALAISELVI, Palaniswamy et al. Cytoprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against deoxynivalenol-induced toxicity through anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms in HT-29 cells. Food and Chemical Toxicology, v. 56, p. 110–118, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.042>.
- [80]KATAS, Haliza et al. Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from Lignosus rhinocerotis and chitosan. Saudi Pharmaceutical Journal, v. 27, n. 2, p. 283–292, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.11.010>.
- [81]KATO, Yugo; YOSHIMURA, Etsuro; SUZUKI, Michio. Synthesis of Gold Nanoparticles by Extracellular Components of Lactobacillus casei. ChemistrySelect, v. 4, n. 24, p. 7331–7337, 2019.
- [82]KAYA, Zulkuf et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) exert therapeutic effect on acute inflammatory otitis media in rats. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, v. 124, n. May, p. 106–110, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2019.05.012>.
- [83]KEIJOK, Wanderson Juvencio et al. Controlled biosynthesis of gold nanoparticles with Coffea arabica using factorial design. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- [84]KHAN, Zaheer et al. Effects of solvents on the stability and morphology of CTABstabilized silver nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 390, n. 1–3, p. 120–125, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.09.015>.
- [85]KHLEBTSOV, Nikolai; DYKMAN, Lev. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies. Chemical Society Reviews, v. 40, n. 3, p. 1647–1671, 2011.
- [86]KNIDEL, Carina et al. Epigallocatechin gallate has antibacterial and antibiofilm activity in methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus of different lineages in non-cytotoxic concentrations. Natural Product Research, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1698575>.
- [87]KOENE, Miriam Gj; BLAAK, Hetty; HAVELAAR, Arie H. Risk profile on antimicrobial resistance transmissible from food animals to humans. National Institute for Public Health and the Enviroment, n. January, p. 1–122, 2010.

- [88]KRUPKOVA, Olga; FERGUSON, Stephen J.; WUERTZ-KOZAK, Karin. Stability of (-)-epigallocatechin gallate and its activity in liquid formulations and delivery systems. Journal of Nutritional Biochemistry, v. 37, p. 1–12, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.01.002>.
- [89]KUMAR BAN, Deependra; PAUL, Subhankar. Functionalized gold and silver nanoparticles modulate amyloid fibrillation, defibrillation and cytotoxicity of lysozyme via altering protein surface character. Applied Surface Science, v. 473, n. October 2018, p. 373–385, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.12.157>.
- [90]KUMAR, Dhiraj et al. Cytotoxicity and cellular uptake of different sized gold nanoparticles in ovarian cancer cells. Nanotechnology, v. 28, n. 47, p. 1–30, 2017.
- [91]LAMBERT, Joshua D. et al. Peracetylation as a means of enhancing in vitro bioactivity and bioavailability of epigallocatechin-3-gallate. Drug Metabolism and Disposition, v. 34, n. 12, p. 2111–2116, 2006.
- [92]LAMBERT, Peter. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1471–1485, 2005.
- [93]LEE, Euiyeon et al. Molecular origin of AuNPs-induced cytotoxicity and mechanistic study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- [94]LEE, You Jeong; AHN, Eun Young; PARK, Youmie. Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, p. 1–14, 2019.
- [95]LI, Xiaoning et al. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. ACS Nano, v. 8, n. 10, p. 10682–10686, 2014.
- [96]LI, Yuan Mei; WANG, Yuan Yuan; CHENG, Bo Ning. In-vitro cytotoxicity of biosynthesized gold nanoparticles against thyroid cancer cell lines. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 16, n. 7, p. 1523–1528, 2017.
- [97]LIN, Chun Cheng et al. Selective binding of mannose-encapsulated gold nanoparticles to type 1 pili in Escherichia coli. Journal of the American Chemical Society, v. 124, n. 14, p. 3508–3509, 2002.
- [98]LIU, Jun et al. Understanding the Solvent Molecules Induced Spontaneous Growth of Uncapped Tellurium Nanoparticles. Scientific Reports, v. 6, n. April, p. 1–10, 2016.

- [99]LÓPEZ-LORENTE, Ángela Inmaculada; CÁRDENAS, Soledad; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, Zaira Isabel. Effect of synthesis, purification and growth determination methods on the antibacterial and antifungal activity of gold nanoparticles. Materials Science and Engineering C, v. 103, n. October 2018, p. 109805, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109805>.
- [100]LOWE, Hannes et al. Engineering sucrose metabolism in Pseudomonas putida highlights the importance of porins. Microbial Biotechnology, v. 13, n. 1, p. 97– 106, 2020.
- [101]MACRITCHIE, Dawn M.; RAIVIO, Tracy L. Envelope Stress Responses. EcoSal Plus, v. 3, n. 2, 2009.
- [102] MAHMOUD, Mostafa; ALKHALEEFAH, Fahd; SHERIF, Doaa Mohammed. Antimicrobial effects of epigallocatechingallate and epicatechins of green tea on planktonic and biofilm forms of staphylococcus aureus, including MRSA. Nature and Science, v. 11, n. 6, p. 70–79, 2013.
- [103]MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journal of Applied Microbiology, v. 84, n. 4, p. 538–544, 1998.
- [104]MARTELLI, Giulia; GIACOMINI, Daria. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 158, p. 91–105, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.009>.
- [105] MASHBURN-WARREN, L.; MCLEAN, R. J.C.; WHITELEY, M. Gram-negative outer membrane vesicles: Beyond the cell surface. **Geobiology**, v. 6, n. 3, p. 214–219, 2008.
- [106]MERZA, Khalida S. et al. Comparative Study on Methods for Preparation of Gold Nanoparticles. Green and Sustainable Chemistry, v. 02, n. 01, p. 26–28, 2012.
- [107] MILANEZE, Bárbara A. et al. Facile Synthesis of Monodisperse Gold Nanocrystals Using Virola oleifera. Nanoscale Research Letters, v. 11, n. 1, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1186/s11671-016-1683-3>.
- [108] MOHAMED, Marwah M. et al. Antibacterial effect of gold nanoparticles against Corynebacterium pseudotuberculosis. International Journal of Veterinary Science and Medicine, v. 5, n. 1, p. 23–29, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.003>.

- [109]MOLNÁR, Zsófia et al. Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- [110] MOON, Hyun Seuk et al. Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3gallate for anti-obesity. Chemico-Biological Interactions, v. 167, n. 2, p. 85–98, 2007.
- [111]MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- [112]MULVANEY, Paul. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. Langmuir, v. 12, n. 3, p. 788–800, 1996.
- [113] MUNITA, Jose M et al. HHS Public Access Mechanisms of Antibiotic Resistance. **HHS Public Access**, v. 4, n. 2, p. 1–37, 2016.
- [114]MURAKAMI, Akira. Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 557, p. 3–10, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.04.018>.
- [115] MURALIKRISHNA, T; PATTANAYAK, Monalisa; NAYAK, P L. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using (ALOE VERA) Aqueous Extract. World Journal of Nano Science & Technology, v. 3, n. 2, p. 45–51, 2014.
- [116] NABAVIZADEH, Mohammadreza et al. Antibiofilm efficacy of positively charged imidazolium-based silver nanoparticles in Enterococcus faecalis using quantitative real-time PCR. Jundishapur Journal of Microbiology, v. 10, n. 10, 2017.
- [117]NAGLE, Dale G.; FERREIRA, Daneel; ZHOU, Yu Dong. Epigallocatechin-3gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1849–1855, 2006.
- [118]NAIMI-SHAMEL, N.; POURALI, P.; DOLATABADI, S. Green synthesis of gold nanoparticles using Fusarium oxysporum and antibacterial activity of its tetracycline conjugant. Journal de Mycologie Medicale, v. 29, n. 1, p. 7–13, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.01.005>.
- [119]NAKAYAMA, Motokazu et al. Mechanism for the antibacterial action of epigallocatechin gallate (EGCg) on Bacillus subtilis. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 79, n. 5, p. 845–854, 2015.

[120] NEU, H C. The crisis in antibiotic resistance [See comments]. Science, v. 257,

n. 5073, p. 1064–1073, 1992.

- [121]NICOLAS, Irène et al. Novel antibiotics effective against gram-positive and negative multi-resistant bacteria with limited resistance. PLoS Biology, v. 17, n. 7, p. 1–23, 2019.
- [122]NIKOO, Mehdi; REGENSTEIN, Joe M.; AHMADI GAVLIGHI, HassanAntioxidant and Antimicrobial Activities of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its Potential to Preserve the Quality and Safety of Foods. Antioxidant and Antimicrobial Activities of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its Potential to Preserve the Quality and Safety of Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 732–753, 2018.
- [123]ORTIZ-BENÍTEZ, Edgar Augusto et al. Antibacterial mechanism of gold nanoparticles on: Streptococcus pneumoniae. Metallomics, v. 11, n. 7, p. 1265– 1276, 2019.
- [124] PADIYARA, Ponnu; INOUE, Hajime; SPRENGER, Marc. Global Governance Mechanisms to Address Antimicrobial Resistance. Infectious Diseases: Research and Treatment, v. 11, p. 117863371876788, 2018.
- [125] PARK, Bong Joo et al. Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 347, n. 2, p. 401–405, 2006.
- [126] PATIL, Maheshkumar Prakash et al. Biofabrication of gold nanoparticles using Agrimonia pilosa extract and their antioxidant and cytotoxic activity. Green Chemistry Letters and Reviews, v. 12, n. 3, p. 208–216, 2019.
- [127] PERNODET, Nadine et al. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. **Small**, v. 2, n. 6, p. 766–773, 2006.
- [128] PISSUWAN, Dakrong et al. Targeted destruction of murine macrophage cells with bioconjugated gold nanorods. Journal of Nanoparticle Research, v. 9, n. 6, p. 1109–1124, 2007.
- [129]RAHARDIYAN, D. Antibacterial potential of catechin of tea (Camellia sinensis) and its applications. **Food Research**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2019.
- [130]RAI, Akhilesh; PRABHUNE, Asmita; PERRY, Carole C. Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings. Journal of Materials Chemistry, v. 20, n. 32, p. 6789–6798, 2010.
- [131]RAJU, Gayathri et al. Penetration of gold nanoparticles across the stratum

corneum layer of thick-Skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 89, n. 2, p. 146–154, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.001.

- [132] RASMUSSON, Mikael; ROUTH, Alex; VINCENT, Brian. Flocculation of microgel particles with sodium chloride and sodium polystyrene sulfonate as a function of temperature. Langmuir, v. 20, n. 9, p. 3536–3542, 2004.
- [133] REFLAN, Fitri; MEIDYAWATI, Ratna; INDRAWATI, Daru. Antibacterial efficacy of 6% green tea extract and 2% chlorhexidine against enterococcus faecalis biofilm in vitro. International Journal of Applied Pharmaceutics, v. 11, n. 1, p. 64–66, 2019.
- [134]RELLO, Jordi; BUNSOW, Eleonora; PEREZ, Antonio. What if there were no new antibiotics? A look at alternatives. Expert Review of Clinical Pharmacology, v. 9, n. 12, p. 1547–1555, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/17512433.2016.1241141>.
- [135]RETO, Márcia et al. Chemical composition of green tea (Camellia sinensis) infusions commercialized in Portugal. Plant Foods for Human Nutrition, v. 62, n. 4, p. 139–144, 2007.
- [136]RIETVELD, Anton; WISEMAN, Sheila. Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials. The Journal of nutrition, v. 133, n. 27, p. 3285– 3291, 2003. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17073577>.
- [137]ROCCARO, Andrea Sudano et al. Epigallocatechin-Gallate Enhances the Activity of Tetracycline in Staphylococci by Inhibiting Its Efflux from Bacterial Cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, n. 6, p. 1968–1973, 2004.
- [138]ROCHA, Antônio José et al. Pseudomonas aeruginosa: Virulence factors and antibiotic resistance Genes. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.
 62, p. 1–15, 2019.
- [139]RODRÍGUEZ-GATTORNO, G. et al. Metallic nanoparticles from spontaneous reduction of silver(I) in DMSO. Interaction between nitric oxide and silver nanoparticles. Journal of Physical Chemistry B, v. 106, n. 10, p. 2482–2487, 2002.
- [140]RODRÍGUEZ BAÑO, J. Nanomaterials definition matters. **Nature Nanotechnology**, v. 14, n. 3, p. 193, 2019.
- [141] ROGHANI, Mehrdad; BALUCHNEJADMOJARAD, Tourandokht. Hypoglycemic

and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechingallate in streptozotocin-diabetic rats. **Pathophysiology**, v. 17, n. 1, p. 55–59, 2010.

- [142]ROQUES, Sylvie Cambon et al. Hydrogen peroxide generation in Caco-2 cell culture medium by addition of phenolic compounds: Effect of ascorbic acid. Free Radical Research, v. 36, n. 5, p. 593–599, 2002.
- [143]ROSHMI, Thomas et al. Effect of biofabricated gold nanoparticle-based antibiotic conjugates on minimum inhibitory concentration of bacterial isolates of clinical origin. **Gold Bulletin**, v. 48, n. 1–2, p. 63–71, 2015.
- [144]ROSSI, Flávia. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.
- [145]SAEKI, Erika Kushikawa et al. Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections. Microbial Pathogenesis, v. 142, p. 1–24, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104068>.
- [146]SALAS OROZCO, Marco Felipe et al. Molecular mechanisms of bacterial resistance to metal and metal oxide nanoparticles. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 11, 2019.
- [147] SALIMIYAN RIZI, Kobra; GHAZVINI, Kiarash; NOGHONDAR, Mahdi kouhi. Adaptive Antibiotic Resistance: Overview and Perspectives. Journal of Infectious Diseases & Therapy, v. 06, n. 03, p. 9–11, 2018.
- [148] SALVIONI, Lucia et al. Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations. International Journal of Nanomedicine, v. 12, p. 2517–2530, 2017.
- [149]SARDAR, Rajesh et al. Gold nanoparticles: Past, present, and future. Langmuir, v. 25, n. 24, p. 13840–13851, 2009.
- [150] SATYANARAYANA REDDY, A. et al. Biological synthesis of gold and silver nanoparticles mediated by the bacteria Bacillus subtilis. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 10, n. 10, p. 6567–6574, 2010.
- [151]SCHUENCK, Gisele Pereira Diniz. Síntese e caracterização fisico-quimica de Nanoparticulas de ouro usando Epigalocatequina-3-galato (EGCG). Programa de Pos-graduação em biotecnologia, p. 1–101, 2018.
- [152] SHAMAILA, Shahzadi et al. Gold nanoparticles: An efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. Nanomaterials, v. 6, n. 4, p. 1–10, 2016.

- [153]SHARMA, D.; KOSANKAR, K. V. Green Tea in Green World an Updated Review. **Pharmatutor**, v. 6, n. 3, p. 09, 2018.
- [154] SHUKLA, Ravi et al. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. Langmuir, v. 21, n. 23, p. 10644–10654, 2005.
- [155]SILVER, Simon. Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. FEMS Microbiology Reviews, v. 27, n. 2–3, p. 341–353, 2003.
- [156] SINGARAVELU, G. et al. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, Sargassum wightii Greville. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 57, n. 1, p. 97–101, 2007.
- [157]SINGH, Anirudh et al. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. Biotechnology Reports, v. 25, p. e00427, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00427>.
- [158] SINGH, Brahma N.; SHANKAR, Sharmila; SRIVASTAVA, Rakesh K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. Biochemical Pharmacology, v. 82, n. 12, p. 1807–1821, 2011a.
- [159]_____. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. Biochemical Pharmacology, v. 82, n. 12, p. 1807–1821, 2011b.
- [160]SINGH, Priyanka et al. Anti-biofilm effects of gold and silver nanoparticles synthesized by the Rhodiola rosea rhizome extracts. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, v. 46, n. sup3, p. S886–S899, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1518909>.
- [161]SINIJA, V. R.; MISHRA, H. N. Green tea: Health benefits. Journal of Nutritional and Environmental Medicine, v. 17, n. 4, p. 232–242, 2008.
- [162] SOCIETY, The Royal et al. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. London The Royal Society The Royal Academy of Engineering Report, v. 46, n. July, p. 1–127, 2004. Disponível em: ">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#0>">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#0>">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#0>">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#0>">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#0>">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#0>">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#0>">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#0>">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+uncertainties#">http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nanoscience+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+nanotechnologies+:+opportunities+and+nanotechnologies+:+opportunities+:+opportunities+:+opportunities+:+opportunities+:+opportunities+:+o

[163] SOLA, Marília Cristina et al. MECANISMOS DE QUORUM SENSING E SUA

RELEVÂNCIA NA MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1419–1441, 2012.

- [164] SRIVASTAVA, Sarvesh Kumar et al. Biogenic synthesis and characterization of gold nanoparticles by Escherichia coli K12 and its heterogeneous catalysis in degradation of 4-nitrophenol. Nanoscale Research Letters, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.
- [165] STECKIEWICZ, Karol P. et al. Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model. Evaluation of the safety of use and anti-cancer potential. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 30, n. 2, p. 1–15, 2019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s10856-019-6221-2>.
- [166] STEINMANN, J. et al. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. British Journal of Pharmacology, v. 168, n. 5, p. 1059–1073, 2013.
- [167] STOIMENOV, Peter K. et al. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. Langmuir, v. 18, n. 17, p. 6679–6686, 2002.
- [168] SURAPANENI, Sunil Kumar; BASHIR, Shafiya; TIKOO, Kulbhushan. Gold nanoparticles-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. Scientific Reports, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- [169]SYED, Baker; PRASAD, NagendraM.N.; SATISHA, Sreedharamurthy. Endogenic mediated synthesis of gold nanoparticles bearing bactericidal activity. Journal of Microscopy and Ultrastructure, v. 4, n. 3, p. 162, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2016.01.004>.
- [170] TAKADA, Moriatsu et al. Suppression of human pancreatic carcinoma cell growth and invasion by epigallocatechin-3-gallate. **Pancreas**, v. 25, n. 1, p. 45– 48, 2002.
- [171] TALKINGTON, Kathy. How to Combat Antibiotic Resistance : 5 Priories for 2020. . [S.I: s.n.], 2020.
- [172] TEWARI, Divyanshi; BAUL, Supradip. Nanotechnology Market by Type (Nanodevices and Nanosensors) and Application (Electronics, Energy, Chemical Manufacturing, Aerospace & Defense, Healthcare, and Others): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2018–2025. . [S.I: s.n.], 2019.

- [173] THAKKER, Janki N.; DALWADI, Pranay; DHANDHUKIA, Pinakin C. Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Fusarium oxysporum f. sp. cubense JT1, a Plant Pathogenic Fungus. ISRN Biotechnology, v. 2013, p. 1–5, 2013.
- [174] TOWSE, Adrian et al. Time for a change in how new antibiotics are reimbursed: Development of an insurance framework for funding new antibiotics based on a policy of risk mitigation. **Health Policy**, v. 121, n. 10, p. 1025–1030, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2017.07.011>.
- [175] UESATO, Shinichi et al. Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. Cancer Letters, v. 170, n. 1, p. 41–44, 2001.
- [176] VALI, Bahareh; RAO, Leticia G.; EL-SOHEMY, Ahmed. Epigallocatechin-3gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. Journal of Nutritional Biochemistry, v. 18, n. 5, p. 341– 347, 2007.
- [177] VENTOLA, C Lee. The antibiotic resistance crisis: causes and threats. P & T journal, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.
- [178] VERMA, Ayush et al. Surface Structure-Regulated Cell Membrane Penetration by Monolayer Protected Nanoparticles. **Nat Mater**, v. 7, n. 7, p. 588–595, 2008.
- [179] VETTEN, Melissa A. et al. Label-free in vitro toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines. Particle and Fibre Toxicology, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2013.
- [180] VIGNOLI, R; SEIJA, V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica.
 Book, p. 649–662, 2000. Disponível em: .
- [181] VIJAYAKUMAR, S. et al. Therapeutic effects of gold nanoparticles synthesized using Musa paradisiaca peel extract against multiple antibiotic resistant Enterococcus faecalis biofilms and human lung cancer cells (A549). Microbial Pathogenesis, v. 102, n. 2017, p. 173–183, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.029>.
- [182] VIJAYAKUMAR, S.; GANESAN, S. In vitro cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents. Journal of Nanomaterials, v. 2012, 2012.
- [183]_____. Size-dependent in vitro cytotoxicity assay of gold nanoparticles. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 277–287, 2013.

- [184] VILLIERS, Christian L. et al. Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. Journal of Nanoparticle Research, v. 12, n. 1, p. 55–60, 2010.
- [185]WATCH, Center. FDA Approved Drugs for Infections. [S.I: s.n.], 2018. Disponível em: https://www.centerwatch.com/directories/1067-fda-approved-drugs/topic/116-infections-and-infectious-diseases>.
- [186] WATKINS, Richard R.; BONOMO, Robert A. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. Infectious Disease Clinics of North America, v. 30, n. 2, p. 313–322, 2016.
- [187]WEINREB, Orly et al. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)epigallocatechin-3-gallate: A reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. Genes and Nutrition, v. 4, n. 4, p. 283–296, 2009.
- [188]WEISBURG, Jeffrey H. et al. In vitro Cytotoxicity of Epigallocatechin Gallate and Tea Extracts to Cancerous and Normal Cells from the Human Oral Cavity.
 Pharmacology and Toxicology, v. 95, n. 4, p. 191–200, 2004.
- [189]WOOD, Lauren. Global Nanotechnology Market Outlook 2024. [S.I: s.n.], 2019. Disponível em: https://www.prnewswire.com/news-releases/global-nanotechnology-market-outlook-2024-300924265.html.
- [190]WRIGHT, Gerard. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, n. 14, p. 4055–4061, 2011.
- [191]WRIGHT, Gerard D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 57, n. 10, p. 1451–1470, 2005.
- [192]YEH, Yi Cheun; CRERAN, Brian; ROTELLO, Vincent M. Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology. Nanoscale, v. 4, n. 6, p. 1871–1880, 2012.
- [193]YU, Hai Ning; SHEN, Sheng Rong; XIONG, Yao Kang. Cytotoxicity of epigallocatechin-3-gallate to LNCaP cells in the presence of Cu2+. Journal of Zhejiang University: Science, v. 6 B, n. 2, p. 125–131, 2005.
- [194]YU, Qilin et al. Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells. Scientific reports, v. 6, n. March, p. 26667, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/srep26667>.
- [195]YUSSOF, Ayuni et al. Epigallocatechin Gallate-Stearate Enhances the Efficacy of Antibiotics. **Open Journal of Medical Microbiology**, v. 09, n. 03, p. 77–94,

2019.

- [196]ZAWRAH, M. F.; ABD EL-MOEZ, Sherein I. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens. Life Science Journal, v. 8, n. 4, p. 37–44, 2011.
- [197]ZHANG, Lan cui et al. Investigations of the cytotoxicity of epigallocatechin-3gallate against PC-3 cells in the presence of Cd2+ in vitro. Toxicology in Vitro, v. 22, n. 4, p. 953–960, 2008.
- [198]ZHANG, Le et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in or on Nanoparticles: Enhanced Stability and Bioavailability of EGCG Encapsulated in Nanoparticles or Targeted Delivery of Gold Nanoparticles Coated with EGCG. Handbook of Nanotoxicology, Nanomedicine and Stem Cell Use in Toxicology, n. 8, p. 131–144, 2014.
- [199]ZHANG, Liangliang; LIU, Yuchen; WANG, Yongmei. Interaction between an (-)-epigallocatechin-3-gallate-copper complex and bovine serum albumin: Fluorescence, circular dichroism, HPLC, and docking studies. Food Chemistry, v. 301, n. July, p. 125294, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125294>.
- [200]ZHANG, Xuwang et al. Biogenic synthesis of gold nanoparticles by yeast Magnusiomyces ingens LH-F1 for catalytic reduction of nitrophenols. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 497, p. 280– 285, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.02.033>.
- [201]ZHAO, Lin et al. Green tea catechins quench the fluorescence of bacteriaconjugated Alexa Fluor dyes. Inflammation and Allergy - Drug Targets, v. 12, n. 5, p. 308–314, 2013.
- [202]ZHAO, Wei-hua et al. Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and B-Lactams against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.
 Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, n. 6, p. 1737–1742, 2001.
- [203]ZHAO, Yuyun et al. Small molecule-capped gold nanoparticles as potent antibacterial agents that target gram-negative bacteria. Journal of the American Chemical Society, v. 132, n. 35, p. 12349–12356, 2010.
- [204]ZHENG, Kaiyuan et al. Antimicrobial Gold Nanoclusters. ACS Nano, v. 11, n.7, p. 6904–6910, 2017.

8. ANEXOS

8.1 Calculo de concentração de AuNPs-EGCG para os testes de citotoxicidade e antibacteriano.

As AuNPs-EGCG foram concentradas de acordo à quantidade de EGCG presente na superfície de ouro. Uma curva padrão da molécula de EGCG foi realizada utilizando as concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 µg.mL⁻¹ conforme na Figura 30. As amostras foram lidas em espectrofotômetro UV/Visível em um comprimento de onda de 274 nm (máxima absorção) (IBRAHIM; MUSA; YAKASAI, 2017) para determinar a equação da reta conforme na Figura X.



Figura 30. Curva padrão da EGCG nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 μ g. mL⁻¹ e com leituras a 274nm em espectrofotômetro UV/Vis. A curva apresenta o valor do coeficiente de correlação (R) e a equação da reta obtida (y=mx+b).

Uma amostra de AuNPs-EGCG foi lavada (ressuspendida) em água ultrapura e seguidamente foi lida em 274 nm obtendo uma absorbância de 0.9327. A partir da equação da reta foi calculada a concentração de EGCG da seguinte forma:

Y = 0.01752 * X + 0.1363 X = (0.9247 - 0.1363) / 0.01752 X= **45.4567 μg.mL⁻¹ de EGCG**

Por meio da técnica de plasma indutivamente acoplado a um espectrômetro de massas (ICP-MS) foi determinada a concentração de ouro reduzido em AuNPs-EGCG. O resultado foi de 1.72 nM (nanomolar). Por tanto o cálculo para concentrar

as AuNPs-EGCG foi realizado da seguinte forma (tomando como exemplo a concentração de 120 µg.mL⁻¹):

1.72 nM de ouro reduzido ----> 45.4567 μg.mL⁻¹ de EGCG X ----> 120 μg.mL⁻¹ de EGCG

Resultado X= **4.5406** -----> dividindo: <u>4.5406</u> = **2.64** 1.72

O resultado indica que se necessita centrifugar 2.64 mL de AuNPs-EGCG e ressuspender em 1 mL de água ultrapura para obter uma concentração de 120 µg.mL⁻¹.

A partir da solução de 120 µg.mL⁻¹, as AuNPs-EGCG foram diluídas para obter as outras concentrações utilizadas nos testes (60, 30, 15 e 7.5 µg.mL⁻¹).

8.2 Desenvolvimento do projeto

A realização de cada teste do presente projeto precisou da dedicação de tempo (horário de trabalho no laboratório) nas seguintes atividades:

Atividade	Tempo dedicado (horas e dias)	
Planejamento	2 horas	
Preparos prévios	3 - 24 horas	
Execução	1 – 72 horas	
Análise dos resultados	1 – 3 horas	
Estudo	3 – 7 dias	
Escrita	2– 5 dias	

8.3 Perspectivas de mercado.

Com base aos resultados obtidos, as AuNPs-EGCG representam um sistema capaz de inibir o crescimento das bacterias em baixas concentrações e com resultados observados a partir de 12 hrs de tratamento. A estratégia terapêutica das AuNPs-EGCG consiste em agir por diferentes mecanismos para otimizar a resposta antibacteriana. Por tanto, as AuNPs-EGCG também poderiam antibacterianos viáveis em doenças mais complexas como câncer, processos virais e inflamatórios.

As AuNPs-EGCG apresentaram baixa citotoxicidade em concentrações por encima dos valores de CMI nas bacterias tratadas. Por tanto, as NPs podem induzir efeitos tóxicos nas bacterias sem afetar a integridade das células humanas involucradas. Em vista desses resultados, a solução coloidal poderia ser implementada em alguma forma farmacêutica para tratar infecções a nível cutâneo ocasionadas pelas bacterias tratadas nesse estudo.

A demanda de produtos biologicamente seguros no campo alimentício tem incrementado devido a conservantes sintéticos antioxidantes altamente cancerígenos e tóxicos como o butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) (HAGIWARA et al., 2009). As AuNPs-EGCG podem proteger da deterioração bacteriana, assim também podem inibir a oxidação de ácidos graxos por espécies radicais. Esses processos constituem os principais fatores que levam a degeneração de alimentos (MARTELLI; GIACOMINI, 2018). Por tanto as AuNPs-EGCG também poderiam ser exploradas como conservantes em produtos alimentícios.

8.4 Inserção social do projeto

Os custos para a investigação e desenvolvimento de antibióticos a partir de produtos sintéticos podem alcançar os 350 milhões de dólares (USD) para programas individuais que não contam com algum tipo de incentivo econômico adicional (TOWSE et al., 2017).

Os métodos físicos e químicos de síntese de AuNPs envolvem uso de grandes quantidades de energia, maquinaria complexa e agentes tóxicos para a saúde humana e ambiental. A traves de biossínteses podem ser obtidas nanopartículas estáveis, reproduzíveis, não toxicas e benignas para o meio ambiente. No entanto um dos maiores benefícios desses métodos de síntese verde são sua simplicidade e o baixo custo que eles envolvem. O projeto foi desenvolvido com um investimento de ~850 R\$ (valor correspondente somente aos custos de matérias primas) para conseguir sintetizar ~ 440 mL de AuNPs-EGCG na concentração de 120 µg.mL⁻¹.

Portanto, as AuNPs-EGCG contam o potencial para ser incorporadas em uma forma farmacêutica que lhes permita desenvolver seu efeito bacteriano. Esse agente antibacteriano pode ser um produto viavelmente econômico para industrias farmacêuticos e centros clínicos e hospitalários, devido a que apresentam um amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas sobre tudo em bactérias como *P. aeruginosa e E. coli,* quem apresentam as maiores taxas de resistência contra antibióticos hospitalários (ECDPC, 2019).

8.5 Artigo

High antibacterial *in vitro* performance of gold nanoparticles synthetized by Epigallocatechin 3-Galate.

Sady Roberto Rodriguez Avila ^a, Gisele Pereira Diniz Schuenck ^a, Laryssa Pinheiro Costa e Silva ^a, Wanderson Juvencio Keijok ^a, Lorena Martins Xavier^b, Denise Coutinho Edringer^b, Jairo Pinto de Oliveira ^a, Ricardo Pinto Schuenck^c and Marco Cesar Cunegundes Guimarães ^{a*}

^a Department of Morphology, Center of Health Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitória, 29047-105, Brazil.

^b Vila Velha University, Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, 29102-770, Brazil.

^c Department of Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitória, 29047-105, Brazil.

*Corresponding author: Marco Cesar Cunegundes (<u>marco.guimaraes@ufes.br</u>). Av. Marechal Campos, 1468 - Maruípe, Vitória - ES, 29047-105



ABSTRACT

Over time, bacteria have developed defense mechanisms against conventional antibiotics, which, associated with a lack of new drugs, makes antibiotic resistance an urgent world health problem. Therefore, the development of multi-target, innovative and more effective antibacterial agents is necessary in order to overcome this threat to human health. The present work evaluated antibacterial activity of gold nanoparticles reduced and stabilized with Epigallocatechin 3-Gallate (EGCG). These nanoparticles (AuNPs-EGCG) showed optimal stability in physiological *in vitro* conditions and could be resuspended in various solvents. The *in vitro* antibacterial activity of AuNPs-EGCG against both Grampositive and Gram-negative bacteria was evidenced through the inhibition of viable cell growth, with MIC values that varied between 15 and 120 µg.mL⁻¹ in all treated bacteria. The antibacterial effects of the nanoformulation were the result of a direct interaction with the surfaces of treated bacteria, causing morphological deformations that lead to lysis and cell death. In addition, *in vitro* cytotoxicity analyses in murine fibroblast cells (L929) and human keratinocytes (HaCaT) showed high levels of cell viability and
IC50 values of 267.55 e 293.04 μg.mL⁻¹, respectively after 24 hours of treatment with AuNPs-EGCG. Thus, in its functionalized form in gold nanoparticles, EGCG had its antibacterial activity potentiated and cytotoxicity reduced. AuNPs-EGCG show high potential for future biomedical field applications, as antibacterial treatment against skin infections.

Key-words: Green synthesis. Gold nanoparticles. Antibacterial activity. Epigallocatequin 3-Galate. Cytotoxicity.

1. INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), increasing antibiotic resistance has become an urgent worldwide health concern that accounts for 35,000 deaths per year, with one death being recorded every 15 minutes [1]. The evolution of microorganisms has allowed the development of defense mechanisms against antibiotics [2], which is aggravated by the habit of self-medication, misprescriptions, overuse of antibacterials in agriculture and low- quality antibiotics [3]⁻[4]. Therefore, the development of new multi-target, innovative and more effective antibacterial agents is necessary in order to overcome this threat to human health. Gold nanoparticles (AuNPs) have attracted great interest due to their excellent antibacterial properties and low toxicity in human cells [5]. AuNPs can overcome bacterial defense mechanisms, for they may attack several bacterial cell pathways at a time [6]. Such properties make them ideal systems for counteracting bacterial resistance, what can be affected mainly by physicochemical characteristics such as AuNPs' size, shape and surface charge [7].

Although AuNPs can be manufactured using various physical and chemical methods, these involve the use of toxic materials, complex machinery, high energy consumption, high costs and low yields [6]. Gold nanoparticles can also be obtained from green synthesis methods, which are stable, reproducible, non-toxic, low-cost and benign for the environment. The use of plant parts in green synthesis is much more favorable than other biological approaches such as fungus, enzymes and bacteria [8]. In bioassays, the biological activities of a plant can be more easily studied from isolated molecules than crude extracts, due to adverse effects, synergism and antagonism by interaction of various molecules [9]. In this work, epigallocatechin 3-gallate (EGCG), a molecule extracted from green tea, was used as a reducing agent and stabilizer for AuNPs.

EGCG is the main flavonoid extracted from the leaves of *Camellia sinensis* [10]. Its polyhydroxyl structure is related to some of its biological properties such as antitumor [11]⁻ [12], antioxidant [13], antibacterial [14], antiviral [15] and anti-inflammatory [16]. However, EGCG's biological activities can be limited by its low *in vivo* bioavailability under acidic conditions [17]. That can be dealt with through the use a vehicle that transports EGCG to the action site and prevents easy degradation within the organism [18]. EGCG can act as an excellent stabilizing and reducing agent for gold nanoparticles. Therefore, the adsorption

of EGCG on the surface of a gold core could improve its stability [19] and potentiate its antibacterial effect. However, the bacterial toxicity of EGCG-linked AuNPs has not been as studied as that of those synthesized in isolated conditions, which have been shown to damage the bacterial cell wall.

In this study, we propose to undertake the green synthesis of highly antibacterial AuNPs, reduced and stabilized with epigallocatechin-3 gallate (AuNPs-EGCG). Our hypothesis suggests that AuNPs-EGCG may interact with the bacterial cell wall in a direct way, causing morphological changes, membrane rupture and damage to intracellular structures that induce cell death. This opens up the possibility of combating different targets in multi-drug resistant (MDR) bacteria with AuNPs, thus replacing conventional antibiotics. We showed that these AuNPs can be easily prepared by a green synthesis method, working as potent therapeutic agents against Gram-negative and -positive bacteria.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1 AuNPs-EGCG synthesis. Synthesis was confirmed by the solution changing its color to red, which indicates that gold was reduced to its neutral state. The effect of surface plasmon resonance (SPR) was observed at 527 nm in the absorption spectrum. Full width at half maximum (FWHM) value of the curve indicates that the nanoparticles have a good dispersion in solution (Fig. 1). Synthesized AuNPs-EGCG were approximately 14.54 nm in size and predominantly spherical in shape (aspect ratio 1.1) [20].



Figure 1. UV / visible absorption spectrum of AuNPs-EGCG synthesis.

The highly nucleophilic hydroxyl groups of EGCG are easily deprotonated in solution releasing hydrogen atoms [21]. Alternatively, gold can be reduced due to the acquisition of an electron pair around the oxygen of EGCG's hydroxyl groups. The final product is a gold core coated with EGCG molecules linked by electrostatic interactions, stabilizing the system (Fig. 2).



Figure 2. Scheme of EGCG adsorption on the surface of the gold core.

2.2 AuNPs-EGCG resuspension. The behavior of resuspended AuNPs-EGCG was evaluated in water, PBS, DMSO and Mueller Hinton broth II (cation adjusted), according to the absorption curves in the UV/vis region and changes in shape, size and dispersion (Table 1). AuNPs-EGCG resuspended in water showed a slight hypsochromic shift (also known as blue shift) due to the solvatochromic effect [22] (Fig. 3). This phenomenon occurs mainly in metal complexes depending on the polarity of the solvent and changes in the color of the solute in a solvent. These properties modify the electron density of substances [23]. Therefore, the decrease in the red color of AuNPs-EGCG, along with the polarity of the water molecule, induces a shift to states of greater energy (shorter wavelengths). These changes manifested themselves as slight variations in size and shape due to polydispersion and formation of small aggregates in the solution. Usually, enthalpy changes of the system are related to a decrease in the size of the nanoparticles [24].



Figure 3. UV/Visible absorption spectra of AuNPs-EGCG resuspended in water.

Rotation / Time	FWHM	λ maximum	Max. Abs.
Control	54,2519	527	0,4364
6000 rpm / 5 min	38,0309	521	0,0782
8000 rpm / 5 min	45,4955	522	0,1133
10000 rpm / 5 min	49,5316	524	0,1495
12000 rpm / 5 min	49,4562	524	0,1969
14000 rpm / 5 min	51,9155	522	0,2389
6000 rpm / 10 min	54,2918	522	0,2539
8000 rpm / 10 min	54,3059	523	0,3414
10000 rpm / 10 min	54,2425	523	0,3756
12000 rpm / 10 min	53,8241	525	0,3931
14000 rpm / 10 min	53,8645	523	0,3952
6000 rpm / 20 min	54,3263	522	0,2083
8000 rpm / 20 min	54,3415	523	0,3565
10000 rpm / 20 min	54,2384	523	0,3696
12000 rpm / 20 min	54,1925	525	0,3815
14000 rpm / 20 min	53,5898	525	0,3992

Table 1. Evaluation of the parameters full width at half maximum (FWHM), λ maximum and maximum absorbance of AuNPs-EGCG resuspended in water.

As a protic solvent, water has a high dielectric constant, hydrogen bonds and two electrical poles that can interact with cationic and anionic charges present on the surface of AuNPs. These characteristics make AuNPs-EGCG easily recovered in water due to their high solvation capacity [25]. The best results in terms of yield and dispersion were obtained under the conditions of 14000 rpm / 20 minutes. Thus, these conditions were selected for resuspension in the next solvents used in cytotoxicity and antibacterial assays.



Figure 4. UV/Visible absorption spectra of AuNPs-EGCG resuspended in DMSO, PBS buffer, Mueller Hinton agar and Mueller-Hinton broth II (cation adjusted).

Solvent	FWHM	λ maximum	Max. Abs.
Control	54,13288	527	0,43313
DMSO	55,38419	525	0,31985
PBS	55,23362	525	0,33615
Mueller-Hinton broth II (cation adjusted)	53,79163	526	0,34156

Table 2. Evaluation of the parameters full width at half maximum FWHM, λ maximum and maximum absorbance.

When resuspended in the other solvents, AuNPs-EGCG showed a decrease in the absorption band (Fig. 4), due to interactions with the liquid medium. Nucleophilic solvents tend to decrease the volume of NPs by increasing the electronic charge on the surface [24]. DMSO is a polar aprotic solvent with a highly nucleophilic oxygen and sulfur center. Also, its solvation capacity is limited to interacting only with cations without hydrogen bonding [26]. These characteristics induce a decrease in the concentration of AuNPs-EGCG in solution. On the other hand, the interaction of cations and anions with the surface of the NPs can favor the volume in solution. Mueller Hinton broth II (cation adjusted) has an adjustment of calcium and magnesium cations, creating an electrophilic environment that stabilizes the electronic charge around AuNPs-EGCG. This is also the case of the ion density present in PBS buffer. Both solvents presented the highest yield values after resuspension (Table 2).

As observed in water resuspension, AuNPs-EGCG also showed a blue shift in the other solvents tested, indicating the formation of small aggregates during centrifugation, as shown in Table 2. AuNPs-EGCG behaved better in protic and electrophilic solvents due to charge interactions between the NPs' surface and the solvent.

2.3 Analysis of AuNPs-EGCG stability. Stability of AuNPs-EGCG was analyzed in simulated physiological conditions regarding salt and pH, using a flocculation parameter based on the absorption spectrum between 600 - 800 nm [27]. AuNPs-EGCG did not show aggregation in any tested sodium chloride concentration, as can be seen in the absorption bands respect to the control (Fig. 5A). The area under the curve in the 600 to 800 nm range remained stable respect to the control without showing any type of shift in the absorption band (p <0.05) (Fig. 5B). The 200 mM concentration represents the double of the normal blood sodium concentration. Therefore, AuNPs-EGCG showed excellent stability in the presence of a high concentration of saline solution.

AuNPs-EGCG remained stable at pH values between 1 – 9 respect to the control (p < 0.05) (Fig. 5A and B). This is a favorable result, for at acidic pH (2 - 5.5) EGCG can suffer epimerization to its trans form [18], which inactivates it and reduces its *in vivo* bioavailability. Therefore, the gold colloidal system could be a suitable solution to overcome this problem. In basic conditions (11 - 13), AuNPs-EGCG manifested a greater degree of flocculation, as can be seen by the increase of the area under the curve in the 600 - 800 nm range (p < 0.0001) (Fig. 5C and D). Destabilization at extremely basic pH values can be caused by deprotonation and consequent oxidation of EGCG' hydroxyl groups, which results in loss of stabilizing function in AuNPs-EGCG.



Figure 5. Flocculation degree of AuNPs-EGCG as a function of salt variation (A). Effect of salt variation on the area under the curve between 600-800 nm (B). Flocculation degree of AuNPs-EGCG as a function of pH variation (C). Effect of pH variation on the area under the curve between 600-800 nm. The results are represented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of independent experiments in triplicate. **** p <0.0001 vs. control.

AuNPs-EGCG zeta potential was -24.3 mV, indicating that these nanoparticles have a negative charge in solution. This also indicates that the colloid is stable in solution, for stability increases as the zeta potential value moves away from zero, thus resulting in less aggregation [28]. The negative charge can be explained by the presence of highly nucleophilic hydroxyl groups that are easily deprotonated in aqueous medium.

2.4 *In vitro* cytotoxicity. According the Figure 6, the gold salt yielded viability percentages \geq 80% in L929 cells at concentrations below 42.5 µg.mL⁻¹. At the maximum gold concentration tested here, cytotoxicity increased to 59.88%. In HaCaT cells, proliferation remained above 75.4% at all concentrations tested. Gold showed less cytotoxicity in HaCaT cells than in L929. These differences in cell viability could be related to physical-chemical differences between the cell lines tested.



Figure 6. Cell viability after 24 hours of treatment with gold salt at concentrations of 85, 42.5, 21.25, 10.63 and 5.31 μ g.mL⁻¹ in murine fibroblasts (L929) and human keratinocytes (HaCaT). Cell viability was calculated as the percentage of viable cells compared to untreated controls. The results are represented as the mean viability ± standard error of the mean (SEM) of independent experiments in triplicate. * *p* <0.05, *** *p* <0.001 and **** *p* <0.0001 of L929 vs. HaCaT.

AuNPs-EGCG showed low cytotoxicity levels in L929 and HaCaT cells (Fig. 7A and B). At concentrations over 30 μ g.mL⁻¹, EGCG decreased the viability of L929 cells compared to AuNPs-EGCG. At the highest concentration evaluated here (120 μ g.mL⁻¹), EGCG was found to be extremely toxic to these cells, presenting 93.97% cytotoxicity, while AuNPs-EGCG showed only 29.2% of cytotoxicity at that same concentration (*p* < 0.0001) (Fig. 7A). The viability percentages in L929 cells varied between 71 and 82% with the treatment of AuNPs-EGCG.



Figure 7. Cell viability after 24 hours of treatment with EGCG and AuNPs-EGCG at concentrations of 120, 60, 30, 15 and 7.5 μ g.mL⁻¹ in (A) murine fibroblasts (L929) and (B) human keratinocytes (HaCaT). Cell viability was calculated as the percentage of viable cells compared to untreated controls. The results are represented as the mean viability ± standard error of the mean (SEM) of independent experiments in triplicate. ** *p* <0.01 and **** *p* <0.0001 of EGCG vs. AuNPs-EGCG.

AuNPs-EGCG showed greater biosafety in HaCaT cells than in L929 cells with viability percentages between 78 and 98% (Fig. 7B). As in L929 cells, the maximum concentration of EGCG tested showed toxic effects, affecting cell proliferation by 70.1%, however, treatment with AuNPs-EGCG showed 22% (p < 0.0001). The concentration of 7.5 µg.mL⁻¹ of EGCG showed a percentage of cell proliferation by 118.85%, indicating a stimulus of the mitochondrial function of HaCaT cells at this concentration. In both cell lines, treatment with AuNPs-EGCG was less toxic than EGCG at all concentrations tested as shown in Figure 7 (p < 0.01 and p < 0.0001). The cytotoxicity of AuNPs-EGCG and EGCG in both cell lines was dosedependent, meaning that higher concentrations will induce greater cell damage.

According to several studies, AuNPs obtained by green synthesis increase cell survival levels in L929 [29] and HaCaT cells, with cell proliferation levels above 88% at concentrations <100 μg.mL⁻¹ [30]. The use of non-toxic plant materials as reducing agents can decrease cell death levels when compared to chemical agents [31].

Generally, AuNPs toxicity is evidenced by deterioration in the cytoplasmic membrane as well as in mitochondrial function, thus cell proliferation is reduced [32]. However, several authors have stated that AuNPs are harmless to human cells [33], [34], [35], [36]. In terms of biocompatibility and cytotoxicity, AuNPs stand out from the rest of metallic nanoparticles [37].

Cells / Sample	Gold salt	EGCG	AuNPs-EGCG
L929	117.67	47.14	267.55
HaCaT	291.35	98.91	293.04

Table 3. Maximum Inhibitory Concentration at 50% (IC50) of the gold salt (HAuCl4), EGCG and AuNPs-EGCG after24 hours of treatment in murine fibroblasts (L929) and human keratinocytes (HaCaT).

The IC50 values for each sample after treatment in both cell lines are found in Table 5. Note that the samples treated in HaCaT cells showed higher concentrations to inhibit 50% of the cell population compared to L929 cells, as evidenced with the percentages of cell viability.

According to the results of the metallic salt, the process of reducing gold to "nano" scale sizes improved its cytotoxicity *in vitro*, especially in L929 cells. The cytotoxicity of AuNPs can be reduced by eliminating the Au⁺³ ions (gold that wasn't reduced) present in the colloidal solution, through centrifugation [38]. Therefore, the bulk gold can manifest greater toxicity than colloid. However, others works determined that gold has the same potential toxicity in both ionic and nanoparticles forms [39], [40], as seen in the results of HaCaT cells, where the gold salt showed an IC50 value close to the AuNPs-EGCG.

The *in vitro* cytotoxicity of EGCG in both lines cells was reduced when it is functionalized on the surface of gold compared to its original form, as evidenced by the increase in the viability percentages and IC50 values in the treatment with AuNPs-EGCG. According to one work, the functionalization of green tea derivatives in gold colloidal systems may reduce the toxic effects of molecules on keratinocytes compared to isolated conditions [41]. Some molecules can manifest high toxicity in their original form, however when they are conjugated on a gold surface, their cytotoxicity tends to decrease [42].

According to ISO 10993-5: 2009, a substance is considered non-cytotoxic when the cell viability *in vitro* is greater than 70%, that means that the percentage of dead cells must not exceed 30% (ISO, 2009). Therefore, AuNPs-EGCG can be considered non-cytotoxic products in the tested cell lines, because the percentages of cell viability were >71% for L929 cells and >78% for HaCaT cells at all tested concentrations. An *in vivo* study using a skin segment from rat hind paws, showed that 22 nm AuNPs were more absorbed compared to larger ones (200nm). Furthermore, it was demonstrated that AuNPs have good transdermal movement in thin skin [43]. Therefore, AuNPs-EGCG could be a safe and effective alternative skin infection treatment.

2.5 AuNPs-EGCG antibacterial activity. The *in vitro* antibacterial effect of AuNPs-EGCG and EGCG was evaluated through the analysis of bacterial growth curves and determination of the minimum inhibitory

concentration (MIC) for each sample, as well as by the interaction between bacteria and AuNPs-EGCG through scanning electron microscopy (SEM).



Figure 8. Bacterial growth curves upon treatment with AuNPs-EGCG after 12, 24 and 48 hours. (A) *S. aureus* 25923 (B) *S. aureus* 10A (C) *P. aeruginosa* 27853 (D) *P. aeruginosa* 93B (E) *E. coli* ESBL (F) *E. faecalis* 6885. The results are represented as the mean optical density \pm standard error of the mean (SEM) of independent experiments in triplicate. ** p <0.01, *** p <0.001 and **** p <0.0001 vs. control.

According to the growth curves, the bacteria suffered a noticeable decrease in growth after 12 hours of treatment with AuNPs-EGCG (p < 0.0001) (Fig. 8). However, at AuNPs-EGCG concentrations below 60 μ g.mL⁻¹, treated Gram-positive bacteria were able to continue growing after 24 and 48 hours (Fig. 8A, B and F). The antibacterial effect of AuNPs-EGCG on treated Gram-negative bacteria was maintained after 48 hours (Fig. 8B, C and D).



Figure 9. Inhibition levels (%) upon treatment with AuNPs-EGCG after 48 hours. (A) *S. aureus* 25923 (B) *S. aureus* 10A (C) *P. aeruginosa* 27853 (D) *P. aeruginosa* 93B (E) *E. coli* ESBL (F) *E. faecalis* 6885. Bacterial inhibition was calculated as the percentage of cells inhibited compared to untreated controls. The results are represented as the mean inhibition ± standard error of the mean (SEM) of independent experiments in triplicate.

From the optical density at 600 nm in 48 hours of treatment, percentages of inhibition were calculated for each bacterium as shown in Figure 9. Note that all bacteria were susceptible to treatment with AuNPs-EGCG in all concentrations tested, thus demonstrating the bacterial activity of the nanoparticles in the six bacteria under study. *S. aureus* 10A, *P. aeruginosa* (both strains) and *E. coli* ESBL suffered inhibition levels over 80% for all tested concentrations (Fig. 9B, C, D and E). On the other hand, *S. aureus* 25923 and *E. faecalis* 6885 were more resistant to treatment with AuNPs-EGCG, with inhibition levels below 50% at 7.5, 15 and 30 μg.mL⁻¹ (Fig. 9A and F).



Figure 10. Inhibition levels (%) upon treatment with EGCG after 48 hours. (A) *S. aureus* 25923 (B) *S. aureus* 10A (C) *P. aeruginosa* 27853 (D) *P. aeruginosa* 93B (E) *E. coli* ESBL (F) *E. faecalis* 6885. Bacterial inhibition was calculated as the percentage of cells inhibited compared to untreated controls. The results are represented as the mean inhibition ± standard error of the mean (SEM) of independent experiments in triplicate.

In the treatment with EGCG (Fig. 10), it was observed that most of the bacteria were less susceptible compared to the results with AuNPs-EGCG. The clinical strain of *S. aureus* was the most sensitive with percentages of inhibition between 83 - 93% in all tested concentrations as shown in Fig. 10B. This effect may be due to the high affinity of the molecule to interact directly with the peptidoglycan layer in some pathogens such as *S. aureus* [44]. On the other hand, *P. aeruginosa* (both strains), *E. coli* and *E. faecalis* showed greater resistance to treatment compared to AuNPs-EGCG, mainly at concentrations of 7.5 and 15 µg. mL⁻¹ where the percentages of inhibition were below 50% of the treated bacterial population as shown in Fig. 10C, D, E and F. It is observed that the inhibitory effects of AuNPs-EGCG and EGCG were also dose-dependent (Fig. 9 and 10).

Minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of an antibacterial agent that inhibits the growth of a microorganism after incubation [45]. MIC values can be expressed as the concentration upon which bacteria are inhibited by 90%, based on optical density. MIC values for AuNPs-EGCG and EGCG are shown in table 4.

Bacteria	AuNPs-EGCG	EGCG
S. aureus 25923	120	60
S. aureus 10A	15	15
P. aeruginosa 27853	15	60
P. aeruginosa 93B	60	120
E. coli ESBL	30	120
E. faecalis 6885	120	120

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of AuNPs-EGCG and EGCG for each bacterial strain.

MIC values of AuNPs-EGCG varied among bacterial strains. Treatment with AuNPs-EGCG was highly effective in *S. aureus* 10A and *P. aeruginosa* 27853, with a MIC value of 15 μg.mL⁻¹. On the other hand, only at the highest concentration tested here (120 μg.mL⁻¹), was AuNPs-EGCG capable of inhibiting 90% of the bacterial density related to *S. aureus* 25923 and *E. faecalis* 6885. For *P. aeruginosa* 93B and *E. coli* ESBL, we detected intermediate MIC values of 60 and 30 μg.mL⁻¹, respectively.

AuNPs-EGCG showed lower MIC values than EGCG in the treatment of *P. aeruginosa* (both strains), *E. coli* and *E. faecalis*. As to *S. aureus* 10A, the same susceptibility was observed when both samples were employed. However, treatment with EGCG inhibited 90% of the bacterial population related to *S. aureus* 25923 at a lower concentration (60 μ g.mL⁻¹) than AuNPs-EGCG (120 μ g.mL⁻¹).

Therefore, AuNPs-EGCG were more effective than EGCG as antibacterial agents, except for *S. aureus* 25923. The antibacterial activity of EGCG was, therefore, increased by its being absorbed in a gold core (AuNPs-EGCG), compared to isolated conditions. This effect is evidenced by the decrease in MIC values of AuNPs-EGCG compared to EGCG.

MIC values of AuNPs could vary according to the reducing agent, size and type of bacteria. AuNPs with sizes between 7-34 nm showed MIC values between 3 - 7.6 μ g.mL⁻¹[46]. However, larger AuNPs (30 nm) had a MIC value of 200 μ g.mL⁻¹[47]. Other studies have confirmed that AuNPs display antibacterial activity at 3 μ g.mL⁻¹[48] and 50 μ g.mL⁻¹[49]. Antibiotics such as ciprofloxacin, gentamicin, rifampicin and vancomycin can have their MIC values decreased when conjugated to the surface of AuNPs [50].

Therefore, AuNPs can potentiate the antibacterial effects of conjugated molecules on their surface by reducing their MIC values in some pathogens. In addition, gold nanoparticles can act as excellent delivery systems for antibacterial agents at sites of interest [51] due to their physical-chemical characteristics that facilitate passage through tissues.





The susceptibility of bacteria to treatment with AuNPs-EGCG may depend on their morphological characteristics, especially on the physicochemical properties of bacterial membranes. AuNPs can easily perforate the cell membrane of Gram-negative bacteria compared to that of Gram-positive ones [8]. The membrane of Gram-negative bacteria is composed of a thin layer of peptidoglycan, as opposed to the thick layer present in Gram-positive ones. This structure is an important component for the pathology of bacteria [46]. Therefore, a thicker peptidoglycan layer can reduce the degree of AuNPs-EGCG penetration through the cell wall and consequently decrease the antibacterial effect on Gram-positive bacteria. In addition, teichoic and lipoteichoic acids present in Gram-positive bacteria can prevent their interaction with AuNPs-EGCG by means of repulsive forces between the negative surface charge of AuNPs and the negative charges of these acids [52].

Treated Gram-positive bacteria showed structural deformations as shown in Fig. 11B and D. Those could be the result of AuNPs-EGCG being smaller (14.54 nm) than the outer surface layer of the bacterial cell envelope, referred to as "S-layer" (roughly 25 nm). These differences in size facilitate the adhesion of AuNPs to the cell surface of bacteria, thus inducing deformations that cause cell death [8].

Defective multicellular forms can also occur through the interaction between AuNPs and enzyme receptors present in the bacterial membrane [53]. Autolysins are autolytic enzymes that participate in the degradation of peptidoglycans [54]. Therefore, AuNPs-EGCG can act by inactivating the autolysin inhibitor or by activating these enzymes. Accumulation of autolysins in the cell wall will hinder bacteria from properly separating during growth, leading to deformations in the bacterial layer.

The presence of "holes" in the cell wall of treated Gram-positive bacteria can be described as fissures caused by the penetration of AuNPs-EGCG through a porous membrane (Fig. 11 B and D). The porosity of the membrane is a result of structural deterioration caused by AuNPs [55].



Figure 12. Scanning electron microscopy (SEM) of bacteria in control conditions and upon treatment with AuNPs-EGCG. (A and B) *P. aeruginosa* 93B. (C and D) *E. coli* ESBL.

In Gram-negative bacteria, AuNPs penetrate the membrane through porin channels [56] by biosorption or diffusion through the membrane bilayer matrix due to their small size, being therefore able to disturb the integrity of the membrane. AuNPs can induce the formation of vesicles (in the form of bubbles) in the outer membrane of *P. aeruginosa*, thus leading to rupture of the membrane and uncontrolled leakage of cytoplasmic content [57] as shown in the Fig. 12B.

AuNPs can form aggregates – known as outer membrane vesicles (OMVs) – in the negative surface layer of *E. coli* [58]. This phenomenon occurs due to the ability AuNPs have of binding to points of less negative charge density or less hydrophobic points on the bacterial membrane. Through this mechanism, AuNPs can disturb the integrity of the outer membrane of *E. coli*, leading to an increase in its permeability. Thus, the bacterium can filter its cytoplasmic content into the extracellular space. The fragility of the outer membrane can also allow AuNPs-EGCG to be transported into the bacteria, causing cell lysis [59] as shown in Fig. 12D.

Therefore, the antibacterial mechanism of AuNPs-EGCG in Gram-positive and -negative bacteria could be related to the interaction with the bacterial surface (cell wall or outer membrane). Also, AuNPs generally modify the membrane potential and reduce the activities of the ATP synthase complex. Thus, ATP production is reduced, and, consequently, so are metabolic processes in bacteria that can lead to cell death [46].

3. CONCLUSION

We biosynthesized AuNPs through a simple, non-toxic, environmentally friendly and low-cost green method, using the reducing and stabilizing properties of a molecule extracted from green tea. These AuNPs showed excellent biocompatibility in the solvents in which they were resuspended and excellent *in vitro* stability against ionic stress conditions. They were found to have low *in vitro* cytotoxicity in animal cells and high *in vitro* antibacterial activity against Gram-positive and -negative bacteria. AuNPs-EGCG were capable of inhibiting bacterial growth at low concentrations through accumulation on the surface of treated bacteria, causing morphological changes that induce cell death. We confirmed that the functionalization of EGCG in AuNPs decreases its cytotoxicity, while enhancing its antibacterial effect. These AuNPs show high potential for application as antibacterials in the biomedical field, *e.g.*, to treat skin lesions.

4. EXPERIMENTAL SECTION

- **4.1 Synthesis of AuNPs-EGCG**. Epigallocatechin 3-Galate (95% HPCL) and gold salt (HAuCl₄) were purchased from Sigma-Aldrich. AuNPs-EGCG were prepared by redox method with a 3:1 ratio of gold to EGCG. A 0.17 mg.mL⁻¹ EGCG solution at pH 7.2 was mixed with a 2.5x10⁻⁴ M gold solution for 10 minutes, at 600 rpm and 25°C [20].
- **4.2 AuNPs-EGCG resuspension**. To study the behavior of AuNPs-EGCG, these nanoparticles were centrifuged and resuspended in water, phosphate buffer (PBS), dimethyl sulfoxide (DMSO) and Mueller Hinton broth II (cation adjusted). A 1 mL aliquot of AuNPs-EGCG was centrifuged at 6,000, 8,000, 10,000, 12,000 and 14,000 rpm for 5, 10 and 20 minutes (total of 15 experiments), the supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 ml of water. We used 1 ml of nanoparticles not subjected to centrifugation as a control. The nanoparticles were homogenized and read at 200-800 nm in a UV/Vis spectrophotometer. Centrifugation conditions for the other solvents were established according to the results obtained with water. The parameters full width at half maximum (FWHM), maximum lambda (λ) and maximum absorbance (Max. Abs.) were evaluated through graphics built with the software *Origin Pro 8.5.0* trial version.
- 4.3 Flocculation degree. To analyze the stability of AuNPs-EGCG under physiological conditions, a flocculation parameter was used to determine the level of aggregation between the particles [27]. A 1 mL aliquot of AuNPs-EGCG was centrifuged at 14,000 rpm for 20 minutes, the supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 ml of different sodium chloride solutions (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 and 200 mM) and aqueous solutions at different pH values (1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13). As a

control, 1 ml of AuNPs-EGCG was centrifuged and resuspended in ultrapure water. The samples were read at 200-800 nm in a UV / Vis spectrophotometer.

- **4.4 Zeta potential.** To determine the surface charge, AuNPs-EGCG were analyzed in duplicates on the Microtac Zetatrac particle analyzer model MN401, using about 2 mL of the colloid.
- **4.5** *In vitro* cytotoxicity assay. To evaluate the cytotoxicity of AuNPs-EGCG we employed the MTT assay. This test is based on mitochondrial-dependent reduction of MTT into formazan, measuring cellular respiration as an indicator of viability [60]. The test was performed on two cutaneous cell lines: murine fibroblast cells (L929) and human non-tumorigenic keratinocytes (HaCaT).

L929 cells (ATCC[®] CRL-6364^M) were prepared at a concentration of 8x10⁴ and HaCaT cells (BCRJ code: 034) at 7x10⁴. Cell aliquots were placed in 96-well plates (150 μ L cells/well) and immediately incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 hrs. Next, 50 μ L of AuNPs samples were added to the plates, with 5 different concentrations with three biological repeats having been tested: 120, 60, 30, 15 and 7.5 μ g.mL⁻¹ for AuNPs-EGCG and 85, 42.5, 21.25, 10.63 and 5.31 μ g.mL⁻¹ for the gold solution (HAuCl4). Positive control cells and AuNPs-EGCG blanks were also prepared in order to eliminate color interference. Following 24 hours incubation, the supernatant from each well was removed and 100 μ L of MTT (1mg.mL⁻¹) was added. The plates were further incubated for 2 hours to allow MTT to enter the mitochondria. Thereafter, MTT was removed from each well and 100 μ L of DMSO was added to dissolve the formazan crystals formed. Subsequently, the absorbance was measured at 595 nm in a UV/Vis spectrophotometer. The mean optical density (OD, absorbance) was used to calculate the percentage of cell viability as follows: percentage of cell viability = (A_{treatment} – A_{blank})/ (A_{control} – A_{blank}) × 100% (where, A = absorbance). The IC50 was calculated by software Microsoft Excel 2016.

4.6 AuNPs-EGCG antibacterial activity: The antibacterial effect was evaluated on the following stra
--

Gram-positives	Gram-negatives
Staphylococcus aureus 25923 (ATCC)	Pseudomonas aeruginosa 27853 (ATCC)
Staphylococcus aureus 10A	Pseudomonas aeruginosa 93B
Enterococcus faecalis 6885	Escherichia coli ESBL

Bacterial growth curves and MIC determination: The broth microdilution method was used according to CLSI [61]. Bacteria were grown on nutrient agar for 24 hours at 37°C. Suspensions were prepared in Mueller Hinton broth II (cation adjusted), equivalent to a 0.5 McFarland scale (~ 1.5×10^8 CFU/mL), and then diluted in a 1:10 ratio of bacteria to sample [62]. Final bacterial concentration was ~ 1.5×10^7 CFU/mL. Five AuNPs-EGCG and EGCG samples diluted in Mueller Hinton broth II were tested at the concentrations of 120, 60, 30, 15 and 7.5 µg.mL⁻¹, along with a growth control (positive

control) and 2.5% glutaraldehyde (negative control) [63]. Suspensions were incubated in a bacteriological oven at 37°C.

A 200 μ L aliquot of each sample (~ 3x10⁶ CFU/mL) was read on a UV/Vis spectrophotometer at 600 nm, using a 96-well microplate. Readings were performed at time zero and after 12, 24 and 48 hours of treatment, in order to analyze bacterial growth as a function of time. Blanks for the different concentrations of each sample were read at the same conditions.

4.7 Scanning electron microscopy: This test was performed with clinical strains and with the treatment corresponding to the MIC value of AuNPs-EGCG for each strain, along with untreated controls. Images were obtained using the scanning electron microscope JSM-6610LV, JEOL, USA Inc. operated at 20kv using 10000x, 20000x and 30000x magnifications.

5 FOOTNOTES

5.1 Acknowledgments:

This work was partially supported by the Espírito Santo Research and Innovation Foundation (FAPES), the Brazilian Ministry of Science and Technology (CNPq), Coordination for the improvement of higher education personnel - Brasil (CAPES) and Ministry of Science and Technology (MCTI) /FINEP). This research was facilitated thanks to the technical staff and equipment of the Laboratory of Cellular Ultrastructure Carlos Roberto Redins (LUCCAR) and the Laboratory of Biomolecular Analysis (LABIOM) of the Federal University of Espirito Santo and the Laboratory of cell culture (NUPECFARMA) of the Vila Velha University.

5.2 Author contributions

M.C.C.G., R.P.S. and J.P.O. designed research; S.R.R.A., G.P.D.S., L.P.C.S., L.M.X and W.J.K. performed research; S.R.R.A., L.P.C.S., D.C.E. and M.C.C.G. analyzed data; S.R.R.A. and M.C.C.G. wrote the paper. All authors participate revising the article critically for important intellectual content; and authors gave final approval of the version to be submitted and any revised version.

5.3 Conflict of interest:

None declared

6 REFERENCES

- [1] K. Talkington, How to Combat Antibiotic Resistance : 5 Priories for 2020, 2020.
- [2] A. Carminati, N. Jurado-campos, C. Rubio-escudero, I.A. Nepomuceno-chamorro, Bacterial Resistance Algorithm. An Application to CVRP, Bioinspired Syst. Biomed. Appl. to Mach. Learn. 11487 (2019) 137–145. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19651-6.
- [3] R.R. Watkins, R.A. Bonomo, Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance, Infect. Dis.

Clin. North Am. 30 (2016) 313–322. https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.001.

- [4] M. Gajdács, F. Albericio, Antibiotic resistance: from the bench to patients, Antibiotics. 8 (2019) 8–11. https://doi.org/10.3390/antibiotics8030129.
- [5] Y.C. Yeh, B. Creran, V.M. Rotello, Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology, Nanoscale. 4 (2012) 1871–1880. https://doi.org/10.1039/c1nr11188d.
- [6] A. Singh, P.K. Gautam, A. Verma, V. Singh, P.M. Shivapriya, S. Shivalkar, A.K. Sahoo, S.K. Samanta, Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review, Biotechnol. Reports. 25 (2020) e00427. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00427.
- K.S. Merza, H.D. Al-Attabi, Z.M. Abbas, H.A. Yusr, Comparative Study on Methods for Preparation of Gold Nanoparticles, Green Sustain. Chem. 02 (2012) 26–28. https://doi.org/10.4236/gsc.2012.21005.
- [8] S. Balasubramanian, S.M.J. Kala, T.L. Pushparaj, P.V. Kumar, H. Katas, C.S. Lim, A.Y.H. Nor Azlan, F. Buang, M.F. Mh Busra, E.A. Ortiz-Benítez, N. Velázquez-Guadarrama, N.V. Durán Figueroa, H. Quezada, J. De Jesús Olivares-Trejo, W. Chums-ard, D. Fawcett, C.C. Fung, G.E.J. Poinern, Biogenic synthesis of gold nanoparticles from waste watermelon and their antibacterial activity against Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis, Saudi Pharm. J. 11 (2019) 1265–1276. https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20192874.
- [9] A. Crozier, Plant Secondary Metabolites, 2007. https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch2.
- [10] D. Sharma, K. V. Kosankar, Green Tea in Green World an Updated Review, Pharmatutor. 6 (2018) 09. https://doi.org/10.29161/pt.v6.i3.2018.9.
- [11] D.G. Nagle, D. Ferreira, Y.D. Zhou, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives, Phytochemistry. 67 (2006) 1849–1855. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.020.
- [12] S.M. Chacko, P.T. Thambi, R. Kuttan, I. Nishigaki, Beneficial effects of green tea: A literature review, Chin. Med. 5 (2010) 1–9. https://doi.org/10.1186/1749-8546-5-13.
- [13] L. Elbling, R.M. Weiss, O. Teufelhofer, M. Uhl, S. Knasmueller, R. Schulte-Hermann, W. Berger, M. Micksche, Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities, FASEB J. 19 (2005) 807–809. https://doi.org/10.1096/fj.04-2915fje.
- [14] C. Knidel, M.F. Pereira, D.H.F. Barcelos, D.C. de O. Gomes, M.C.C. Guimarães, R.P. Schuenck, Epigallocatechin gallate has antibacterial and antibiofilm activity in methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus of different lineages in non-cytotoxic concentrations, Nat. Prod. Res. 0 (2019) 1–5. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1698575.
- [15] J. Steinmann, J. Buer, T. Pietschmann, E. Steinmann, Anti-infective properties of epigallocatechin-3gallate (EGCG), a component of green tea, Br. J. Pharmacol. 168 (2013) 1059–1073. https://doi.org/10.1111/bph.12009.
- [16] P. Kalaiselvi, K. Rajashree, L. Bharathi Priya, V.V. Padma, Cytoprotective effect of epigallocatechin-3gallate against deoxynivalenol-induced toxicity through anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms in HT-29 cells, Food Chem. Toxicol. 56 (2013) 110–118. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.042.
- [17] B.N. Singh, S. Shankar, R.K. Srivastava, Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications, Biochem. Pharmacol. 82 (2011) 1807–1821. https://doi.org/10.1038/jid.2014.371.
- [18] O. Krupkova, S.J. Ferguson, K. Wuertz-Kozak, Stability of (-)-epigallocatechin gallate and its activity in

liquid formulations and delivery systems, J. Nutr. Biochem. 37 (2016) 1–12. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.01.002.

- [19] L. Zhang, S. Wu, D. Wang, X. Wan, J. Zhang, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in or on Nanoparticles: Enhanced Stability and Bioavailability of EGCG Encapsulated in Nanoparticles or Targeted Delivery of Gold Nanoparticles Coated with EGCG, Handb. Nanotoxicology, Nanomedicine Stem Cell Use Toxicol. (2014) 131–144. https://doi.org/10.1002/9781118856017.ch8.
- [20] G.P.D. Schuenck, Síntese e caracterização fisico-quimica de Nanoparticulas de ouro usando Epigalocatequina-3-galato (EGCG), Programa Pos-Graduação Em Biotecnol. (2018) 1–101. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004.
- [21] G.K. Chandra, D.R. Tripathy, S. Dasgupta, A. Roy, Interaction of (-)-epigallocatechin gallate with lysozyme-conjugated silver nanoparticles, Appl. Spectrosc. 66 (2012) 744–749. https://doi.org/10.1366/11.06533.
- [22] A.-S.A.-M. Al-Sherbini, Solvatochromic Behavior of Gold Nanoparticles in Different Solvents, Nano Sci. Nano Technol. an Indian J. 7 (2013) 147–155.
- [23] M.L. De Souza, P. Corio, Solvatochromism and ionochromism of the nile blue dye a through raman, infrared and uvvis spectroscopies, Quim. Nova. 42 (2019) 1091–1097. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170432.
- [24] Z. Khan, S.A. AL-Thabaiti, A.Y. Obaid, Z.A. Khan, A.O. Al-Youbi, Effects of solvents on the stability and morphology of CTAB-stabilized silver nanoparticles, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 390 (2011) 120–125. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.09.015.
- [25] J. Liu, C. Liang, X. Zhu, Y. Lin, H. Zhang, S. Wu, Understanding the Solvent Molecules Induced Spontaneous Growth of Uncapped Tellurium Nanoparticles, Sci. Rep. 6 (2016) 1–10. https://doi.org/10.1038/srep32631.
- [26] G. Rodríguez-Gattorno, D. Díaz, L. Rendón, G.O. Hernández-Segura, Metallic nanoparticles from spontaneous reduction of silver(I) in DMSO. Interaction between nitric oxide and silver nanoparticles, J. Phys. Chem. B. 106 (2002) 2482–2487. https://doi.org/10.1021/jp012670c.
- [27] P. Mulvaney, Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles, Langmuir. 12 (1996) 788– 800. https://doi.org/10.1021/la9502711.
- [28] M. Rasmusson, A. Routh, B. Vincent, Flocculation of microgel particles with sodium chloride and sodium polystyrene sulfonate as a function of temperature, Langmuir. 20 (2004) 3536–3542. https://doi.org/10.1021/la049913n.
- [29] S. Francis, K.M. Nair, N. Paul, E.P. Koshy, B. Mathew, Green synthesized metal nanoparticles as a selective inhibitor of human osteosarcoma and pathogenic microorganisms, Mater. Today Chem. 13 (2019) 128–138. https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.04.013.
- [30] M.P. Patil, Y.B. Seo, H.K. Lim, G. Do Kim, Biofabrication of gold nanoparticles using Agrimonia pilosa extract and their antioxidant and cytotoxic activity, Green Chem. Lett. Rev. 12 (2019) 208–216. https://doi.org/10.1080/17518253.2019.1623927.
- [31] A. Boldeiu, M. Simion, I. Mihalache, A. Radoi, M. Banu, P. Varasteanu, P. Nadejde, E. Vasile, A. Acasandrei, R.C. Popescu, D. Savu, M. Kusko, Comparative analysis of honey and citrate stabilized gold nanoparticles: In vitro interaction with proteins and toxicity studies, J. Photochem. Photobiol. B Biol. 197 (2019) 111519. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111519.
- [32] K.P. Steckiewicz, E. Barcinska, A. Malankowska, A. Zauszkiewicz–Pawlak, G. Nowaczyk, A. Zaleska-Medynska, I. Inkielewicz-Stepniak, Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model. Evaluation of the safety of use and anticancer potential, J. Mater. Sci. Mater. Med. 30 (2019) 1–15. https://doi.org/10.1007/s10856-019-

6221-2.

- [33] T.S. Hauck, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan, Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells, Small. 4 (2008) 153–159. https://doi.org/10.1002/smll.200700217.
- [34] R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R.R. Bhonde, M. Sastry, Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview, Langmuir. 21 (2005) 10644–10654. https://doi.org/10.1021/la0513712.
- [35] B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, Nano Lett. 6 (2006) 662–668. https://doi.org/10.1021/nl0523960.
- [36] C.L. Villiers, H. Freitas, R. Couderc, M.B. Villiers, P.N. Marche, Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: Effect on dendritic cell functions, J. Nanoparticle Res. 12 (2010) 55– 60. https://doi.org/10.1007/s11051-009-9692-0.
- [37] N. Khlebtsov, L. Dykman, Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies, Chem. Soc. Rev. 40 (2011) 1647–1671. https://doi.org/10.1039/c0cs00018c.
- [38] T.S. Dasari, Y. Zhang, H. Yu, Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Gold (I) and (III) Ions and Gold Nanoparticles, Biochem. Pharmacol. 4 (2015) 199. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- [39] T.L. Botha, T.E. James, V. Wepener, Comparative Aquatic Toxicity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold Using a Species Sensitivity Distribution Approach, J. Nanomater. 2015 (2015) 1–16. https://doi.org/10.1155/2015/986902.
- [40] S. Chaicherd, M.C. Killingsworth, D. Pissuwan, Toxicity of gold nanoparticles in a commercial dietary supplement drink on connective tissue fibroblast cells, SN Appl. Sci. 1 (2019). https://doi.org/10.1007/s42452-019-0354-2.
- [41] D. Kumar Ban, S. Paul, Functionalized gold and silver nanoparticles modulate amyloid fibrillation, defibrillation and cytotoxicity of lysozyme via altering protein surface character, Appl. Surf. Sci. 473 (2019) 373–385. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.12.157.
- [42] D. Pissuwan, S.M. Valenzuela, M.C. Killingsworth, X. Xu, M.B. Cortie, Targeted destruction of murine macrophage cells with bioconjugated gold nanorods, J. Nanoparticle Res. 9 (2007) 1109–1124. https://doi.org/10.1007/s11051-007-9212-z.
- [43] G. Raju, N. Katiyar, S. Vadukumpully, S.A. Shankarappa, Penetration of gold nanoparticles across the stratum corneum layer of thick-Skin, J. Dermatol. Sci. 89 (2018) 146–154. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.001.
- [44] C. a Cd, K.K. Dcd, T. Ichiro, T. Seiji, Antibacterial Activity of Epigallocatechin Gallate against Staphylococcus, Med. Bull. Fukuoka Univ. 26 (1999) 31–33.
- [45] C.M. Mann, J.L. Markham, A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils, J. Appl. Microbiol. 84 (1998) 538–544. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x.
- [46] 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) 1–10. https://doi.org/10.3390/nano6040071.
- [47] M.M. Mohamed, S.A. Fouad, H.A. Elshoky, G.M. Mohammed, T.A. Salaheldin, Antibacterial effect of gold nanoparticles against Corynebacterium pseudotuberculosis, Int. J. Vet. Sci. Med. 5 (2017) 23– 29. https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.003.

- [48] M.F. Zawrah, S.I. Abd El-Moez, Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens, Life Sci. J. 8 (2011) 37–44.
- [49] N. Naimi-Shamel, P. Pourali, S. Dolatabadi, Green synthesis of gold nanoparticles using Fusarium oxysporum and antibacterial activity of its tetracycline conjugant, J. Mycol. Med. 29 (2019) 7–13. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.01.005.
- [50] T. Roshmi, K.R. Soumya, M. Jyothis, E.K. Radhakrishnan, Effect of biofabricated gold nanoparticlebased antibiotic conjugates on minimum inhibitory concentration of bacterial isolates of clinical origin, Gold Bull. 48 (2015) 63–71. https://doi.org/10.1007/s13404-015-0162-4.
- [51] P. Ghosh, G. Han, M. De, C.K. Kim, V.M. Rotello, Gold nanoparticles in delivery applications, Adv. Drug Deliv. Rev. 60 (2008) 1307–1315. https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016.
- [52] E.R. Caudill, R. Tapia Hernandez, K.P. Johnson, J. O'Rourke, L. Zhu, C. Haynes, Z.V. Feng, J.A. Pedersen, Wall Teichoic Acids Govern Cationic Gold Nanoparticle Interaction with Gram-Positive Bacterial Cell Walls, Chem. Sci. (2020). https://doi.org/10.1039/c9sc05436g.
- [53] L. Mashburn-Warren, R.J.C. Mclean, M. Whiteley, Gram-negative outer membrane vesicles: Beyond the cell surface, Geobiology. 6 (2008) 214–219. https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00157.x.
- [54] M. Mahmoud, F. Alkhaleefah, D.M. Sherif, Antimicrobial effects of epigallocatechingallate and epicatechins of green tea on planktonic and biofilm forms of staphylococcus aureus, including MRSA, Nat. Sci. 11 (2013) 70–79.
- [55] A. Rai, A. Prabhune, C.C. Perry, Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings, J. Mater. Chem. 20 (2010) 6789–6798. https://doi.org/10.1039/c0jm00817f.
- [56] F. Ding, P. Songkiatisak, P.K. Cherukuri, T. Huang, X.H.N. Xu, Size-Dependent Inhibitory Effects of Antibiotic Drug Nanocarriers against Pseudomonas aeruginosa, ACS Omega. 3 (2018) 1231–1243. https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01956.
- [57] S.C. Hayden, G. Zhao, K. Saha, R.L. Phillips, X. Li, O.R. Miranda, V.M. Rotello, M.A. El-Sayed, I. Schmidt-Krey, U.H.F. Bunz, Aggregation and interaction of cationic nanoparticles on bacterial surfaces, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 6920–6923. https://doi.org/10.1021/ja301167y.
- [58] V.D. Badwaik, L.M. Vangala, D.S. Pender, C.B. Willis, Z.P. Aguilar, M.S. Gonzalez, R. Paripelly, R. Dakshinamurthy, Size-dependent antimicrobial properties of sugarencapsulated gold nanoparticles synthesized by a green method, Nanoscale Res. Lett. 7 (2012) 1–11. https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-623.
- [59] C.C. Lin, Y.C. Yeh, C.Y. Yang, C.L. Chen, G.F. Chen, C.C. Chen, Y.C. Wu, Selective binding of mannoseencapsulated gold nanoparticles to type 1 pili in Escherichia coli, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 3508– 3509. https://doi.org/10.1021/ja0200903.
- [60] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods. 65 (1983) 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [61] CLSI, M07. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Eleventh edition, CLSI Doc. M07-A11. (2018) 112.
- [62] M.J.P. Jr., E.C.. Chan, N.R. Krieg, Microbiologia: Conceitos e aplicações, 2da Edição, 1996.
- [63] S.P. GORMAN, E.M. SCOTT, A.D. RUSSELL, Antimicrobial Activity, Uses and Mechanism of Action of Glutaraldehyde, J. Appl. Bacteriol. 48 (1980) 161–190. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1980.tb01217.x.