

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM NANOCOMPÓSITO DE
NANOCRISTAIS BASEADO EM ÓXIDO DE ZINCO DOPADO COM
NANOCRISTAIS DE PRATA E ÓXIDO DE PRATA**

ELLEN QUIRINO DE SOUSA

UBERLÂNDIA
2019

ELLEN QUIRINO DE SOUSA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UM NANOCOMPÓSITO DE
NANOCRISTAIS BASEADO EM ÓXIDO DE ZINCO DOPADO COM
NANOCRISTAIS DE PRATA E ÓXIDO DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho

Co-Orientadora: Letícia de Souza Castro Filice

UBERLÂNDIA

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S725 Sousa, Ellen Quirino de, 1985-
2019 Atividade antimicrobiana de um nanocompósito de nanocristais baseado em óxido de zinco dopado com nanocristais de prata e óxido de prata [recurso eletrônico] / Ellen Quirino de Sousa. - 2019.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
Coorientadora: Letícia de Souza Castro Filice.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ciências da Saúde.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2552>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo ,1962-, (Orient.). II. Filice, Letícia de Souza Castro,1973-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 019/PPCSA				
Data:	28 de maio de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	15:50h
Matrícula do Discente:	11712CSD013				
Nome do Discente:	Ellen Quirino de Sousa				
Título do Trabalho:	Atividade antimicrobiana de nanocompósitos de nanocristais de óxido de zinco dopado com prata e óxido de prata.				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Aplicações da nanobiotecnologia em doenças infecciosas, parasitárias e crônico-degenerativas.				

Reuniu-se no anfiteatro do bloco 2H, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Renata Pereira Alves Balvedi (UFTM-ITU) via *skype*, Sabrina Royer (UFU) e Luiz Ricardo Goulart Filho IBTEC/UFU orientador da candidata presentes no recinto.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/05/2019, às 15:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sabrina Royer, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/05/2019, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Pereira Alves Balvedi, Usuário Externo**, em 28/05/2019, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1281108** e o código CRC **F9CD4ECA**.

DEDICATÓRIA

À Deus, meu fôlego de vida, sustento e coragem para questionar realidades e propor sempre um mundo novo de possibilidades. À minha família que com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu conseguisse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus pela força e coragem durante toda essa caminhada.

Aos meus Pais, a quem tenho amor incondicional, sou grata pela vida, pelo amor, dedicação, educação e formação. Sem o apoio de vocês eu nada seria.

Aos meus irmãos Weder Quirino (In Memoriam), Cláudia, Cristiane, Fabrício e Dênis Quirino, agradeço por me ensinarem a compartilhar nessa vida, cada um de vocês é especial em sua forma de ser, não tenho palavras para descrever meu amor fraterno por vocês.

Ao meu orientador Prof. Luiz Ricardo, pela orientação, apoio e incentivo que tornaram possível a conclusão desta etapa.

A minha co-orientadora Prof^a. Letícia Filice, por seus ensinamentos e confiança ao longo das supervisões das minhas atividades.

Aos Professores, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e em meu desenvolvimento e que durante todo o tempo me ensinaram e me mostraram o quanto estudar é bom.

Aos colegas da jornada e às pessoas com quem convivi ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos foi a melhor experiência da minha formação acadêmica.

Aos profissionais do Laboratório, pelo apoio técnico e profissional constante no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao mundo por mudar as coisas, por nunca serem da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar, o que descobrir e o que fazer.

Aos que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho o meu muito obrigada!

Sou grata, por cada dia, cada sonho, cada passo que é dado.

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber”.

Confúcio

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação está estruturada no formato alternativo aprovado pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, o qual define que os resultados do estudo sejam apresentados em formato de artigo científico. O Artigo intitulado “Atividade Antimicrobiana de um Nanocompósito de Nanocristais baseado em Óxido de Zinco Dopado com Nanocristais de Prata e Óxido de Prata” foi elaborado em conjunto com pesquisadores que atuam na temática do estudo. O artigo será submetido à revista Nanoscale Research Letters.

RESUMO

Introdução: Embora cáries e outras doenças da cavidade oral tenham sido tratadas com sucesso, ainda não existem materiais odontológicos multifuncionais eficazes tanto para prevenção quanto para terapêutica clínica. Nas últimas décadas, estudos mostram como os nanomateriais podem atuar nesta correlação. Nanocristais de Óxido de Zinco (ZnO) e Óxido de Prata (AgO) são materiais biocompatíveis e biocidas e seu efeito antimicrobiano em microrganismos como o nanocompósito de ZnO dopados com Ag e AgO (ZnO:Ag-AgO) ainda não foram testados. **Objetivos:** Avaliar o efeito antimicrobiano do ZnO:Ag-AgO e concentração inibitória mínima (CIM) para os microrganismos testados, investigar comportamento e citotoxicidade das diferentes dopagens do nanocompósito. **Material e Métodos:** Nanocompósitos contendo três diferentes dopagens de nanocristais (ZnO:3Ag, ZnO:5Ag, ZnO:7Ag) foram testados. O difratômetro XRD-6000 foi usado para determinar a estrutura cristalina e o tamanho médio, confirmando a formação dos nanocristais. O ensaio de inibição do crescimento bacteriano foi realizado utilizando *Escherichia coli* (ATCC®25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213) e *Streptococcus mutans* (ICQS 00504) com o tempo de tratamento de 24 e 48 horas para investigação da concentração inibitória mínima. Os três nanocompósitos foram testados com diferentes concentrações em microplacas de 96 poços para avaliar o potencial antimicrobiano utilizando o ensaio MTT. A avaliação da citotoxicidade celular foi realizada com linhagens celulares de fibroblastos, utilizando os valores de CIM encontrados como referência, através do ensaio de viabilidade celular MTT. **Resultados:** O ZnO:5Ag e o ZnO:7Ag apresentaram maior inibição do crescimento nos três microrganismos, nas menores concentrações, não houve diferença estatística significativa nos tempos de tratamento 24 e 48h. Além disso o nanocompósito não apresentou comportamento citotóxico em diferentes concentrações de CIM. **Conclusão:** Esta é a primeira demonstração de um novo nanomaterial baseado no nanocompósito ZnO:Ag-AgO, que poderia ser usado como medida preventiva e terapêutica em odontologia. O nanocompósito nas diferentes dopagens ZnO:3Ag, ZnO:5Ag e ZnO:7Ag apresentaram promissora atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade.

Palavras-chave: Nanobiotecnologia; Nanocristais, Nanocompósitos ZnO:Ag-AgO; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Introduction: Although cells and other diseases of the oral cavity have been treated successfully, they are not yet diverse materials, the multifunctional ones are as much the disease for the clinic. Nanocrystals of zinc oxide (ZnO) and silver oxide (AgO) are biocompatible and biocidal materials and their antimicrobial effect in microorganisms such as Ag and AgO-doped ZnO nanocomposites (ZnO: Ag-AgO) have not been studied **Objectives:** To evaluate the antimicrobial effect of ZnO: Ag-AgO and minimum inhibitory concentration (MIC) for the tested microorganisms, to investigate the behavior and cytotoxicity of the different doped nanocomposites. **Material and Methods:** Nanocomposites containing three different nanocrystals doped (ZnO: 3Ag, ZnO: 5Ag, ZnO: 7Ag) were tested. The XRD-6000 diffractometer was used to determine the crystalline structure and the mean size, confirming the formation of nanocrystals. The bacterial growth inhibition assay was performed using *Escherichia coli* (ATCC®25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213) and *Streptococcus mutans* (ICQS 00504) with the treatment time of 24 and 48 hours for investigation of the minimal inhibitory concentration. The three nanocomposites were tested with different concentrations in 96-well microplates to assess the antimicrobial potential using the MTT assay [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide]. The evaluation of cellular cytotoxicity was performed with fibroblast cell lines, using the MIC values found by reference, through the MTT cell viability assay. **Results:** ZnO: 5Ag and ZnO: 7Ag showed higher growth inhibition in the three microorganisms at the lower concentrations, there was no statistically significant difference in treatment times 24 and 48h. In addition, the nanocomposite showed no cytotoxic behavior at MIC concentrations. **Conclusion:** This is the first demonstration of a new nanocomposite based on the ZnO: Ag-AgO nanocomposite, which could be used as a preventive and therapeutic measure in dentistry. The nanocomposite in the different doping ZnO: 3Ag, ZnO: 5Ag and ZnO: 7Ag presented promising antimicrobial activity and low cytotoxicity.

Keywords: Nanobiotechnology; Nanocrystals, Nanocomposites ZnO: Ag-AgO; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1(a). Padrões de XRD das amostras sintetizadas.1(b)- zoom da região destacada. 1(c)- porcentagem de AgO na síntese.	37
Figura 2- Citotoxicidade dose-dependente de ZnO:3Ag(a), Zn:5Ag(b) e ZnO:7Ag(c) em bactérias <i>E. coli</i>	38
Figura 3 - Citotoxicidade dose-dependente de ZnO:3Ag(a), Zn:5Ag(b) e ZnO:7Ag(c) em bactérias <i>S. aureus</i>	39
Figura 4 - Citotoxicidade dose-dependente de ZnO:3Ag(a), Zn:5Ag(b) e ZnO:7Ag(c) em bactérias <i>S. mutans</i>	40
Figura 5 - Viabilidade Relativa Celular ZnO:3Ag, ZnO:5Ag e ZnO:7Ag	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - CIM média do nanocompósito ZnO:Ag-AgO em $\mu\text{g/ml}$ contra bactérias patogênicas. Altamente significativa ($p < 0,001$).	29
Tabela 2 - Viabilidade Celular relativa dos Nanocompósitos ZnO:Ag-AgO.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ag	Prata
AgO	Óxido de Prata
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CFC	<i>Colony forming unit</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HFF-1	Fibroblastos de tecido conjuntivo de prepúcio humano
LNMIS	Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores
NaOH	Hidróxido de sódio
NCs	Nanocristais
NPAg	Nanopartículas de Prata
NPs	Nanopartículas
NPZnO	Nanopartículas de Óxido de Zinco
OD	<i>Optical Density</i>
RPMI	Meio de cultura celular <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de Zinco
ZnO:Ag-AgO	Nanocompósito de Nanocristais baseado em Óxido de Zinco Dopado com Nanocristais de Prata e Óxido de Prata

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3 OBJETIVO.....	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
ARTIGO.....	21
Resumo	22
Introdução	23
Métodos	24
Resultados	28
Discussão	31
Conclusões.....	33
Referências	34
4 REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo em rápido crescimento, suas aplicações em ciência e tecnologia têm como finalidade a fabricação de materiais em nanoescala. As nanopartículas (NPs) possuem dimensões nanométricas (1-100 nm) e a investigação sobre suas propriedades e atributos únicos têm sido utilizados para combater doenças e infecções. Baseado em sua estrutura e forma, as nanopartículas podem se apresentar em nanotubos, nanofios, nanobastões, nanocristais e pontos quânticos. Sua superfície e heterogenicidade desempenha papel importante e quando comparado com materiais em escala macroscópica, apresentam propriedades aprimoradas, como a atividade antimicrobiana (ALLAKER, 2010; KRÓL et al., 2017).

O surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos atuais e o uso indiscriminado deste medicamento, tem sido um enorme desafio para a saúde. Destaca-se, portanto, a importância do estudo dos materiais em nanoescala com propriedades bactericidas (MORONES et al., 2005; RAI; YADAV; GADE, 2009). Diferentes testes de susceptibilidade antimicrobiana, incluindo disco-difusão (Kirby-Bauer) e microdiluição em caldo (concentração inibitória mínima, CIM) são recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (RAI; YADAV; GADE, 2009).

O efeito antimicrobiano de amplo espectro da prata (Ag), é conhecido desde a antiguidade. A redução dos materiais em nanoescala é uma estratégia confiável para melhorar sua biocompatibilidade e sua nanopartícula tem se mostrado eficaz como agente antimicrobiano. Além disso tem sido relatado que nanopartículas de Ag (NPAg) podem ser aplicadas no controle de microrganismos e prevenção de infecções (KIM et al., 2007). Dentre uma variedade de nanopartículas utilizadas em tratamentos antibacterianos a NPAg é a mais amplamente explorada devido sua promissora eficácia antimicrobiana (TANG; ZHENG, 2018).

Nanopartículas de zinco (NPZnO), são utilizadas para diversas aplicações biomédicas e indústrias. Em Odontologia, os biofilmes orais são constituídos por uma rica microbiota em diferentes superfícies, incluindo dentes, materiais dentários e mucosa. Inúmeras nanopartículas, como as de Zinco, têm sido minuciosamente estudadas para controle da formação de biofilmes dentro da cavidade oral (ALLAKER, 2010; CHENG et al., 2015). Apesar disso, sua toxicidade e interação biológica ainda não estão totalmente elucidados (SNYDER-TALKINGTON et al., 2012), sendo, no entanto, seguramente aplicáveis devido a estabilidade e notável atividade microbicida (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008). As NPZnO e NPAg são efetivos antibacterianos contra vários tipos de

bactérias.(PANDURANGAN; KIM, 2015). A associação dos dois tipos de nanopartículas poderia aumentar a efetividade microbida desses compósitos.

Baseado nas propriedades desejáveis das NPs de Ag e ZnO, o presente estudo buscou avaliar a eficácia antimicrobiana de um nanocompósito híbrido, ZnO dopado com nanocristais de Ag e óxido de prata (ZnO:Ag-AgO) em diferentes dopagens de óxido de prata (AgO) contra três tipos de bactérias encontradas na cavidade bucal.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A busca por novos agentes antimicrobianos tem sido intensificada com o aumento de múltiplos organismos resistentes. As NPs apresentam grande potencial para enfrentar este desafio, servindo como uma alternativa viável para tratar várias infecções, particularmente oriundas de bactérias multirresistentes (CHEN et al., 2015). A redução do tamanho das partículas dos materiais é um meio eficiente e ferramenta confiável para melhorar sua biocompatibilidade. Propriedades físico-química de vários nanomateriais aumentam as possibilidades de criação de novas estruturas, sistemas ou dispositivos com potenciais aplicações em uma ampla variedade de áreas. Os nanomateriais para aplicações biomédicas incluem pontos quânticos, nanotubos, nanoconchas, nanopartículas paramagnéticas, nanocristais entre muitos outros (CONGKANG, XU et al., 2002).

Uma das características mais importantes dos nanomateriais de ZnO é a baixa toxicidade e biodegradabilidade. Os nanomateriais de ZnO são nanopartículas versáteis, não só para a bioimagem, mas também para aplicações de entrega de droga, devido à sua grande área de superfície, química superficial versátil, entre outros. As nanopartículas de ZnO podem induzir espécies reativas ao oxigênio (ROS) como radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e superóxido em soluções aquosas por absorção de iluminação ultravioleta (UV) (ZHANG et al., 2013).

Os nanocristais de ZnO exibem muitas características importantes, como alta atividade catalítica, estabilidade química e física, bem como absorção UV, além disso são materiais biocompatíveis, de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) (TANKHIWALE; BAJPAI, 2012). O ZnO pode ser utilizado como aditivo alimentar devido suas propriedades e é considerado seguro pela FDA. As NPZnO apresentam atividade antimicrobiana pronunciada devido ao seu pequeno tamanho e alta relação superfície/volume, mostrando toxicidade seletiva para bactérias e efeitos mínimos sobre as células humanas (REDDY et al., 2012).

As NPAg demonstram propriedades antimicrobianas de amplo espectro, tanto contra bactérias gram-negativas, quanto bactérias gram-positivas, além disso possui forte efeito biocida em diversas espécies de bactérias, incluindo *E.coli* (CHEN et al., 2010; RAI; YADAV; GADE, 2009; WU et al., 2013). Entre os metais, as NPAg mostraram melhor atividade antimicrobiana numa dose relativamente baixa que é biologicamente segura para células eucarióticas (ALLAKER, 2010).

NPAg podem induzir a atividade antibacteriana de diferentes maneiras, essa capacidade é significativamente influenciada pelas suas propriedades físico-química, tal como superfície

química, tamanho e forma (TANG; ZHENG, 2018). Os efeitos das NPAg contra microrganismos representativos de interesse público, tem sido investigado e sabe-se que essas nanopartículas podem ser aplicadas no controle desses agentes patogênicos, promovendo a prevenção de diversas infecções (CHEN et al., 2015).

Por serem menores em tamanho, as NPAg penetram nas camadas mais profundas do biofilme e, finalmente, levam à destruição de células microbianas (PANPALIYA et al., 2019; TIAN et al., 2018). Os íons de prata são reconhecidos como agente bioativo para várias aplicações clínicas em formulações compreendendo sais de prata, óxido de prata, prata metálica, quelatos de prata e partículas de prata (YELURI; HOLLA; MUNSHI, 2012).

Embora alguns estudos tenham investigado a toxicidade de nanocompósitos e NPAg em linhagem de células para estimar a viabilidade e as ROS, pouco se sabe sobre o mecanismo de toxicidade das NPAg (ASHARANI et al., 2009).

A relativa estabilidade das NPAg as tornam menos propensas a agregação e oxidação quando expostas a meio aquoso, além disso são imobilizadas em vários inorgânicos como o ZnO (DALLAS et al., 2010). Além da prata metálica, o óxido de zinco (ZnO) tem sido amplamente relatado para inibir e inativar o crescimento microbiano em nanoescala. (ZHANG et al., 2014).

A utilização de nanoestruturas híbridas Ag/ZnO recentemente ganhou muito interesse não só por causa de sua facilidade de fabricação através de várias rotas, mas também devido à sua eficiência fotocatalítica comparativamente mais alta e atividade antibacteriana sinérgica do que em sua forma individual (LU et al., 2008). Embora um sucesso considerável tenha sido alcançado aumentando a ação bactericida de nanocompósitos Ag/ZnO, alguns aspectos importantes ainda podem ser explorados. O nanomaterial híbrido Ag/ZnO demonstrou ser extremamente estável em meio aquoso e apresentou efeito bactericida extraordinário contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AGNIHOTRI et al., 2015).

Uma variedade de métodos foi explorada para incorporação de Ag no material de suporte de ZnO através de dopagem com ultra-som, método solvotérmico, deposição de camada pulsada, ancoragem assistida por irradiação ou síntese “*in situ*” de AgNP. A técnica de dopagem é empregada para produzir defeitos visando aumentar a atividade catalítica em nanocristais de ZnO e, conseqüentemente, a capacidade de induzir estresse oxidativo em bactérias, que é um dos principais mecanismos de ação bactericida (PATI; MEHTA; MOHANTY, 2014).

O sinergismo na ação bactericida do nanocompósito ZnO:Ag-AgO consiste em uma mistura de diferentes nanocristais que podem potencializar certas propriedades devido à combinação de duas propriedades físicas interessantes e complementares (FONSECA et al.,

2019). Com a diminuição do tamanho das partículas, as NPsAg podem facilmente agregar, o que causa deterioração das suas propriedades químicas e diminui as suas propriedades antibacterianas (LU et al., 2008)

Um número limitado de estudos analisou nanocompósitos Ag/ZnO com base em sua liberação de prata/zinco em meio aquoso, reutilização, durabilidade, eficácia a longo tempo, efeitos antimicrobiano e citotóxicos em humanos ou células de mamífero. Eslami e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos antibacterianos das soluções contendo NPAg e NPZnO em *S. mutans* e *S. sanguis* e compararam os resultados com clorexidina e enxaguatórios bucais com fluoreto de sódio. Em comparação com a clorexidina, 60%, a NPAg 0,1 mg/ml, mostrou taxa de sobrevivência de bactérias de apenas 2%. NPAg mostraram boa estabilidade e viabilidade celular em ensaios anteriores (ASHARANI et al., 2009). A atividade antimicrobiana de NPAg contra bactérias depende da sua forma (WANG et al., 2017).

Soluções contendo NPZnO resultaram em menor número de colônias de *S. mutans* após 1 e 5 min de exposição em comparação com a solução incluindo NPAg, que por sua vez, sendo menores em tamanho, penetram nas camadas mais profundas do biofilme e, finalmente, leva à destruição de células microbianas (PANPALIYA et al., 2019; TIAN et al., 2018).

Uma das bactérias mais cariogênicas da cavidade oral, *S. mutans* multiplica e compete por nutrientes no biofilme dental. Os carboidratos em biofilme são metabolizados por bactérias, produzindo ácido lático que causa a dissolução de minerais, cálcio e fosfato dos dentes. (CLARK et al., 2017)

Embora Ag e ZnO demostrem atividade antibacteriana sua eficiência é diferente, ou seja, Ag mostra uma atividade antibacteriana melhor para as bactérias gram-negativas do que gram-positivas, enquanto ZnO mostra uma melhor atividade antibacteriana para as bactérias gram-positivas (LU et al., 2008).

Nesse estudo utilizamos a bactéria *Streptococcus mutans*, principal agente causador da cárie dentária, a doença infecciosa oral mais prevalente do mundo (PETERSEN, 2014). A *S. mutans* possui capacidade de aderir às superfícies dentárias, é uma bactéria gram-positiva, acidogênica e possui capacidade de sobreviver em ambientes com baixo pH. (MOREIRA DA SILVA et al., 2018)

A nanotecnologia vem sendo introduzida no campo da odontologia e NPs foram inseridas em soluções de desinfecção e compósitos odontológicos (KRÓL et al., 2017). Os mecanismos dos nanomateriais antibacterianos são principalmente relacionadas com as suas propriedades físico-químicas únicas e elevada relação superfície/volume. Na literatura encontramos diversos mecanismos, como as interações eletrostáticas entre NPZnO e paredes

celulares, liberação de íons de Zn^{2+} , relacionada com acumulação de NP ZnO em células bacterianas e formação de ROS (KASEMETS et al., 2009). NPs de óxido de metal são mais estáveis em condições extremas e exibem atividade antimicrobiana em baixas concentrações, além disso não são consideradas tóxicas para os seres humanos (ZHANG et al., 2007).

Entre os pós de óxido de metal, ZnO é um forte agente antibacteriano. As NPs ZnO apresentam diversas morfologias e exibem inibição significativa de um largo espectro de espécies bacterianas (JONES et al., 2008).

O zinco pode ser encontrado em vários tecidos do corpo e desempenha um papel importante no organismo humano. Pode ser encontrado, no músculo, ossos, na pele e em vários outros tecidos; é intracelular, localizado principalmente no núcleo, citoplasma e membrana celular (TAPIERO; TEW, 2003)

As propriedades ópticas das NPs ZnO podem ser ajustadas por dopagem com elementos adequados, os nanomateriais são boas nanoplataformas para drogas e entrega de genes (NIE et al., 2007).

NPs ZnO podem ser sintetizadas por vários métodos, incluindo evaporação térmica, precipitação, microemulsão e síntese de sol-gel ou utilizando extratos de plantas. Os métodos são importantes para controlar o crescimento do cristal, morfologia, tamanho, distribuição do tamanho, a estabilidade e a agregação das NPs. (KRÓL et al., 2017)

A atividade antimicrobiana das NPs ZnO depende do tamanho da partícula e a concentração. Partículas de ZnO menores têm uma melhor atividade antibacteriana em relação às NPs; quanto mais elevada a concentração e área de superfície de uma NPs, mais forte é a sua atividade antibacteriana (YAMAMOTO, 2001).

Entre as promissoras aplicações de Ag e ZnO, muitas envolvem o ambiente, tais como recuperação de contaminantes e à destruição de microrganismos. A diferença entre elas é que as atividades antimicrobianas das nanopartículas de Ag são significativamente influenciadas pelas dimensões das partículas: quanto menor as partículas, maior a eficiência antimicrobiana (BAKER et al., 2005; MORONES et al., 2005). A redução de tamanho implica o aumento da superfície de contato, condição importante para os efeitos da prata (ESLAMI et al., 2015). Com a finalidade de fazer uso da prata economicamente, há também uma necessidade de encontrar formas menos dispendiosas de usá-la em aplicações potenciais sem comprometer sua funcionalidade (LU et al., 2008).

A Ag é um metal nobre extremamente promissor para ser investigado em nanoescala, devido suas atividades significativas catalíticas, propriedades ópticas, e a suas notáveis aplicações (WILEY et al., 2007). O agente antibacteriano inorgânico, ZnO, pode ser excelente

suporte para NPs Ag. Nanocompósitos de metal semiconductor Ag/ZnO podem inibir o crescimento de bactérias sinergicamente devido à sua forte interação. Do ponto de vista prático e econômico, nanocompósitos Ag/ZnO são mais interessantes em relação a Ag e ZnO puro (LU et al., 2008). Ponderadas estas informações, se tornam necessárias investigações a respeito dos possíveis mecanismos tóxicos destes nanocompósitos.

Jones e colaboradores (2008) concluíram que o tamanho dos nanomateriais tem impacto significativo sobre a ação antimicrobiana. Em seu estudo, explicam a hipótese de acumulação de NPs no interior da membrana celular e no citoplasma da bactéria na tentativa de identificar o efeito antibacteriano de NPsZnO contra microrganismos gram-positivos como *S. aureus* e gram-negativos como *E. coli* (JONES et al., 2008).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antimicrobiano do nanocompósito ZnO: Ag-AgO com diferentes dopagens de AgO, ZnO:3Ag, ZnO:5Ag, ZnO:7Ag, ZnO:9Ag e investigar sua possível aplicabilidade em soluções terapêuticas e preventivas no campo da odontologia.

3.2 Objetivos Específicos

- 1-** Estimar a concentração inibitória mínima (CIM) necessária para ação antimicrobiana do nanocompósito ZnO:Ag-AgO;
- 2-** Avaliar a viabilidade celular de fibroblastos submetidos a distintas concentrações do nanocompósito ZnO:Ag-AgO nas diferentes dopagens (ZnO:3Ag, ZnO:5Ag, ZnO:7Ag)
- 3-** Eleger uma dopagem eficaz do nanocompósito.

ARTIGO**Nanocompósito de Nanocristais baseado em Óxido de Zinco Dopado com Nanocristais de Prata e Óxido de Prata**

Ellen Quirino de Sousa¹, Patrícia da Silva Lopes¹, Karinne Spirandelli Carvalho Naves², Aline Teodoro de Paula³, Noélio Oliveira Dantas⁴, Anielle Christine Almeida Silva⁴, Letícia de Souza Castro-Filice^{5*}, Luiz Ricardo Goulart^{1,3*}.

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

² Laboratório Clínico de Bacteriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

³ Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil.

⁴ Laboratório de Novos Materiais Funcionais e Nanoestruturados, Universidade Federal do Alagoas, Instituto de Física, Universidade Federal do Alagoas, Maceió, Brasil.

⁵ Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil

***Autores Correspondentes:**

Ellen Quirino de Sousa, Av. Amazonas, 1770 – Campus Umuarama, Bloco 2E, Sala 248. Fone: (34)3225-8440 Cep:38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. E-mail: ellenqsousa@gmail.com

Prof^a.Dr^a. Letícia de Souza Castro Filice, Av. Pará, 1770 – Campus Umuarama, Bloco 2U, Sala 23. Fone: (34) 3225-8604 Cep: 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. E-mail: leticiafilice@gmail.com

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Av. Amazonas, s/n – Campus Umuarama, Bloco 2E, Sala 248.

Fone: (34) 3225-8440 Cep: 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: lrgoulart@ufu.br

Resumo

Embora cáries e doenças da cavidade oral sejam tratadas com sucesso, ainda não existem materiais odontológicos eficazes com dupla função tanto para prevenção quanto para terapia. Nanocristais de Óxido de Zinco (ZnO) e Óxido de Prata (AgO) são materiais biocompatíveis. O difratômetro XRD-6000 foi usado para determinar a estrutura cristalina e o tamanho médio de nanocompósitos contendo três diferentes dopagens (ZnO:3Ag, ZnO:5Ag, ZnO:7Ag), confirmando a formação de nanocristais. A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada utilizando cepas controle *Escherichia coli* (ATCC®25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213) e *Streptococcus mutans* (ICQS 00504). Os três nanocompósitos foram testados com diferentes concentrações em microplacas de 96 poços para avaliação do potencial antimicrobiano. A avaliação da citotoxicidade celular foi realizada com fibroblastos de origem humana, utilizando os valores de CIM encontrados como referência, através do ensaio de viabilidade MTT. Esta é a primeira demonstração de um novo nanomaterial baseado no nanocompósito ZnO: Ag-AgO possivelmente multifuncional, que pode ser utilizado como medida preventiva e terapêutica em odontologia.

Palavras-Chave: Nanobiotecnologia, Nanocristais, Nanocompósito ZnO:Ag-AgO, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*.

Introdução

A nanotecnologia demonstra que em nanoescala materiais assumem novas propriedades e comportamentos diferentes daqueles que costumam ter em escala macroscópica indicando expansão de suas aplicações (1,2).

Nanopartículas são amplamente utilizadas em indústrias biotecnológicas e farmacológicas, inclusive como novos agentes antimicrobianos (3). Devido ao surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos atuais e doenças infecciosas causadas por elas, novos agentes antimicrobianos são constantemente buscados (4,5).

A aplicação de nanopartículas na odontologia é classificada de duas maneiras: preventiva e restauradora. A nanotecnologia fornece novas estratégias para a prevenção e tratamento de infecções orais, cárie dentária e, particularmente, controle de biofilme e remineralização de cárie precoce (6,7). O óxido de zinco (ZnO) nanoparticulado aparece como promissor agente antimicrobiano. Pode estar associado a prata (Ag) e óxido de prata (AgO), e demonstrou alto poder antibacteriano e eficácia em materiais odontológicos (8,9), entretanto, estudos sobre a nanopartícula de ZnO dopada com AgO e sua atividade antimicrobiana são promissores. O zinco (Zn) e seu óxido (ZnO) possuem baixa toxicidade e biodegradabilidade e, com base nessas propriedades desejáveis, os nanomateriais de ZnO ganharam enorme espaço em aplicações biomédicas (10). Também, propriedades da Ag são bem conhecidas por sua capacidade antimicrobiana de amplo espectro que inclui bactérias, fungos e vírus (1).

A classificação das bactérias pode ser feita com base na sua morfologia ou, ainda, de acordo com a composição de sua parede, sendo assim, possuem diferentes composições da parede celular, que permitem classificá-las como Gram-negativa ou Gram-positiva (4). O controle efetivo de algumas bactérias presentes nas infecções orais é fundamental na prevenção e no tratamento de doenças bucais (11). Alguns estudos relatam que nanopartículas de ZnO dopadas com Ag apresentam bom potencial antimicrobiano contra *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus e *Streptococcus mutans*. (11–13). O biomaterial com prata e zinco associado (Ag/ZnO) pode inibir sinergicamente bactérias devido à interação entre Ag e ZnO (12,13).

Com base nas propriedades desejáveis deste nanocompósito, o presente estudo buscou avaliar a eficácia antimicrobiana e a viabilidade celular do nanocompósito de ZnO e AgO dopados com Ag em diferentes concentrações de AgO, a fim de obter um bom potencial antimicrobiano e citotoxicidade.

Métodos

Síntese dos Nanocompósitos

A síntese dos nanocristais (NCs) de ZnO: Ag-AgO foi realizada no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), no Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia. Os nanocristais foram sintetizados à temperatura ambiente pelo método de coprecipitação. Soluções aquosas de cloreto de zinco (ZnCl_2 , 99,9%, 2M) e nitrato de prata (AgNO_3 , 99%, com 3, 5 e 7% de Ag em relação ao Zn). O pH durante a síntese foi ajustado para 11 com hidróxido de sódio aquoso (NaOH 98%). Para formar nanocristais de ZnO foi preparada uma solução aquosa de cloreto de zinco e nitrato de prata (pH=11). Os nanocristais foram purificados várias vezes por centrifugação a 6000 rpm / 1 min.

Caracterização dos Nanocompósitos

Os nanocompósitos de NCs ZnO:Ag-AgO foram sintetizados pelo método de coprecipitação. Os difratogramas de raios-X (XRD) foram realizados à temperatura ambiente com um difratômetro XRD-6000 (Shimadzu Corp., Tóquio, Japão), usando radiação monocromática de Cu- $K_{\alpha 1}$ ($\lambda = 1,54\text{nm}$). As XRDs foram usadas para confirmar a formação de nanocristais e para determinar a estrutura e o tamanho dos cristais.

Cepas bacterianas e condições de cultura

Para os experimentos antibacterianos, três microrganismos foram escolhidos: *S. mutans* (ICQS: 00504) presente em doenças da cavidade bucal, especialmente em lesões de cárie e cepas padrão para diferentes estruturas de parede celular, Gram-negativas, *E. coli* (ATCC®25922) e, Gram-positivos, *S. aureus* (ATCC®29213). Todos os materiais utilizados foram esterilizados e autoclavados antes dos experimentos. O meio nutriente, infusão de cérebro e coração (BHI), foi usado para cultivo das bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans* durante dois dias a 37°C. As culturas líquidas foram finalmente diluídas para obter uma turbidez comparável à escala 0,5 de McFarland, para obter uma concentração de aproximadamente $1,8 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) / ml para os testes antibacterianos seguintes. A suspensão bacteriana, ajustada à escala 0,5 de McFarland, foi utilizada para realização da avaliação da CIM.

Avaliação da atividade antimicrobiana dos nanocompósitos

Os experimentos para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do ZnO:Ag-AgO foram realizadas em microplacas de fundo plano com tampa esterilizada de 96 poços (Global Plast, China). As dopagens utilizadas neste estudo foram ZnO:3Ag, ZnO:5Ag e ZnO:7Ag. Os nanocristais foram diluídos em solução salina 0,9% e sonicados na amplitude 50 e ciclo 0,8 por 15 minutos. As concentrações finais dos nanocristais na placa após as diluições em série foram de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Diluições seriadas foram preparadas separadamente em tubos no mesmo dia do teste. Todos experimentos foram realizados em triplicatas.

A cada poço foi adicionado 100 μl dos nanocristais nas diferentes concentrações e 100 μl de caldo contendo a suspensão de 1 a 2×10^8 UFC / ml. O volume final foi, portanto, 200 μl por poço. Poços com controle foram incluídos na periferia da placa. Nas colunas de controle negativo utilizou-se soro fisiológico e nenhum tratamento foi adicionado, apenas o inóculo,

para que houvesse controle do crescimento bacteriano. Os controles positivos utilizados foram antibióticos tetraciclina e gentamicina (200µg/ml). As placas foram incubadas a 37 ° C e o experimento foi feito com uma bactéria por placa. Foi necessário o uso de redutor de oxigênio com uma jarra de anaerobiose (Permutation, Curitiba) para *S. mutans*. Experimentos diferentes e independentes foram realizados.

A densidade das células bacterianas nas placas com cultura líquida foi estimada por medições de densidade óptica (DO) a um comprimento de onda de 570 nm utilizando o leitor de placas (Thermo Scientific, Taiwan). As medições foram realizadas às 24 horas e 48 horas. O indicador colorimétrico utilizado foi o MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5difeniltetrazólio) que é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan {E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória. A CIM foi então determinada e definida como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Avaliação da Viabilidade Celular

Neste estudo foi utilizada linhagem celular de fibroblastos derivadas do tecido conjuntivo do prepúcio humano (HFF-1), mantidos em meio RPMI (Sigma Co., St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino(SFB) (FBS; Cutlab, Campinas, Brasil), solução antibiótica/antimicótica 1x(100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B e 0,1mg/ml de canamicina (Sigma Co., St. Louis, EUA). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂, 95% de umidade relativa e temperatura constante de 37 °C.

Foram semeadas 2×10^4 células/poço em uma placa de 96 poços. Após 24 h de cultivo, o meio foi removido e as células foram tratadas durante 48h com o nanocompósito ZnO:Ag-AgO nas diferentes dopagens. Para cada dopagem, diferentes concentrações foram testadas utilizando os valores de referência do resultado de CIM descrito no ensaio antimicrobiano. Sendo CIM, o dobro de CIM e metade de CIM. O ZnO:3Ag (250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25µg/ml, 15,6 µg/ml, 7,8 µg/ml e 3,9 µg/ml); ZnO:5Ag (62,5 µg/ml, 31,25µg/ml, 15,6 µg/ml, 7,8 µg/ml e 3,9 µg/ml) e ZnO:7Ag (15,6 µg/ml, 7,8 µg/ml e 3,9 µg/ml). Os nanocristais foram diluídos em água milli-Q e sonicadas em amplitude 50 e ciclo 0,8 durante 15 minutos. As diluições foram preparadas a partir de uma solução de estoque, juntamente com meio RPMI suplementado com 10% de SFB, de modo que em cada poço havia 200µl de nanocompósito mais meio. Como controle positivo foi utilizado apenas meio e célula e controle negativo Dimetilsulfóxido (DMSO) com célula. O teste de viabilidade celular foi realizado em triplicata através do ensaio de viabilidade celular MTT. A densidade das células foi estimada por medições de densidade ótica (DO) a 570nm utilizando um espectrofotômetro. A viabilidade celular relativa (%) foi calculada por $A = (\text{média absorvância}/\text{média do meio}) * 100$.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas em triplicatas e os dados expressos como valor médio e desvio padrão (DP) foram calculadas utilizando o programa GraphPad Prism® versão 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). A significância estatística das diferenças entre os valores dos grupos tratado e não tratado (controle) foi avaliada por one-way ANOVA. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados

Caracterização dos nanocompósitos ZnO: Ag-AgO

Nesse estudo as NPZnO e NPAgO foram obtidas e caracterizadas pelo Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia. As formulações revelaram partículas com diâmetro médio variando entre 28nm e 30nm. A Figura 1(a) mostra os padrões de difração XRD característicos de nanocristais de ZnO e nanocompósito. Os difratogramas das amostras de ZnO, que demonstraram aumento das concentrações nominais de Ag, foram ampliados na região destacada (30,60 a 33,40), a fim de facilitar a visualização das alterações nos padrões de XRD (Figura 1b). A Figura 1(b), mostra uma mudança para ângulos menores em relação ao pico de ZnO (100), confirmando a incorporação de prata na estrutura cristalina de ZnO. A porcentagem de NCs AgO formada foi calculado pelos padrões de XRD e obteve 43% para ZnO: 3Ag, 49% para ZnO:5Ag e 56% para ZnO: 7Ag (Figura 1c). A Figura 1(c) mostra a porcentagem de AgO formada em função da concentração nominal de Ag (% em peso) na síntese. Estes resultados confirmaram a formação do nanocompósito de ZnO dopado com Ag com nanocristais de AgO.

Avaliação da Atividade Antibacteriana dos Nanocompósitos

Os resultados referentes à atividade antibacteriana dos nanocompósitos ZnO:Ag-AgO são mostrados na Tabela 1, onde apresentamos a concentração inibitória mínima (CIM) nos tempos de 24 e 48 horas.

O nanocompósito ZnO:Ag-AgO foi capaz de inibir o crescimento em todas as dopagens testadas. Os nanocompósitos ZnO:3Ag, ZnO:5Ag e ZnO:7Ag mostram atividade citotóxica em bactérias *E. coli* (Figura 2). O nanocompósito ZnO:3Ag exibiu uma CIM de 125µg/ml, demonstrando também atividade inibitória quando tratada com concentrações mais elevadas (até 1000µg/ml). Considerando as menores concentrações, essa dopagem não demonstrou inibição significativa para *E. coli*. O ZnO:5Ag desempenhou melhores resultados na bactéria

E. Coli em comparação com ZnO:3Ag. ZnO: 5Ag a CIM foi de 15,62µg/ml, demonstrando redução da concentração inibitória mínima necessária para inibição do crescimento da bactéria. O nanocompósito ZnO:7Ag em *E.coli* demonstrou atividade inibitória em todas as concentrações testadas, desempenhando melhores resultados quando comparado as dopagens menores. Não houve diferença estatística significativa nos tempos de 24 e 48 horas para nenhuma das dopagens testadas.

A Figura 3 ilustra a atividade citotóxica em bactérias *S.aureus*. O comportamento do ZnO:3Ag em bactérias *S. Aureus* demonstrou significativa redução da concentração inibitória. As dopagens ZnO:5Ag e ZnO:7Ag também demonstraram atividade inibitória, a CIM determinada para essa bactéria foi 31,25µg/ml. Não houve diferença estatística significativa nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento para nenhuma das dopagens testadas.

Os resultados do desempenho dos nanocompósitos em bactérias *S.mutans* são demonstrados na Figura 4. Os ZnO:3Ag, ZnO:5Ag e ZnO:7Ag demonstraram atividade inibitória significativa em todas as concentrações testadas. A menor concentração testada (7,8µg/ml) demonstrou ótimo potencial inibitório, não havendo diferença estatística entre as maiores concentrações. Não houve diferença estatística significativa nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento para estas bactérias. A Tabela 1 expressa as menores concentrações inibitórias encontradas.

Dessa forma sugerimos que o nanocompósito ZnO:Ag-AgO possui promissora atividade inibitória para bactérias gram-negativas e gram-positivas. Além disso, as dopagens ZnO:5Ag e ZnO:7Ag apresentaram melhores resultados.

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima média do nanocompósito ZnO:Ag-AgO em µg/ml contra bactérias patogênicas. Altamente significante ($p < 0,001$).

ZnO:Ag-AgO	ZnO:3Ag	ZnO:5Ag	ZnO:7Ag
<i>Escherichia coli</i>	125µg/ml	15,62µg/ml	7,8µg/ml

<i>Staphylococcus aureus</i>	31,25µg/ml	31,25µg/ml	31,25µg/ml
<i>Streptococcus mutans</i>	7,8µg/ml	7,8µg/ml	7,8µg/ml

Teste de Viabilidade Celular

Os valores de CIM encontrados no ensaio antimicrobiano, foram avaliados em teste de viabilidade celular com fibroblastos, derivadas do tecido conjuntivo do prepúcio humano (HFF-1), tendo como padrão de referência CIM, o valor do dobro de CIM e a metade de CIM. O nanocompósito ZnO:3Ag demonstrou atividade citotóxica quando tratado em concentrações mais elevadas (250µg/ml e 125µg/ml) conforme a Figura 5. Considerando as linhagens celulares de fibroblastos, não foi observada inibição celular significativa, nas demais concentrações de 62,5µg/ml; 31,25µg/ml; 15,6µg/ml; 7,8µg/ml e 3,9µg/ml. O mesmo padrão ocorreu na dopagem ZnO:5Ag, que demonstrou viabilidade celular nas concentrações menores que 125µg/ml. O ZnO:7Ag demonstrou média de 92,2% de viabilidade celular em todas as concentrações testadas. A Tabela 2 expressa a porcentagem de viabilidade celular para o nanocompósito ZnO:Ag-AgO e suas respectivas dopagens.

Tabela 2 – Porcentagem de Viabilidade Celular relativa dos Nanocompósitos ZnO:Ag-AgO.

ZnO:Ag-AgO [ug/ml]	ZnO:3Ag [%]	ZnO:5Ag [%]	ZnO:7Ag [%]
3,9 µg/ml	84,3%	99,13%	90,03%
7,8 µg/ml	82,5%	98,44%	92,98%
15,6 µg/ml	80,7%	87,9%	97,49%
31,25 µg/ml	80,7%	48,7%	
62,5 µg/ml	68%	48,7%	
125 µg/ml	66,1%		
250 µg/ml	65,9%		

Discussão

A nanotecnologia tem desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento de materiais bioativos. Diferentes tipos de nanoestruturas baseadas em Ag e ZnO foram estudados e mostraram biocompatibilidade e eficiência com atividade antimicrobiana para bactérias gram-positivas e gram-negativas (14,15).

Estudos mostraram que as nanopartículas (NPs) de Ag e ZnO exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro, no entanto, as nanopartículas Ag (NPAg) não são adequadas para armazenamento a longo prazo e a alta dosagem é considerada tóxica para humanos (11,16). Agentes inovadores como a NPAg são promissores para uso em vários compostos dentários e incluem propriedades desejáveis como a atividade antibacteriana (9). Embora as NPs de ZnO não sejam tão tóxicas quanto as NPAg, sua atividade antibacteriana é comparativamente menor (16).

A maior eficiência na atividade bactericida das NPs é atribuída à diferença na estrutura da parede celular dos microrganismos. Tem sido demonstrado que a atividade antimicrobiana do ZnO é mais efetiva para bactérias gram-positivas, pois elas possuem uma estrutura de parede celular mais simples (17,18). NPAg demonstra melhor atividade antibacteriana para bactérias gram-negativas. Ag e ZnO quando associados, formam nanocompósitos Ag/ZnO e possuem maior capacidade antibacteriana tanto para microrganismos gram-negativos quanto gram-positivos (19).

Fonseca e colaboradores (2019) também usaram nanocompósitos ZnO: Ag-AgO para controlar *Salmonella spp* nos ovos de peru, Os nanocristais de Ag e Zn foram observados apenas na superfície da casca do ovo, sem internalização, levando à hipótese de que as cargas superficiais da casca do ovo e dos nanocristais favoreceram a retenção dos nanocristais de superfície. Neste estudo eles usaram ZnO:5Ag (14).

No presente estudo, a eficácia inibitória contra *S. mutans*, *E. coli* e *S. aureus* foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Estudos anteriores demonstraram uma diferença substancial na atividade bactericida do material antimicrobiano, se o tipo de cultura ou concentração bacteriana inicial for variada. O nanocompósito Ag/ZnO suprimiu o crescimento de bactérias mesmo após 24 horas de incubação (12). NPAg na concentração de 100 µg/ml apresentou melhor atividade quando comparado a outras nanopartículas no crescimento bacteriano de *S. mutans* (20). Outros achados mostram uma média de 60 a 22µg/ml para esta bactéria para NPAg (21). Os mecanismos antibacterianos de Ag/ZnO contra anaeróbios facultativos *S. mutans* ainda não foram bem explorados.

Wang e colaboradores (2017) mostraram que a eficácia inibitória de Ag/ZnO contra *S. mutans* na concentração de 256 µg/ml inibiu 91% do crescimento bacteriano após 24 h de incubação (13). Em nossos achados o CIM máximo foi 125mg/ml de ZnO:3Ag contra *E. coli*. Em outro estudo *E. coli* e *S. aureus* apresentaram concentração inibitória mínima de 600 µg/ml e 400 µg/ml, respectivamente.

Neste trabalho, nanocompósitos semicondutores metálicos Ag/ZnO foram preparados através de um método hidrotérmico. Houve formatação de nanofios facetados com ZnO. Os nanocompósitos Ag/ZnO preparados mostraram potenciais aplicações na destruição de bactérias (15). Outros achados indicaram CIMs de 120 a 60µg/ml para *E. coli* e 160 a 100µg/ml para *S. aureus*. Neste estudo, nanopartículas de ZnO dopadas com Ag foram sintetizadas por mecanismos mecânicos e investigadas quanto à atividade antimicrobiana. Verificou-se que tanto o aumento no teor de Ag quanto a diminuição no tamanho das partículas contribuíram significativamente para a eficiência antimicrobiana (16).

A citotoxicidade das nanopartículas foram avaliadas pelo método MTT, assim como foi realizado por outros pesquisadores (17–20). Hu e colaboradores (2018), verificaram a atividade citotóxica das nanopartículas de ZnO e prata sobre uma linhagem de fibroblasto e puderam

observar diminuição da citotoxicidade quando em combinação, tal resultado corrobora com o presente trabalho. Além disso, quando em conjunto ZnO/Ag constataram aumento do efeito antimicrobiano. Os benefícios da sinergia dos dois materiais também foi ser observado em outro estudo também com objetivo de controle de microrganismos (14). Outro trabalho observou a viabilidade de células T humanas primárias em concentrações tóxicas de ZnO tanto para as bactérias gram-negativas como para as bactérias gram-positivas e ainda assim também encontrou efeitos mínimos sobre a viabilidade das células (21). Por outro lado, outros estudos também demonstram que a toxicidade do nanomaterial de óxido de zinco ainda é tratada com bastante atenção na pesquisa toxicológica, pois as NPs de ZnO são citotóxicas e genotóxicas para uma variedade de tipos de células humanas em determinadas concentrações dependendo da linhagem celular (22,23).

Os resultados demonstraram claramente uma promissora atividade antimicrobiana do nanocompósito ZnO:Ag-AgO em baixas concentrações contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. Estes resultados sugerem a extrema importância do estudo das NPs Ag e ZnO dopadas, sendo necessária a investigação para ampliar as possibilidades de sua utilização em aplicações biotecnológicas.

Conclusões

O presente estudo possui importantes implicações, pois demonstra promissora atividade antimicrobiana do nanocompósito em diferentes dopagens, ZnO:3Ag, ZnO:5Ag e ZnO:7Ag contra microrganismos representativos, sugerindo sua futura aplicação como agente antimicrobiano para prevenção e terapêutica de doenças infecciosas. Estudos futuros poderiam incluir a avaliação da molhabilidade do nanomaterial híbrido ZnO:Ag-AgO. Devemos destacar que em nossos achados o nanocompósito nas concentrações mínimas testadas não identificaram

citotoxicidade. A dopagem ZnO:7Ag foi escolhida como nanocompósito promissor para estudos posteriores.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências financiadoras brasileiras, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia.

Referências

1. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res.* 2006;5(4):916–24. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>
2. Sharma V, Singh SK, Anderson D, Tobin DJ, Dhawan A. Zinc Oxide Nanoparticle Induced Genotoxicity in Primary Human Epidermal Keratinocytes. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011;11(5):3782–8. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.4250>
3. Pandurangan M, Kim DH. In vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles: a review. *J Nanoparticle Res.* 2015;17(3). <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2958-9>
4. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005;16(10):2346–53.
5. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2009;27(1):76–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
6. Rosenblatt A, Stamford TCM, Niederman R. Silver diamine fluoride: A caries “silver-fluoride bullet.” *J Dent Res.* 2009;88(2):116–25. <https://doi.org/10.1177/0022034508329406>
7. Slenters TV, Hauser-Gerspach I, Daniels AU, Fromm KM. Silver coordination compounds as light-stable, nano-structured and anti-bacterial coatings for dental implant and restorative materials. *J Mater Chem.* 2008;18(44):5359–62. <https://doi.org/10.1039/b813026d>
8. Cheng L, Zhang K, Weir MD, Melo MAS, Zhou X, Division E, et al. Composites and Adhesives To Tackle Dental Caries. *Nanomedicine.* 2015;10(4):627–41.

- <https://doi.org/10.2217/nnm.14.191>
9. Chen Y, Tse WH, Chen L, Zhang J. Ag nanoparticles-decorated ZnO nanorod array on a mechanical flexible substrate with enhanced optical and antimicrobial properties. *Nanoscale Res Lett.* 2015;10(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-014-0712-3>
 10. Król A, Pomastowski P, Rafińska K, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;249:37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.033>
 11. Wang S, Wu J, Yang H, Liu X, Huang Q, Lu Z. Antibacterial activity and mechanism of Ag/ZnO nanocomposite against anaerobic oral pathogen *Streptococcus mutans*. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2017;28(1):0–1. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5837-8>
 12. Zhang Y, Gao X, Zhi L, Liu X, Jiang W, Sun Y, et al. The synergetic antibacterial activity of Ag islands on ZnO (Ag/ZnO) heterostructure nanoparticles and its mode of action. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2014;130(1):74–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.004>
 13. Agnihotri S, Bajaj G, Mukherji S, Mukherji S. Arginine-assisted immobilization of silver nanoparticles on ZnO nanorods: An enhanced and reusable antibacterial substrate without human cell cytotoxicity. *Nanoscale.* 2015;7(16):7415–29. <https://doi.org/10.1039/C4NR06913G>
 14. Fonseca BB, Silva PLAPA, Silva ACA, Dantas NO, de Paula AT, Olivieri OCL, et al. Nanocomposite of Ag-Doped ZnO and AgO Nanocrystals as a Preventive Measure to Control Biofilm Formation in Eggshell and *Salmonella* spp. *Entry Into Eggs.* *Front Microbiol.* 2019;10(February):1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00217>
 15. Lu W, Liu G, Gao S, Xing S, Wang J. Tyrosine-assisted preparation of Ag/ZnO nanocomposites with enhanced photocatalytic performance and synergistic antibacterial activities. *Nanotechnology.* 2008;19(44).
 16. Talari MK, Abdul Majeed AB, Tripathi DK, Tripathy M. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Investigation of Mechanochemically Processed Silver Doped ZnO Nanoparticles. *Chem Pharm Bull Pharm Bull.* 2015;60(7):818–24. <https://doi.org/10.1248/cpb.c110479>
 17. Abdolmohammadi MH, Fallahian F, Fakhroueian Z, Kamalian M, Keyhanvar P, M. Harsini F, et al. Application of new ZnO nanoformulation and Ag/Fe/ZnO nanocomposites as water-based nanofluids to consider in vitro cytotoxic effects against MCF-7 breast cancer cells. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* [Internet].

- 2017;45(8):1769–77. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1290643>
18. Yuan JH, Chen Y, Zha HX, Song LJ, Li CY, Li JQ, et al. Determination, characterization and cytotoxicity on HELF cells of ZnO nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;76(1):145–50. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.028>
 19. Chang YY, Lai CH, Hsu JT, Tang CH, Liao WC, Huang HL. Antibacterial properties and human gingival fibroblast cell compatibility of TiO₂/Ag compound coatings and ZnO films on titanium-based material. *Clin Oral Investig*. 2012;16(1):95–100. <https://doi.org/10.1007/s00784-010-0504-9>
 20. Hu M, Li C, Li X, Zhou M, Sun J, Sheng F, et al. Zinc oxide/silver bimetallic nanoencapsulated in PVP/PCL nanofibres for improved antibacterial activity. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* [Internet]. 2018;46(6):1248–57. Available from: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1366339>
 21. Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Feris K, et al. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. 2012;213902(2007):10–3. <https://doi.org/10.1063/1.2742324>
 22. Guo D, Wu C, Jiang H, Li Q, Wang X, Chen B. Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2008;93(3):119–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.07.009>
 23. Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C, et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part Fibre Toxicol* [Internet]. 2011;8(1):10. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-10>

Figura 1(a) Padrões de XRD das amostras sintetizadas no interior dos NCs ZnO e Ag₂O. (b) zoom da região destacada. (c) porcentagem de AgO formada em função da concentração nominal de Ag (% em peso) na síntese.

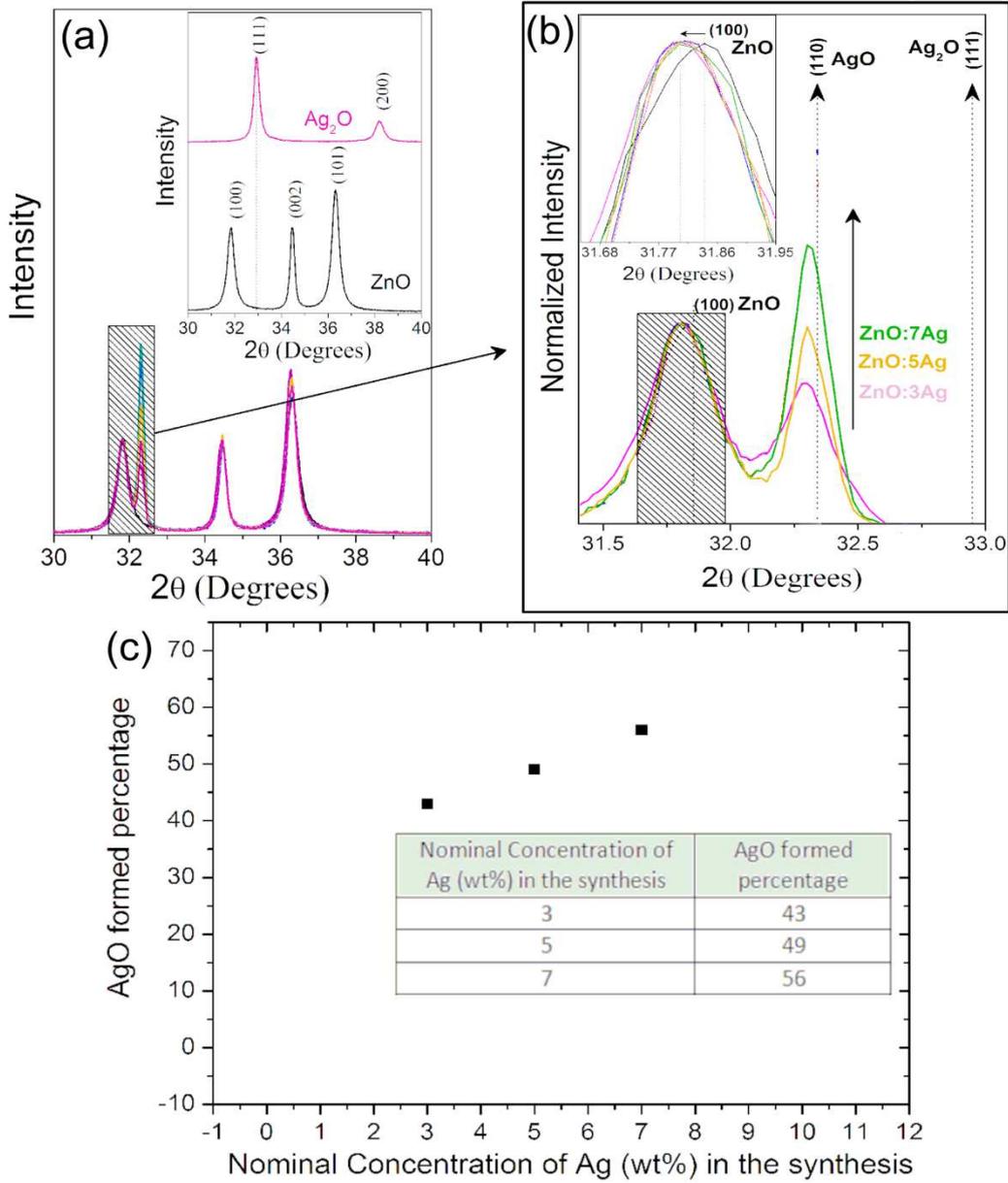
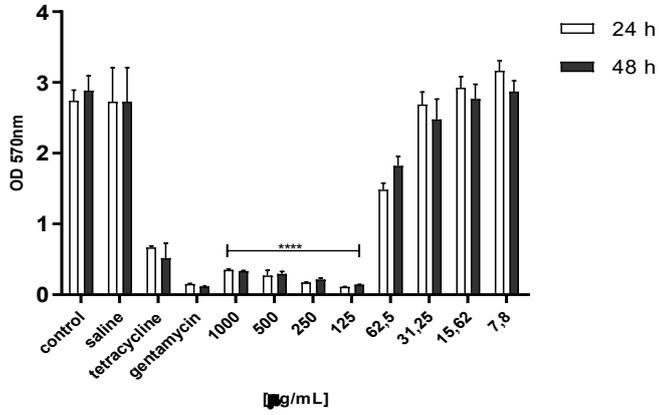
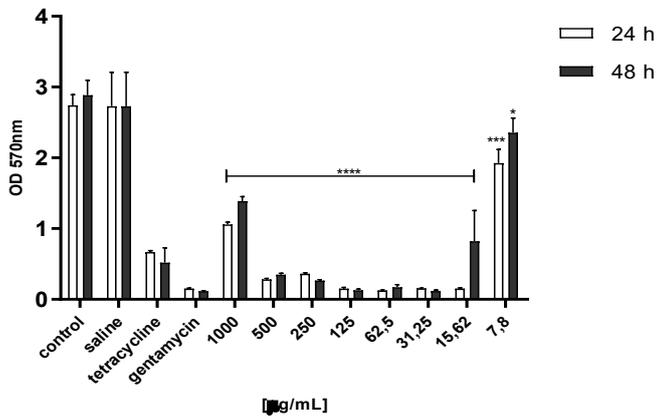


Figura 2- Citotoxicidade dose-dependente de ZnO: 3Ag após 24h e 48 h em *E. coli* (A) Zn: 5Ag após 24h e 48h *E. coli* (B) e de ZnO: 7Ag após 24h e 48 h em *E. coli* (C) Notas: **** P <0,0001 versus controle (grupo não tratado). Abreviação: c, controle (grupo não tratado).

A



B



C

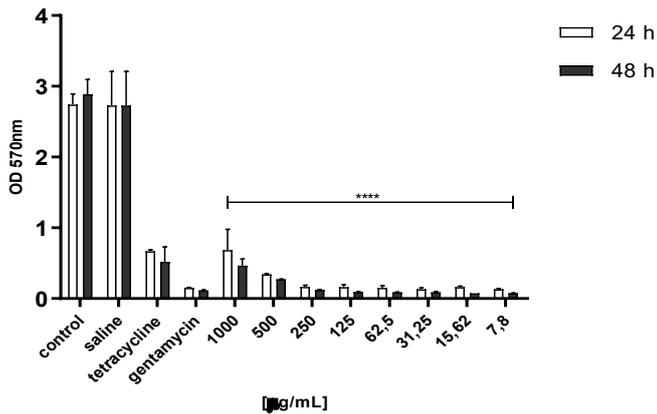
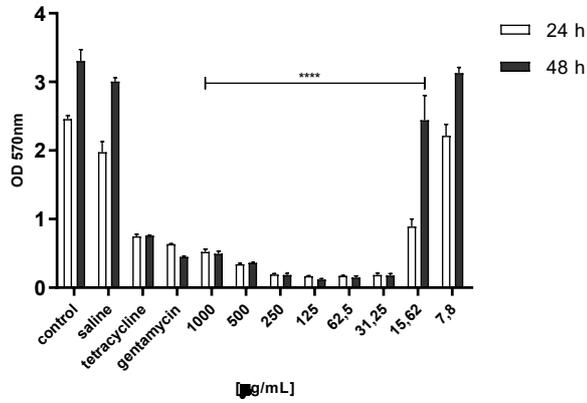
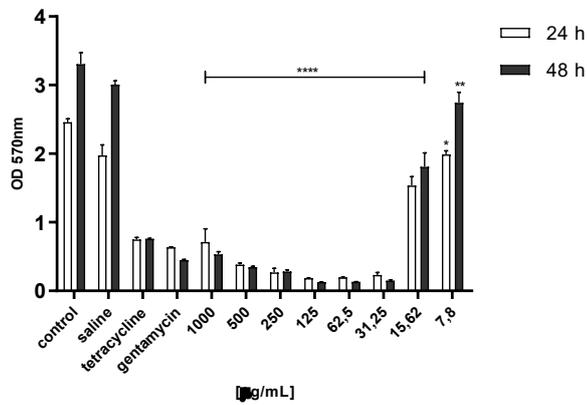


Figura 3 - Citotoxicidade dose-dependente de ZnO: 3Ag após 24h e 48 h em *S. aureus* (A) ZnO: 5Ag após 24h e 48h *S. aureus* (B) e de ZnO: 7Ag após 24h e 48 h em *S. aureus* (C) Notas: **** P < 0,0001 versus controle (grupo não tratado). Abreviação: c, controle (grupo não tratado).

A



B



C

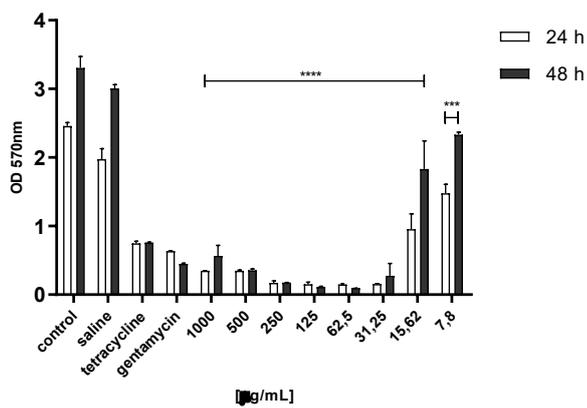


Figura 4 - Citotoxicidade dose-dependente de ZnO: 3Ag após 24h e 48 h em *S. mutans* (A) Zn: 5Ag após 24h e 48h *S. mutans* (B) e de ZnO: 7Ag após 24h e 48h em *S. mutans* (C) Notas: **** P < 0,0001 versus controle (grupo não tratado). Abreviação: c, controle (grupo não tratado).

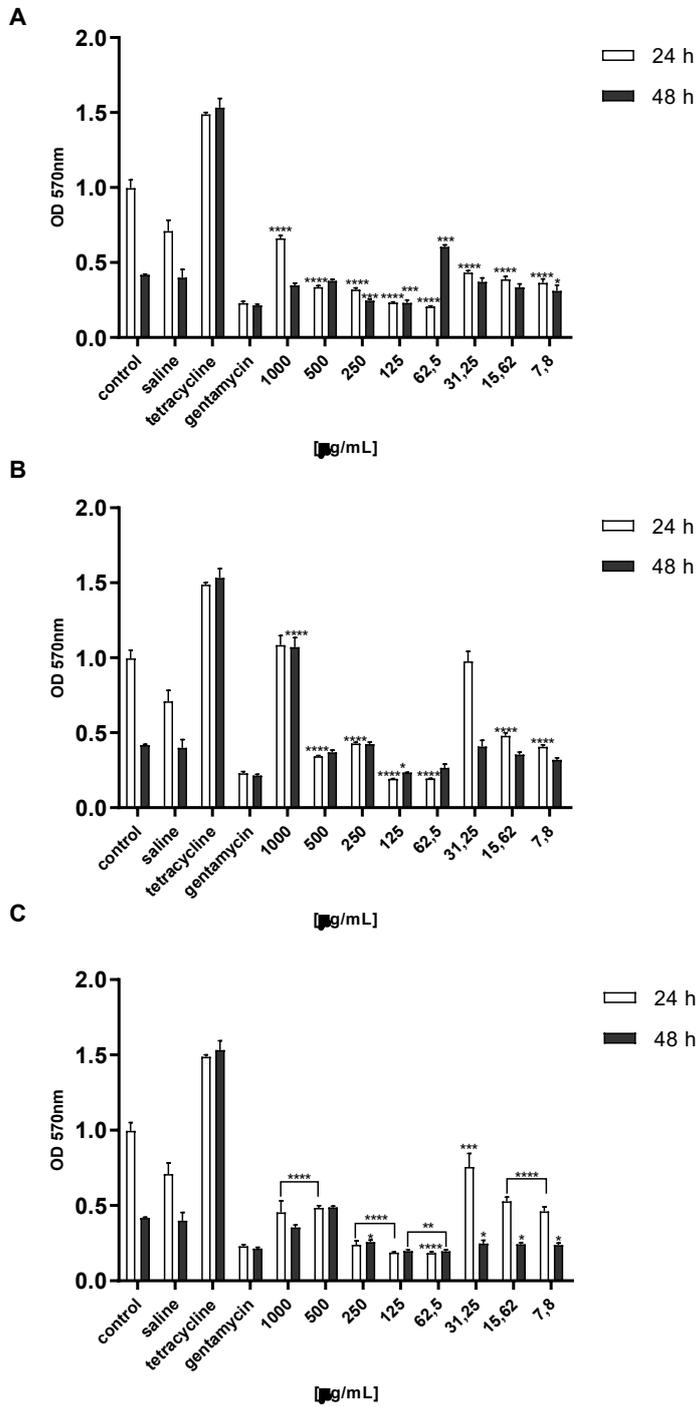
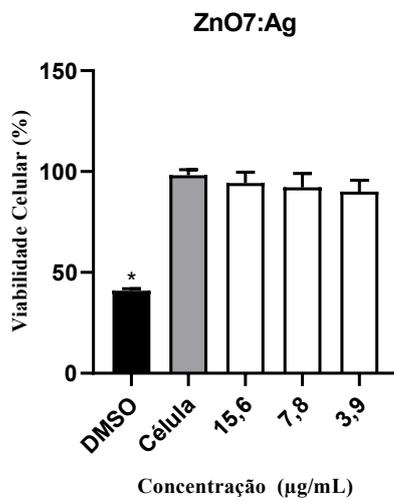
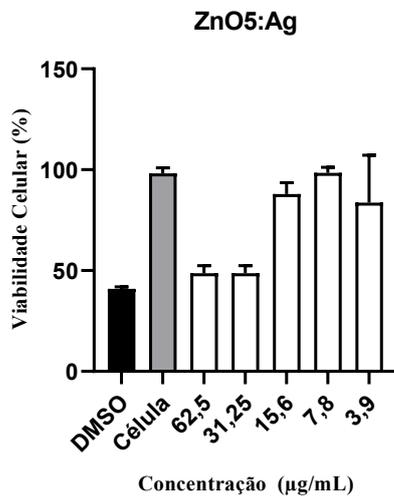
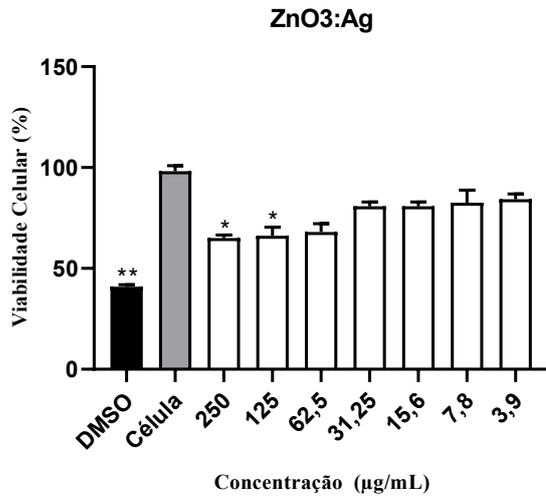


Figura 5 - Viabilidade Relativa Celular ZnO:3Ag, ZnO:5Ag e ZnO:7Ag



REFERÊNCIAS

- Abdolmohammadi, M. H., Fallahian, F., Fakhroueian, Z., Kamalian, M., Keyhanvar, P., M. Harsini, F., & Shafiekhani, A. (2017). Application of new ZnO nanoformulation and Ag/Fe/ZnO nanocomposites as water-based nanofluids to consider in vitro cytotoxic effects against MCF-7 breast cancer cells. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(8), 1769–1777. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1290643>
- Agnihotri, S., Bajaj, G., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2015). Arginine-assisted immobilization of silver nanoparticles on ZnO nanorods: An enhanced and reusable antibacterial substrate without human cell cytotoxicity. *Nanoscale*, 7(16), 7415–7429. <https://doi.org/10.1039/C4NR06913G>
- Allaker, R. P. (2010). The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1175–1186. <https://doi.org/10.1177/0022034510377794>
- Asharani, P. V, Mun, K. L. G., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver in human cells. *ACS Nano*, 3(2), 279–290. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>
- Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D., & Shah, S. I. (2005). Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5(2), 244–249. <https://doi.org/10.1166/jnn.2005.034>
- Chang, Y. Y., Lai, C. H., Hsu, J. T., Tang, C. H., Liao, W. C., & Huang, H. L. (2012). Antibacterial properties and human gingival fibroblast cell compatibility of TiO₂/Ag compound coatings and ZnO films on titanium-based material. *Clinical Oral Investigations*, 16(1), 95–100. <https://doi.org/10.1007/s00784-010-0504-9>
- Chen, M. T., Lu, M. P., Wu, Y. J., Song, J., Lee, C. Y., Lu, M. Y., ... Chen, L. J. (2010). Near UV LEDs made with in situ doped p-n homojunction ZnO nanowire arrays. *Nano Letters*, 10(11), 4387–4393. <https://doi.org/10.1021/nl101907h>
- Chen, Y., Tse, W. H., Chen, L., & Zhang, J. (2015). Ag nanoparticles-decorated ZnO nanorod array on a mechanical flexible substrate with enhanced optical and antimicrobial properties. *Nanoscale Research Letters*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-014-0712-3>
- Cheng, L., Zhang, K., Weir, M. D., Melo, M. A. S., Zhou, X., Division, E., ... County, B. (2015). Composites and Adhesives To Tackle Dental Caries. *Nanomedicine*, 10(4), 627–641. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.191>
- Clark, S. A., Vinson, L. A., Eckert, G., & Gregory, R. L. (2017). Effect of Commonly Prescribed Liquid Medications on Streptococcus mutans Biofilm. An in vitro study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 41(2), 141–146. <https://doi.org/10.17796/1053-4628-41.2.141>
- Congkang, Xu, Guoding, Xu, Yingkai, Liu, & Guanghou, Wang. (2002). A simple and novel route for the preparation of ZnO nanorods. *Solid State Communications*, 122(3–4), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0038-1098\(02\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0038-1098(02)00114-X)
- Dallas, P., Tucek, J., Jancik, D., Kolar, M., Panacek, A., & Zboril, R. (2010). Magnetically controllable silver nanocomposite with multifunctional phosphotriazine matrix and high antimicrobial activity. *Advanced Functional Materials*, 20(14), 2347–2354. <https://doi.org/10.1002/adfm.200902370>
- Eslami, N., Rajabi, O., Ghazvini, K., Barati, S., & Ahrari, F. (2015). The antimicrobial

- sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. *Dental Research Journal*, 12(1), 44. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.150330>
- Espitia, P. J. P., Soares, N. de F. F., Coimbra, J. S. dos R., de Andrade, N. J., Cruz, R. S., & Medeiros, E. A. A. (2012). Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 5, pp. 1447–1464. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0797-6>
- Fonseca, B. B., Silva, P. L. A. P. A., Silva, A. C. A., Dantas, N. O., de Paula, A. T., Olivieri, O. C. L., ... Goulart, L. R. (2019). Nanocomposite of Ag-Doped ZnO and AgO Nanocrystals as a Preventive Measure to Control Biofilm Formation in Eggshell and *Salmonella* spp. Entry Into Eggs. *Frontiers in Microbiology*, 10(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00217>
- Guo, D., Wu, C., Jiang, H., Li, Q., Wang, X., & Chen, B. (2008). Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 93(3), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.07.009>
- Hu, M., Li, C., Li, X., Zhou, M., Sun, J., Sheng, F., ... Lu, L. (2018). Zinc oxide/silver bimetallic nanoencapsulated in PVP/PCL nanofibres for improved antibacterial activity. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(6), 1248–1257. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1366339>
- Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. T., & Manna, A. C. (2008). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 279(1), 71–76. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x>
- Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H. C., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 23(6), 1116–1122. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.015>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... Cho, M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Król, A., Pomastowski, P., Rafińska, K., Railean-Plugaru, V., & Buszewski, B. (2017). Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.033>
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., ... Che, C. M. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916–924. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>
- Lu, W., Liu, G., Gao, S., Xing, S., & Wang, J. (2008). Tyrosine-assisted preparation of Ag/ZnO nanocomposites with enhanced photocatalytic performance and synergistic antibacterial activities. *Nanotechnology*, 19(44).
- Moreira da Silva, T., Pinheiro, C. D., Puccinelli Orlandi, P., Pinheiro, C. C., & Soares Pontes, G. (2018). Zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) smith: a potential prophylactic and therapeutic agent against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 301. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2360-0>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10),

2346–2353.

Nie, L., Gao, L., Yan, X., & Wang, T. (2007). Functionalized tetrapod-like ZnO nanostructures for plasmid DNA purification, polymerase chain reaction and delivery. *Nanotechnology*, *18*(1).

Padmavathy, N., & Vijayaraghavan, R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles— an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*, *9*(3), 035004. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/9/3/035004>

Pandurangan, M., & Kim, D. H. (2015). In vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles: a review. *Journal of Nanoparticle Research*, *17*(3). <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2958-9>

Panpaliya, N. P., Dahake, P. T., Kale, Y. J., Dadpe, M. V., Kendre, S. B., Siddiqi, A. G., & Maggavi, U. R. (2019). In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria. *Saudi Dental Journal*, *31*(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.10.004>

Pati, R., Mehta, R. K., & Mohanty, S. (2014). Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.02.012>

Petersen, P. E. (2014). Strengthening of oral health systems: Oral health through primary health care. *Medical Principles and Practice*, *23*(SUPPL. 1), 3–9. <https://doi.org/10.1159/000356937>

Pujalté, I., Passagne, I., Brouillaud, B., Tréguer, M., Durand, E., Ohayon-Courtès, C., & L’Azou, B. (2011). Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle and Fibre Toxicology*, *8*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-10>

Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, *27*(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>

Reddy, K. M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D. G., Hanley, C., Feris, K., ... Hanley, C. (2012). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *213902*(2007), 10–13. <https://doi.org/10.1063/1.2742324>

Rosenblatt, A., Stamford, T. C. M., & Niederman, R. (2009). Silver diamine fluoride: A caries “silver-fluoride bullet.” *Journal of Dental Research*, *88*(2), 116–125. <https://doi.org/10.1177/0022034508329406>

Sharma, V., Singh, S. K., Anderson, D., Tobin, D. J., & Dhawan, A. (2011). Zinc Oxide Nanoparticle Induced Genotoxicity in Primary Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *11*(5), 3782–3788. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.4250>

Slenters, T. V., Hauser-Gerspach, I., Daniels, A. U., & Fromm, K. M. (2008). Silver coordination compounds as light-stable, nano-structured and anti-bacterial coatings for dental implant and restorative materials. *Journal of Materials Chemistry*, *18*(44), 5359–5362. <https://doi.org/10.1039/b813026d>

Snyder-Talkington, B. N., Qian, Y., Castranova, V., & Guo, N. L. (2012). New perspectives for in vitro risk assessment of multiwalled carbon nanotubes: Application of coculture and bioinformatics. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, *15*(7), 468–492. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.736856>

Talari, M. K., Abdul Majeed, A. B., Tripathi, D. K., & Tripathy, M. (2015). Synthesis,

Characterization and Antimicrobial Investigation of Mechanochemically Processed Silver Doped ZnO Nanoparticles. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 60(7), 818–824. <https://doi.org/10.1248/cpb.c110479>

Tang, S., & Zheng, J. (2018). Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Advanced Healthcare Materials*, 7(13), 1–10. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701503>

Tankhiwale, R., & Bajpai, S. K. (2012). Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(1), 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.031>

Tapiero, H., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57(9), 399–411. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00081-7)

Tian, X., Jiang, X., Welch, C., Croley, T. R., Wong, T. Y., Chen, C., ... Yin, J. J. (2018). Bactericidal Effects of Silver Nanoparticles on Lactobacilli and the Underlying Mechanism. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(10), 8443–8450. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17274>

Wang, S., Wu, J., Yang, H., Liu, X., Huang, Q., & Lu, Z. (2017). Antibacterial activity and mechanism of Ag/ZnO nanocomposite against anaerobic oral pathogen *Streptococcus mutans*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 28(1), 0–1. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5837-8>

Wiley, B. J., Chen, Y., McLellan, J. M., Xiong, Y., Li, Z. Y., Ginger, D., & Xia, Y. (2007). Synthesis and optical properties of silver nanobars and nanorice. *Nano Letters*, 7(4), 1032–1036. <https://doi.org/10.1021/nl070214f>

Wu, Z., Xu, C., Wu, Y., Yu, H., Tao, Y., Wan, H., & Gao, F. (2013). ZnO nanorods/Ag nanoparticles heterostructures with tunable Ag contents: A facile solution-phase synthesis and applications in photocatalysis. *CrystEngComm*, 15(31), 5994–6002. <https://doi.org/10.1039/c3ce40753e>

Yamamoto, O. (2001). Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *International Journal of Inorganic Materials*, 3(7), 643–646. [https://doi.org/10.1016/S1466-6049\(01\)00197-0](https://doi.org/10.1016/S1466-6049(01)00197-0)

Yeluri, R., Holla, G., & Munshi, A. (2012). Evaluation of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration of nano-silver base inorganic anti-microbial agent (Novaron ®) against *Streptococcus mutans*. *Contemporary Clinical Dentistry*, 3(3), 288. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.103620>

Yuan, J. H., Chen, Y., Zha, H. X., Song, L. J., Li, C. Y., Li, J. Q., & Xia, X. H. (2010). Determination, characterization and cytotoxicity on HELF cells of ZnO nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.028>

Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M., & York, D. (2007). Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research*, 9(3), 479–489. <https://doi.org/10.1007/s11051-006-9150-1>

Zhang, Y., Nayak, T., Hong, H., & Cai, W. (2013). Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials. *Current Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.2174/1566524013666131111130058>

Zhang, Yi, Gao, X., Zhi, L., Liu, X., Jiang, W., Sun, Y., & Yang, J. (2014). The synergetic antibacterial activity of Ag islands on ZnO (Ag/ZnO) heterostructure nanoparticles and its mode

of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 130(1), 74–83.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.004>