



ANÁLISE COMPARATIVA DO NITRATO DE PRATA E NANOPARTÍCULA DE PRATA QUANTO A AÇÃO ANTIMICROBIANA E INCORPORAÇÃO EM FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA

LUANA AYUMI ISAWA; RENATA KATSUKO TAKAYAMA KOBAYASHI

RESUMO

As queimaduras representam um problema significativo de saúde pública no Brasil, com cerca de 1.000.000 de casos anuais e 2.500 óbitos decorrentes dessas lesões. De 2015 a 2020, o país registrou aproximadamente 19.772 mortes por queimaduras, sendo 53,3% associadas a queimaduras térmicas e 46,1% a queimaduras elétricas. Apesar dos avanços no tratamento, as infecções continuam como a principal causa de morte em vítimas de queimaduras graves, sendo responsáveis por 42-65% das mortes, com uma taxa de mortalidade mais do que o dobro entre pacientes infectados. Os agentes infecciosos mais comuns são *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas o aumento de infecções causadas por microrganismos menos frequentes, como bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e vírus, tem sido observado nas últimas décadas. Esses dados destacam a necessidade de estratégias eficazes no controle de infecções para reduzir a mortalidade em vítimas de queimaduras. O nitrato de prata pode ser utilizado no uso profilático de oftalmia neonatal, tratamento de granuloma umbilical ou mesmo ser associado à sulfadiazina, formando sulfadiazina de prata, sendo utilizado em feridas extensas de queimados. Com os avanços nas pesquisas é possível desenvolver alternativas a estes tratamentos antimicrobianos. Uma das alternativas atuais é a utilização da nanopartícula de prata biologicamente sintetizada. Com isso, esse projeto objetiva realizar uma análise comparativa de soluções de nitrato de prata e nanopartícula de prata quanto a atividade antimicrobiana e a estabilidade destes após a incorporação em formulações semissólidas. As formulações desenvolvidas tiveram suas características organolépticas e estabilidade avaliadas, além de sua atividade antimicrobiana testada. Os hidrogéis contendo bio-AgNP e AgNO₃ se mostraram promissores diante a ação antimicrobiana. Ademais, ambos os compostos apresentaram resultados semelhantes tanto para a ação antimicrobiana quanto para a citotoxicidade. Entretanto, mais estudos e testes são necessários, como estudos in vivo.

Palavras-chave: Nanotecnologia; eficácia antimicrobiana; estabilidade de formulações.

1 INTRODUÇÃO

O Ministério da Saúde (MS) aponta as queimaduras como um problema significativo de saúde pública, com aproximadamente 1 milhão de casos anuais e cerca de 2.500 mortes associadas. Entre 2015 e 2020, o Brasil registrou 19.772 óbitos por queimaduras, sendo 53,3% devidas a queimaduras térmicas, 46,1% a queimaduras elétricas e 0,6% a outros tipos, como químicas e por radiação (Rosa; De Lima, 2021; Brasil, 2022). Apesar dos avanços no tratamento, as infecções continuam sendo a principal causa de morte em vítimas de queimaduras graves, com estudos indicando que 42-65% das mortes são atribuídas a infecções. Pacientes com infecção têm mais que o dobro da taxa de mortalidade em relação aos não infectados (Lachiewicz et al., 2017).

As infecções em queimaduras são causadas principalmente por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são comumente encontrados em feridas de queimaduras. Além

desses, infecções por outras bactérias e até fungos e vírus têm se tornado mais frequentes nas últimas décadas (Church *et al*, 2006). Desde 1881, o uso do nitrato de prata como profilático em oftalmia neonatal foi documentado, mas atualmente sabe-se que a solução de nitrato de prata é tóxica e corrosiva, sendo considerado um produto químico venenoso que pode causar queimaduras. Mas a exposição em pequena quantidade não produz efeitos adversos imediatos ou mesmo nenhum efeito, além da coloração escura temporária na pele (Forbes; Forbes, 1971; Gao *et al*, 2018).

Nos últimos anos, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm ganhado destaque devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo amplamente utilizadas em instrumentos cirúrgicos, próteses, válvulas cardíacas, e até em produtos de higiene pessoal e alimentos (Fernandes, 2014). As nanopartículas de prata podem ser sintetizadas por métodos químicos, físicos ou biológicos. Os métodos biológicos, que não envolvem produtos químicos tóxicos, têm atraído crescente interesse, utilizando organismos como bactérias, fungos e plantas para a produção dessas nanopartículas (Iravani *et al*, 2014). O nitrato de prata é frequentemente usado como precursor na síntese dessas nanopartículas.

Desse modo, este estudo busca comparar as propriedades antimicrobianas do nitrato de prata e das nanopartículas de prata, além de avaliar a incorporação desses compostos em formulações terapêuticas. O objetivo é oferecer uma alternativa eficaz e segura no tratamento de feridas e queimaduras, proporcionando novas opções para a prática clínica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

CIM é a menor concentração de um agente antibacteriano expressa em mg/mL ($\mu\text{g/mL}$) que, em condições *in vitro* estritamente controladas, impede o crescimento visível da bactéria testada (Kowalska; Dudek-Wicher, 2021). Foi realizado o teste de concentração inibitória mínima, de acordo com (CLSI, 2018), com modificações, utilizando a nanopartícula de prata e o nitrato de prata para avaliar as diferentes concentrações que podem ser utilizadas para que seja efetivo no combate aos microrganismos multirresistentes

Desenvolvimento das formulações

As formulações foram desenvolvidas em parceria com a professora Audrey Alessandra Stinghen Garcia Lonni, do Laboratório de Inovação e Tecnologia Cosmecêutica (HU-CCS). Foi utilizado um agente gelificante que não interfere na biodisponibilidade dos ativos. Os compostos antimicrobianos utilizados foram as nanopartículas de prata biogênicas da empresa GRAL Bioativos (Londrina, Paraná, Brasil) e o nitrato de prata da empresa Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Foram desenvolvidas três formulações semissólidas diferentes: hidrogel sem agente antimicrobiano (base); hidrogel contendo nanopartícula de prata biologicamente sintetizada 500 μM (F_{AgNP}) e hidrogel contendo nitrato de prata 500 μM (F_{AgNO3}).

Caracterização das formulações Ensaio organolépticos

No estudo foram avaliadas as características das formulações, sendo elas aparência, cor e odor. Em relação à aparência, as amostras foram acondicionadas em vidro relógio e colocadas sobre fundo preto. Então, foi observado visualmente se as amostras mantiveram as características macroscópicas da amostra padrão ou se sofreram alterações do tipo separação de fases, precipitação e turvação. Já para a análise da cor das formulações foi utilizada a colorimetria. A partir da comparação visual da cor da amostra com a cor do padrão sob luz branca, armazenado nas mesmas condições e embalagem que a amostra. Essa análise foi realizada com 1,5 g da amostra acondicionada em vidro relógio, colocada sobre fundo preto. Por fim, as amostras foram classificadas pela cor visualizada. O odor da amostra foi comparado

com o odor do padrão (base), através do olfato. E então, foram classificadas.

Avaliação da estabilidade da formulação

As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio na Centrífuga (Centrífuga Baby I Fanem 206-BL), a 3000 rpm a 25°C por um período de 30 minutos, para detectar se houve modificações ou instabilidades como separação de fases. As amostras foram avaliadas de acordo com os parâmetros descritos no guia de estabilidade de produtos cosméticos (Anvisa, 2004).

Avaliação da atividade antibacteriana pelo método Time-kill modificado com as formulações semissólidas

O método time-kill foi realizado de acordo com o NCCLS (1999) com modificações. *Klebsiella pneumoniae* (KP ATCC 700603), *Staphylococcus aureus* (SA ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA ATCC 9027) foram cultivadas inicialmente em placas de ágar Mueller-Hinton a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foi preparado a escala 0,5 McFarland em PBS (phosphate buffered saline) 0,9% que corresponde a concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de bactéria. Em tubos tipo falcon foi adicionado 1 g de cada formulação e diluído em 9 mL de PBS que corresponde a uma diluição 1:10 da formulação. Em cada tubo foi adicionado 100 µL de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e, posteriormente, os tubos foram incubados na estufa (37 °C). Em intervalos determinados (0h, 2h, 8h e 24 horas), foi realizada a diluição seriada de 100 µL das amostras em 900 µL de PBS. Por fim, realizou-se o plaqueamento de 10 µL de cada diluição em placas de TSA (Agar Tryptic Soy) e incubadas a 37°C por 24 horas.

Avaliação da citotoxicidade das soluções de nanopartícula de prata e nitrato de prata

Para avaliar a citotoxicidade das soluções de nanopartículas de prata e nitrato de prata foi realizado uma parceria com o Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LAVIR) da Universidade Estadual de Londrina. O método utilizado foi o Teste de Redução do Tetrazólio [(3-4, 5-dimetiltiazol-2-YL) -2,5-difenil brometo de tetrazolina] (Life Technologies/Invitrogen), em cristais insolúveis de formazana, a partir da atividade mitocondrial de células metabolicamente viáveis (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018). As células utilizadas são denominadas Vero na qual foram semeadas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço) e incubadas nas condições supracitadas. As diluições seriadas, feitas na base 1:2 dos compostos, a partir da concentração de 1000 µM/mL, em DMEM-SF (Meio Modificado de Eagle de Dulbecco - Sem Soro) foram adicionadas sobre as monocamadas, em quatro replicatas, para obter volume final de 100 µL/poço. Como controle celular, foram utilizados poços contendo somente DMEM-SF com volume final de 100 µL/poço. Após 72 horas de incubação, o conteúdo dos poços foi removido e a monocamada foi lavada com 100 µL de D-PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) e 10 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados em todos os poços. As placas foram incubadas novamente por 2 horas e, posteriormente, foi adicionado 900 µL de solução solubilizante (Isopropanol acidificado com HCl 0,01 M e 0,36 % de Triton-X). Mediante agitação em agitador orbital por 15 minutos, os cristais de formazana foram solubilizados e avaliada a absorbância por espectrofotômetro (Agilent BIOTEK) no comprimento de onda de 570 nm. Também foi realizada uma leitura adicional a 690 nm para remoção de ruídos oriundos da placa. Os dados de absorbância foram transformados em porcentagem de viabilidade celular, a partir da equação abaixo, sendo *DOT* e *DOcc* a densidade óptica do grupo de tratamento e grupo controle, respectivamente. Os resultados de viabilidade celular foram utilizados para estipular a equação da reta para cada composto e para encontrar a concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular (CC50) (Jana *et al.*, 2024).

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{(DO_{T(570)} - DO_{T(890)})}{(DO_{cc(570)} - DO_{cc(890)})} \times 100$$

Equação utilizada para conversão dos dados de densidade óptica em resultados de porcentagem de viabilidade celular.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os compostos foram avaliados quanto a concentração inibitória mínima (CIM) e os resultados foram convertidos para mg/ml e colocados em tabela para melhor análise. O composto AgNO3 apresentou uma CIM menor em comparação a AgNP para as cepas *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já para o *Staphylococcus aureus* ambos compostos apresentaram CIM iguais (Tabela 1). Os resultados obtidos para as bactérias *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* corroboram com os estudos científicos no qual afirmam a ação antimicrobiana mais potente do AgNO3 em comparação a AgNP (Mosselhy *et al*, 2015; Li *et al*, 2017). Em contrapartida, as nanopartículas de prata apresentaram eficácia notável frente as bactérias testadas, assim como no estudo de Salman no qual apresentou resultados semelhantes aos presentes neste estudo (Salman, 2017).

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima dos compostos

CIM	AgNP (mg/ml)	AgNO3 (mg/ml)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,013	0,006
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0,013	0,006
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,013	0,013

Fonte: autoria própria (2024).

Legenda: AgNP: nanopartícula de prata; AgNO3: nitrato de prata. Caracterização das formulações

Ensaio organolépticos

Para avaliar o quesito da coloração, a base foi comparada com as formulações contendo os ativos. No primeiro dia (T0), as formulações contendo bio-AgNP e AgNO3 apresentaram coloração diferente da base. Após o ciclo de 15 dias (T15), os hidrogéis tiveram uma leve modificação na coloração. Assim como a base, as formulações não apresentaram odor e após o ciclo, não houve modificações (tabela 1). Em relação ao aspecto, todas as formulações se mostraram homogêneas e viscosas. E o pH se manteve na faixa pré-estabelecida de 6,0 a 7,0 (tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização organoléptica das formulações no ensaio de estabilidade preliminar

	Cor	Odor		
	T0	T15	T0	T15
Base	Branco	N	Inodoro	N
FAgNP	Caramelo	LM	Inodoro	N
FAgNO3	Cinza	LM	Inodoro	N

Fonte: autoria própria (2024).

Legenda: T0: início do ciclo; T15: fim do ciclo (após 15 dias); FAgNP: formulação contendo nanopartícula de prata; FAgNO3: formulação contendo nitrato de prata; N: normal, sem modificação; LM: levemente modificado.

Tabela 3 - Caracterização organoléptica das formulações no ensaio de estabilidade preliminar

	Aspecto	pH		
	T0	T15	T0	T15
Base	Homogêneo	N	6-7	N
FAgNP	Homogêneo	N	6-7	N
FAgNO3	Homogêneo	N	6-7	N

Fonte: autoria própria (2024).
Legenda: T0: início do ciclo; T15: fim do ciclo (após 14 dias); FAgNP: hidrogel contendo nanopartícula de prata; FAgNO3: hidrogel contendo nitrato de prata; N: normal, sem modificação; LM: levemente modificado.

Avaliação da estabilidade da formulação

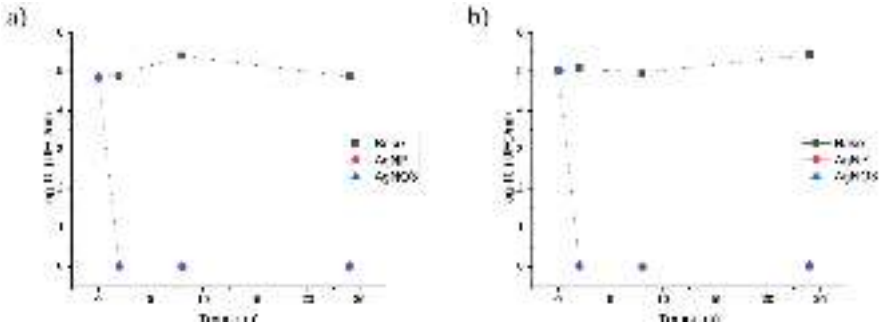
Após a centrifugação todas as formulações não apresentaram separação de fases e nem formação de água de condensação em sua superfície. Uma vez que as formulações não apresentaram sinais de instabilidade, todas foram submetidas ao teste de estabilidade preliminar. Ao final do período de análise (14º dia), as formulações se mantiveram estáveis, sem separação de fases e com aspecto homogêneo (Tabela 3).

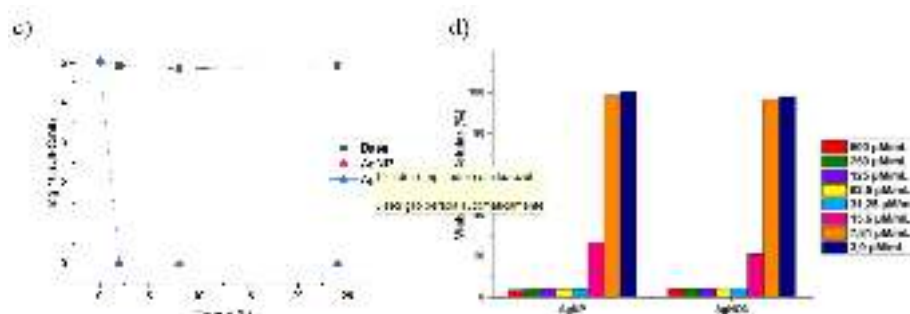
Avaliação da atividade antibacteriana pelo método Time-kill modificado com as formulações semissólidas

A partir do método time-kill modificado, os resultados obtidos foram colocados em tabela e convertidos para log10 UFC/ml. Para melhor análise dos resultados, foram desenvolvidos gráficos comparativos entre a base e as formulações semissólidas com os ativos, avaliando cada isolado clínico. A formulação base (controle negativo) não possui nenhum dos ativos antimicrobianos, assim, observa-se o constante crescimento microbiano ao longo dos intervalos de tempo. A partir dos gráficos representativos, observou-se que as formulações AgNP e AgNO3 apresentaram redução da carga microbiana a partir do tempo de 2 horas frente a todas as bactérias (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538). Ambas as formulações apresentaram ação semelhantes, não apresentando diferenças significativas em relação a ação antimicrobiana.

O efeito antimicrobiano da AgNP contra as cepas bacterianas é diferente. Além disso, as nanopartículas podem apresentar atividade antimicrobiana diferente dependendo do tamanho, forma, concentração, tempo e carga. Em geral, conforme o tamanho das partículas diminui, a ação antibacteriana aumenta significativamente (Xu *et al*, 2020).

Figura 1 - Gráficos dos resultados da avaliação da atividade antibacteriana e avaliação da citotoxicidade





Legenda: a) Curva comparativa entre base e formulações contendo ativos frente a atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; b) Curva comparativa entre base e formulações contendo ativos frente a atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; c) Curva comparativa entre base e formulações contendo ativos frente a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; d) Citotoxicidade em células Vero dos compostos bio-AgNP e AgNO₃.

Fonte: autoria própria (2024).

Avaliação da citotoxicidade das soluções de nanopartícula de prata e nitrato de prata

A citotoxicidade é definida sendo o potencial de um determinado composto de causar a morte celular, neste caso, de uma célula normal. Tal potencial é simbolizado pela concentração citotóxica de 50% (CC50), sendo a concentração do composto capaz e reduzir a viabilidade celular em 50% quando comparado aos controles não tratados (Arief *et al*, 2021). A partir dos dados obtidos, os resultados foram transcritos em um gráfico para melhor análise (figura 1-d). Observou-se que ambas as soluções apresentaram resultados semelhantes, não havendo diferença significativa. Além disso, elas na concentração de 500 µM/mL apresentam baixa viabilidade celular, ou seja, nesta concentração a substância é tóxica para as células.

A concentração citotóxica (CC50) das soluções de nanopartículas de prata e nitrato de prata foram de 9,29 µM/mL e 8,12 µM/mL, respectivamente. Esses valores se encontram entre as concentrações de 7,8 e 15,6 µM/mL. Nas formulações desenvolvidas, a concentração dos compostos utilizada foi de 500 µM em 100 mL, ou seja, 5 µM/mL. Portanto, a concentração da nanopartícula de prata e do nitrato de prata nas formulações não é citotóxica já que se encontra entre 3,9 e 7,8 µM/mL, apresentando uma viabilidade celular de 90 a 100%.

Apesar dos resultados obtidos, mais estudos são necessários para avaliar o potencial citotóxico dos compostos. Embora a maioria dos estudos se concentre nos propósitos terapêuticos das nanopartículas de prata, a toxicidade em humanos deve ser discutida. Além de mais estudos serem necessários para avaliar a biocompatibilidade e o potencial citotóxico da AgNP, podendo assim desenvolver agentes mais seguros e biocompatíveis (Xu *et al*, 2020).

4 CONCLUSÃO

Frente aos testes realizados e os resultados obtidos, os hidrogéis contendo bio-AgNP e AgNO₃ se mostraram promissores diante a ação antimicrobiana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo ser uma alternativa futura para o tratamento de infecções em feridas. Além disso, ambos os compostos, nanopartícula de prata e nitrato de prata, apresentaram resultados semelhantes tanto para a ação antimicrobiana quanto para a citotoxicidade. Entretanto, mais estudos e testes são necessários para melhorar os pontos indesejáveis, como a mudança da coloração das formulações, além de ser necessário realizar estudos in vivo. Com os estudos realizados, não foi possível demonstrar a melhor eficiência antimicrobiana e não-citotóxica da nanopartícula de prata em relação ao nitrato de prata, já que ambos obtiveram resultados muito semelhantes. Portanto, é necessário realizar estudos e testes mais minuciosos para avaliar tal comparação.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v.1, p. 52, 2004.

ARIEF, Ihsanul et al. In Silico Prediction of Betulinic Acid Derivatives' Cytotoxicity: Relationship between Topological Descriptors and CC50 Value. **Key Engineering Materials**, v. 884, p. 282-289, 2021.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico**, vol. 53, n. 47, p. 1-51, dez. 2022.

CHURCH, Deirdre et al. Burn wound infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 403-434, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th ed.; CLSI Supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.

FERNANDES, P. E. Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata. Orientador: Nélcio José de Andrade, 2014.

FORBES, Gilbert B.; FORBES, Grace M. Silver nitrate and the eyes of the newborn: Crede's contribution to preventive medicine. *American journal of diseases of children*, v. 121, n. 1, p. 1-4, 1971.

GAO, Sherry Shiqian et al. Revitalising silver nitrate for caries management. *International journal of environmental research and public health*, v. 15, n. 1, p. 80, 2018.

IRAVANI, Siavach et al. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in pharmaceutical sciences*, v. 9, n. 6, p. 385, 2014.

JANA, Subrata et al. Anti-respiratory syncytial virus and anti-herpes simplex virus activity of chemically engineered sulfated fucans from *Cystoseira indica*. *Carbohydrate Polymers*, v. 337, p. 122157, 2024.

KOWALSKA-KROCHMAL, Beata; DUDEK-WICHER, Ruth. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, v. 10, n. 2, p. 165, 2021.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold spring harbor protocols*, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095505, 2018.

LACHIEWICZ, Anne M. et al. Bacterial infections after burn injuries: impact of multidrug resistance. *Clinical Infectious Diseases*, v. 65, n. 12, p. 2130-2136, 2017.

LI, Wen-Ru et al. A comparative analysis of antibacterial activity, dynamics, and effects of silver ions and silver nanoparticles against four bacterial strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 123, p. 304-310, 2017.

MOSSELHY, Dina A. et al. Comparative synthesis and antimicrobial action of silver

nanoparticles and silver nitrate. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, p. 1-10, 2015.

NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. 1999.

ROSA, Zenória; DE LIMA, Tadeu Henrique. Perfil epidemiológico de pacientes vítimas de queimadura Epidemiological profile of patients victims of burns. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 5, p. 19832-19853, 2021. SALMAN, Halah Dawood. Evaluation and comparison the antibacterial activity of silver nano particles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on some pathogenic bacteria. **J. Glob. Pharma Technol**, v. 9, p. 238-248, 2017.

XU, Li et al. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. **Theranostics**, v. 10, n. 20, p. 8996, 2020.