

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 31/03/2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Bianca Gottardo de Almeida

**Nanomateriais híbridos contendo prata e óxido de grafeno reduzido
para atividade antifúngica**

São José do Rio Preto
2022

Bianca Gottardo de Almeida

**Nanomateriais híbridos contendo prata e óxido de grafeno reduzido
para atividade antifúngica**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^a. Dr^a. Diogo Paschoalini Volanti

São José do Rio Preto
2022

G685n Gottardo, Bianca
Nanomateriais híbridos contendo prata e óxido de grafeno reduzido para atividade antifúngica / Bianca Gottardo. -- São José do Rio Preto, 2022
57 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Diogo Paschoalini Volanti

1. Dermatomicoses. 2. Óxido de grafeno reduzido.
3. Nanopartículas de prata. 4. Antifúngico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Bianca Gottardo de Almeida

**Nanomateriais híbridos contendo prata e óxido de grafeno reduzido
para atividade antifúngica**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Diogo Paschoalini Volanti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Scroferneker
UFRGS - Porto Alegre

Prof. Dr. João Roberto Antônio
FAMERP - São José do Rio Preto

Prof. Dr João Paulo Zen Siqueira
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a Elza Maria Castilho
FAMERP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
31 de março de 2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos por me incentivarem sempre e não me deixarem desistir quando quis, pois sabiam que eu estava dentro do meu maior sonho; e estarem sempre presentes como meu escudo emocional e espiritual.

Aos meus avós maternos e paternos por me darem os melhores e sábios conselhos sobre vida os quais sempre vou lembrar, mesmo não estando presentes fisicamente: Vó Nilde e Vó Chicão; Vó Alzira e Vó Odair.

Ao meu noivo Breno Sampaio por mostrar sempre com clareza os melhores passos e decisões a seguir.

Aos tios e primos da família Gottardo e Almeida por sempre me colocarem pra cima e apoiarem as minhas escolhas.

Às minhas amigas Awdrey Canhoto, Isabela Calijuri, Maria Eduarda Mendonça, Maria Laura Lourenço, Nina Morita, Victoria Tavares, pelas risadas, abraços e palavras que me fortaleceram sempre.

Ao meu orientador por me apoiar, ensinar e pela parceria durante os anos de mestrado e doutorado.

Aos amigos e parceiros de trabalho do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto: Thiago Lemes, Taíza Maschio, Mariela Ribeiro, Letícia Mozaner, Natália Seron Brizzoti, Maicon Henrique Caetano, Emilia Gianizella, Luceli Souza e Professora Zêmia; e amigos e parceiros do Laboratório de Materiais e Sustentabilidade-LABMATSUS da UNESP: Tarcísio Perfecto, Andreza Zoccal e Vinícius Lopes.

Aos membros titulares e suplentes por terem aceito o convite de participação e contribuírem com seus ricos conhecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço durante esses 3 anos.

RESUMO

As infecções superficiais de cabelo, pele ou unhas, frequentemente causadas por fungos, são reportadas por pacientes em clínicas dermatológicas. Além do impacto estético, dor, prurido, deformidade ungueal e tecidual, podem ser fonte de entrada para outros patógenos primários ou oportunistas alcançando tecidos mais profundos. O alto custo do tratamento, a toxicidade e surgimento de patógenos resistentes justificam a busca por novas drogas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de nanocompósitos (NCs) de óxido de grafeno reduzido e prata (rGO/Ag) contra isolados clínicos de microrganismos pertencentes ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José de São José do Rio Preto. As NCs foram caracterizadas por análise de difração de raios X, e a morfologia e caracterização do nanocompósito, foram investigadas por microscopia eletrônica de transmissão. O ensaio de suscetibilidade antifúngica foi realizado pelo método de microdiluição seguindo o protocolo CLSI, com modificações. O perfil toxicológico foi testado em modelo *in vivo*. As nanopartículas híbridas apresentaram grande potencial inibitório frente às cepas clínicas, sem toxicidade. Este estudo fornece nova estratégia terapêutica alternativa para o controle de dermatomicoses.

Palavras-chave: Dermatomicoses. Óxido de grafeno reduzido. Nanopartículas de prata. Antifúngico.

ABSTRACT

Superficial infections of hair, skin or nails, mainly caused by fungi, are often reported by patients in dermatology clinics. In addition to the esthetic impact, itching, pain, nail and tissue deformity, can be a source of entry for other opportunistic or primary pathogens, covering more itchy tissues. The high cost of treatment, toxicity and emergence of resistant pathogens justify the search for new drugs. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of reduced graphene oxide (rGO/Ag) and silver nanocomposites (NCs) against microorganisms clinically isolated belonging to the Microbiology Laboratory of the Faculty of Medicine of São José do Rio Preto - FAMERP. The NCs were characterized by X-ray diffraction analysis, and the morphology and characterization of the nanocomposite were investigated by transmission electron microscopy. The antifungal susceptibility assay was performed by the microdilution method based on the CLSI protocol, with modifications. The toxicological profile was tested *in vivo* model. The hybrid nanoparticles showed great inhibitory effect against all clinical tested strains, without toxicity. In summary this study provides a new alternative therapeutic strategy for the control of dermatomycoses.

Keywords: Dermatomycoses. Reduced graphene oxide. Silver nanoparticles. Antifungal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 – XRD patterns of the rGO, Ag, and rGO/Ag NCs prepared with different Ag content.	24
Figure 2 – STEM images (a and b) with different magnifications of rGO/Ag12% sample. The image c) depicts the HRTEM, and the d) the SAED from the rGO/Ag12% sample.	25
Figure 3 – Antifungal susceptibility test of rGO, Ag-NPs, rGO/Ag NCs, and controls against EF1 and CA1 (top and button, respectively), showing the best antifungal activity.	27
Figure 4 – Demonstrative image of NCs activity against <i>Candida</i> spp.	29
Figure 5 – Image of <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , and <i>Microsporum canis</i> colonies showing the inhibition and diameters reduction on Petri dishes.	31
Figure 6 – Images from optical microscopy (magnitude of 400x) showing the anti-hyphal activity after 3 h of contact of rGO/Ag12%NCs	32
Figure 7 – Illustrative scheme of NCs synthesis.	36
Figure S1– Illustrative scheme of antifungal susceptibility test.	53
Figure S2– Image of plates in microdilution test with RPMI supplemented with sorbitol.	54
Figura S3- Illustrative scheme of steps to execute the time kill assay.	55
Figura S4 - Image of the plates on time kill test presenting the inhibition activity in comparison with control culture.	56
Figure S5 - Graphic representation of toxicity test of rGO, rGO/Ag NCs and controls (PBS compound) in <i>Galleria mellonella</i> larvae inoculated and bathed ($p < 0.05$).	57

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Antimicrobial susceptibility analysis of all NCs shown in this work 26
against dermatophytes agents and *Candida* spp, and antimicrobial
performance of rGO/Ag in previous studies.

Table 2 – Antifungal susceptibility analysis of the rGO, AgNPs, rGO/Ag NCs, 28
and fluconazole against clinical samples of dermatophytes and *Candida* spp.

Table 3 – Comparative analysis of MIC values of non-supplemented and 30
supplemented medium with sorbitol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Silver
CA1	<i>Candida albicans</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
COD	Crystallography open database
CLSI	Clinical laboratory standard institute
CP1	<i>Candida parapsilosis</i>
Cu	Copper
DMSO	Dimethyl sulfoxide
XRD	X-ray diffraction
EF1	<i>Epidermophyton floccosum 1</i>
EF2	<i>Epidermophyton floccosum 2</i>
GO	Graphene oxide
HRTEM	High resolution transmission electron microscopy
MC1	<i>Microsporum canis 1</i>
MC2	<i>Microsporum canis 2</i>
MIC	Minimum inhibitory concentration
NCs	Nanocomposites
NPs	Nanoparticles
PBS	Phosphate buffered saline
QAC	Quaternary ammonium compound
rGO	Reduced graphene oxide
RPM	Rotations per minute
RPMI	Roswell park memorial institute
SAED	Selected area electron diffraction

SB	Sabouraud broth
SDS	Sodium borohydride
STEM	Screening transmission electron microscopy
TM1	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 1
TM2	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 2
TR1	<i>Trichophyton rubrum</i> 1
TR2	<i>Trichophyton rubrum</i> 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivos específicos	20
3	ARTIGO	21
3.1	Abstract	21
3.2	Introduction	22
3.3	Results and discussion	23
3.4	Conclusions	35
3.5	Experimental section	36
3.5.1	Materials	36
3.5.2	Syntesis of NCs	36
3.5.3	Characterization	37
3.5.4	Antifungal susceptibility analysis	37
3.5.5	Time kill assay	38
3.5.6	Hyphal inhibition test	38
3.5.7	In vivo toxicity test	39
3.6.	Acknowledgments	39
3.7	References	40
4	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE A: Supporting information	52

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dermatomicose é a doença fúngica de maior ocorrência entre seres humanos e animais. Estudos epidemiológicos sobre infecções fúngicas comprovam o impacto para a saúde pública mundial, dada a cura dificultada e alta disseminação dos agentes etiológicos (MOCHIZUKI *et al.*, 2020). Vários motivos são aventados para explicar o aumento da incidência de micoses em humanos: doenças crônicas, como diabetes mellitus, doença arterial periférica, imunossupressão de diversas origens (HIV ou às drogas imunossupressoras) além do uso abusivo de antibióticos (SCRAVONI; GRZONA, 2021). Os padrões elevados de temperatura e umidade, típicos das regiões tropicais, favorecem a reprodução e disseminação dos fúngicos, e nestes ambientes, a distribuição de diferentes espécies está condicionada à adaptação dos agentes ao meio ambiente, deslocamentos humanos, convívio com animais domésticos e aspectos socioeconômicos (GINTER-HANSELMAYER; NENOFF, 2019).

Diversas áreas do corpo podem expressar aspectos clínicos variados de infecções fúngicas, sendo habitualmente denominados como tinea unguium, corporis, capitis, manum, pedis e cruris. Estas lesões ocorrem conforme a área de contato primário do fungo com o hospedeiro, após trauma ou contato direto com o agente. Valorizando-se a carga fúngica, a espécie e as condições clínicas do homem, os sintomas podem ser típicos e como queixas comuns, a coceira, ardência e até dor (GRANINGER; DIAB-ELSCHAHAWI; PRESTERL, 2019). Ainda, como principais sinais são considerados: as descamações, infiltrações com abscessos, pústulas, crostas, cabelos quebradiços ou de queda fácil, e para as unhas, acometimentos, distal lateral para proximal, hiperqueratose subungueal e/ou hipertrofia (GNAT; ŁAGOWSKI; NOWAKIEWICZ, 2020).

Os dermatófitos, representam o grupo de fungos hialinos patogênicos de maior ocorrência nas doenças fúngicas superficiais, sendo que as espécies de *Epidermophyton* spp, *Microsporum* spp, *Trichophyton* spp, são as mais comuns. No entanto, mais recentemente, a partir de estudos com biologia molecular, houve a inclusão de novos gêneros, como *Arthroderma*, *Nannizzia*, *Lophophyton*, e *Paraphyton* (BEGUM *et al.*, 2020; MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2021), que certamente estarão enriquecendo a etiologia de infecções fúngicas superficiais conforme recursos diagnósticos aprimorados.

Outros agentes não dermatófitos, como espécies de *Candida*, *Scytalidium* e *Fusarium*, não menos importantes, têm sido considerados patógenos em diversos nichos anatômicos (RODRIGUES *et al.*, 2022). Ocorrências dermatológicas bastante comuns incluem às produzidas por espécies de *Candida*, com destaque à *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* complex e *Candida krusei*, em associação a altas taxas de morbidade e mortalidade (PAPPAS *et al.*, 2018; WHALEY *et al.*, 2017).

Várias espécies de fungos, prevalentes nas micoses superficiais, apresentam fatores de virulência, enzimas e toxinas, cuja ação sobre tecido queratinizado leva a alterações estruturais importantes na pele e anexos (CHINNAPUN, 2015). Neste sentido, e como exemplo, os fungos produzem fosfolipases, proteases e outras toxinas, alterando substratos específicos, presentes nos tecidos queratinizados e, por consequência, invadem áreas adjacentes mais profundas do corpo (GUPTA; VENKATARAMAN, 2021). No entanto, mesmo que algumas espécies não possuam fatores de virulência, elas podem causar infecções fúngicas, como agentes oportunistas (SANTOS *et al.*, 2018).

Considerando as características fisiológicas e metabólicas dos fungos, tem-se a reprodução como um processo lento, e, por consequência, a identificação laboratorial por cultura também é lenta. Procurando atender aos recursos clínicos para cura de infecções por fungos, o médico opta por oferecer tratamento empírico, o que leva ao insucesso terapêutico (LIPNER; SCHER, 2019). Com os avanços tecnológicos, hoje é possível melhorar os protocolos da prática clínica, conhecendo o agente e sua resposta fenotípica aos antifúngicos, tanto espécies de leveduras quanto fungos filamentosos. De fato, relatos científicos prévios comprovam a tendência à resistência, observando-se os valores maiores de concentração inibitória mínima (CIM) (RIDZUAN *et al.*, 2019).

Tendo em vista a permanência de fungos no estrato córneo e granuloso, áreas constituintes do tecido epitelial, a maioria das opções terapêuticas considera o fármaco de aplicação tópica, ou seja, há recomendação de pomadas ou cremes contendo antifúngico (MOCHIZUKI *et al.*, 2020). No entanto, nos casos de lesões superficiais extensas ou, em micose na unha ou no couro cabeludo mais complexas, há necessidade de adoção de antifúngicos orais, em comprimido. Embora haja uma variedade de classe de fármacos para tratamento de doenças fúngicas superficiais, a terbinafina, e os derivados azólicos, fluconazol e itraconazol, são os poucos compostos de maior escolha médica (GUPTA; VENKATARAMAN, 2021).

Os efeitos colaterais dos antifúngicos são observados especialmente quando aplicados por tempo prolongado, acarretando graves prejuízos aos tecidos hepático e renal (KABLY *et al.*, 2022). Além dos efeitos adversos das drogas, a não adesão ao tratamento pelo paciente dificulta a melhora, assim torna as recidivas recorrentes, ligadas a má utilização ou descontinuidade terapêutica. Este evento de grande impacto para saúde, contribui para seleção de microrganismo mais resistente, tornando o tratamento ou inefetivo (MUHAJ *et al.*, 2022).

Em áreas da medicina, a incorporação de novos conhecimentos à prática clínica se dá de maneira dinâmica. Para que tais avanços aconteçam, a existência de centros de pesquisas básica e aplicada é uma condição necessária, e, estudos com novos medicamentos, são de fundamental importância. Assim sendo, materiais nanoestruturados vêm sendo aplicados em diversas áreas, tais como: saúde, agricultura, cosmética, meio ambiente, entre outras (C *et al.*, 2020; CHEN, LONG; LI; CHEN, 2019), devido seu tamanho reduzido, alta superfície de contato e baixa toxicidade.

Com especificidade para área farmacêutica, estes são utilizados para resolução de problemas de diversas classes terapêuticas, como: antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, entre outras, pois, em geral, apresentam menor toxicidade, maior solubilidade e biodisponibilidade tecidual (CHARELLI *et al.*, 2022; EL-SONBATY; KANDIL; HAROUN, 2022). A área de controle de doenças infecciosas é destaque nos estudos de nanotecnologia. As nanoestruturas preparadas com metais, exibem potencial antimicrobiano de amplo espectro, com ações direcionadas às bactérias e fungos (HUQ *et al.*, 2022; OWAID *et al.*, 2022).

Diversos ensaios biológicos vêm sendo desenvolvidos frente utilizando sistemas nanoestruturados. Nestes sistemas, a resposta celular é guiada por mudanças na hidrofília, morfologia, porosidade, cristalinidade e composição química da superfície do nanocomposto (VIET *et al.*, 2018). Assim, a bioatividade como por exemplo a capacidade antibacteriana e antifúngica, biocompatibilidade (umidade, rugosidade, porosidade, etc.), e as propriedades mecânicas são revistas permanentemente por diferentes estudos, garantindo maior eficácia dos materiais (PARVATHY *et al.*, 2022).

O óxido de grafeno (GO), material bidimensional à base de carbono, o torna elemento de ampla aplicação tecnológica e precursor para síntese de novos materiais, dada à área superficial específica, a estabilidade química, a condutividade termo-

elétrica e resistência mecânica (AĞBULUT *et al.*, 2022). O GO pode ser produzido via sonicação, agitação e expansão térmica, do óxido de grafite (FADIL *et al.*, 2022). Segundo Hummers e Offeman, os recursos materiais, correspondentes às etapas iniciais de síntese de grafeno, incluem a oxidação do grafite por mistura de ácido sulfúrico, nitrato de sódio e permanganato de potássio (HUMMERS; OFFEMAN, 1958).

Quando o GO é quimicamente modificado - óxido de grafeno reduzido rGO - surgem novas propriedades químicas e biológicas, especialmente, o aumento de solubilidade e reatividade antimicrobiana (SENGUPTA *et al.*, 2019). Tratamentos com hidrazina, hidretos, hidroquinona permitem novas estratégias de síntese desse óxido de grafeno reduzido. Esse processo químico rompe a ligação sp² da rede e introduz grupos hidroxila ou epóxido no plano basal, enquanto que os grupos carbonila e carboxila, em conjunto com lactona, fenol e quinona são anexados às bordas (LAVIN-LOPEZ *et al.*, 2017). Os grupos funcionais deixam o rGO fortemente hidrofílico, permitindo a sua dispersão em água pura, solventes orgânicos e misturas aquosas.

Estudos anteriores, sugerem que o potencial de ação dos materiais à base de grafeno contra microrganismos, é observado após contato direto entre as bordas afiadas das folhas de rGO com as células, resultando em vazamento de material intracelular e afetando negativamente o metabolismo (QUINTEROS *et al.*, 2016). Corroborando com esta afirmativa, Perreault e colaboradores (PERREAULT *et al.*, 2015) identificaram que a ampliação da área da folha de grafeno está proporcionalmente relacionada com o aumento da taxa de inativação microbiana.

Vários estudos de análise da ação do rGO, associados com metais, sobre microrganismos patogênicos de relevância clínica foram conduzidos por vários pesquisadores, evidenciando o seu potencial antimicrobiano contra: *Escherichia coli* (KESHVARDOOSTCHOKAMI *et al.*, 2020), *Staphylococcus aureus* (CAIRES *et al.*, 2020) *Staphylococcus epidermidis* (JAWORSKI *et al.*, 2018), *Proteus mirabilis* (FENNICHE *et al.*, 2022), *Pseudomonas aeruginosa* (ELBASUNEY *et al.*, 2021), *Listeria monocytogenes* (KURANTOWICZ *et al.*, 2015), *Salmonella entérica* (KURANTOWICZ *et al.*, 2015), *Cryptococcus neoformans* (ELBASUNEY *et al.*, 2021), *Candida albicans* (ELBASUNEY *et al.*, 2021), *Aspergillus spp.* (ELBASUNEY *et al.*, 2021), *Fusarium oxysporum*, (CHEN, JUANNI *et al.*, 2016); *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* (ALIAMRADNI; ABOLMAALI; BORANDEH, 2019).

A prata, o cobre e o zinco são elementos reativos e que melhoram as atividades químico-biológicas dos compostos derivados do grafite. Apesar do conhecimento prévio das atividades antimicrobianas da prata, a síntese de materiais contendo esse metal em condição de nanopartículas (NPs), só foi recentemente estudada (HUQ *et al.*, 2022). Com esta formulação, foi evidenciada ação imediata sobre cadeia respiratória, destruição da membrana e parede celular, de bactérias e fungos. Além disso, seguindo com sua ligação às estruturas de DNA/RNA, a replicação celular foi interrompida, e conseqüentemente, estabelecida a morte microbiana (POZDNYAKOV *et al.*, 2022).

As espécies reativas de oxigênio e radicais livres, produtos decorrentes da ação das nanoestruturas de prata sobre a célula microbiana, induzem a apoptose, isto é, a morte celular programada. Assim, ficam evidentes os benefícios das nanopartículas de Ag (AgNP) como agentes antimicrobianos, seguindo mecanismos de ação multifacetados, como bloqueio do ciclo de energia, ligação enzimática e a interrupção de funções celulares (KOSA; ZAHEER, 2022). Uma vez que os Ag NPs são menores que os microrganismos, a difusão celular e, conseqüentemente ruptura de estruturas, é um evento esperado. Dependendo do tamanho, concentração, pH do meio e tempo de exposição das nanoestruturas de prata, poderão ocorrer respostas variadas quanto à toxicidade sobre célula microbiana (SEDKI *et al.*, 2015).

Os danos físicos provocados por compostos híbridos, por exemplo, rGO combinado com Ag, sobre a membrana celular bacteriana foram demonstrados no estudo de Zhou *et al.*, 2020 (ZHOU *et al.*, 2020) constatando a alta capacidade de adesão à superfície das bactérias *S. aureus* e *E. coli*. No estudo de Chen *et al.* (CHEN, LONG; LI; CHEN, 2019), com o auxílio de recursos tecnológicos de biologia molecular, evidenciaram ação dos compostos híbridos de rGO e Ag sobre célula bacteriana, e como consequência, a inativação da síntese proteica a partir de 3 horas de contato. No estudo de Bhattacharjee *et al.* (BHATTACHARJEE *et al.*, 2021), o rGO/Ag foi incorporado em malhas de algodão e seda apresentou maior taxa de inibição frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*. Esses bons resultados de sinergismo podem estar associados ao fato de que as nanopartículas de prata sozinhas apresentam dificuldades na dispersão, devido suas fortes forças de adesão, entre partículas com alta energia de superfície.

Considerando os fungos, e seus elementos de reprodução, esporos ou micélios, grande variabilidade é observada na forma e componentes externos de estrutura celular. Entretanto, há poucos estudos que identifiquem a sensibilidade ou resistência de fungos aos nanocompósitos de rGO/Ag. É conhecido que combinando-se os elementos nanoestruturados, prata e óxido de grafeno reduzido, há efeito sinérgico de ação inibitória para os microrganismos (ZHOU *et al.*, 2020) induzido pela lesão física pelo rGO e geração de compostos reativos de oxigênio pela prata. Fato demonstrado no estudo de Aliamrandni *et al.*, 2019 (ALIAMRADNI; ABOLMAALI; BORANDEH, 2019), onde os testes contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis* seguindo o método de disco difusão, o rGO/Ag apresentou melhor ação do que os compostos separadamente testados. Em relação aos espécimes fúngicos foram observadas anormalidades morfológicas como deformações na célula do *Cryptococcus neoformans* que levaram a lise total da superfície externa, que geraram não apenas a redução da população séssil, mas também na massa de biofilme (ELBASUNEY *et al.*, 2021).

Considerando as vantagens dos nanomateriais híbridos em comparação aos antimicrobianos tradicionais, as nanopartículas de Ag apresentam baixa ou nenhuma citotoxicidade para células humanas, sendo utilizadas em diversos dispositivos médicos, além de reduzir a resposta inflamatória (PRASAD *et al.*, 2017; VASILEV *et al.*, 2010).

Assim sendo os nanomateriais híbridos, por apresentarem amplo campo de aplicação, se faz necessário a análise perfil de toxicidade, onde a maioria desses ensaios é executado em modelo *in vivo* devido as respostas fisiológicas similares aos organismos vivos. Sabendo que testes em mamíferos apresentam desvantagens quanto ao custo, demora e controvérsias em comitês éticos, os ensaios em aos modelos invertebrados tem ganhado destaque. Exemplos como *Drosophila melanogaster* (MISHRA; PANDA, 2021), *Zebra fish* (PENSADO-LÓPEZ *et al.*, 2021), *Galleria mellonella* (MOYA-ANDÉRICO *et al.*, 2021) são frequentemente usados em triagens toxicológicas. Frente a este fato, a larva de *Galleria mellonella* apresenta vantagens, uma vez que a utilização experimental é mais simplificada pelo tamanho reduzido, não há necessidade de equipamentos sofisticados e é aprovado por comitês éticos (PAZIANI *et al.*, 2019). Esse invertebrado apresenta respostas imunológicas

5 CONCLUSÕES

Este estudo mostra uma síntese de nanocompósitos híbridos contendo uma matrix atóxica sendo representado por óxido de grafeno reduzido, e por um agente fungicida, a prata nanoparticularizada (Ag NPs). Assim sendo, os nanocompósitos apresentam prata nanoestruturada esférica entre 5-30nm sob malha de óxido de grafeno reduzido, demonstrado pelas análises de microscopia eletrônica e DRX.

O híbrido rGO/Ag foi testado contra isolados clínicos apresentando ação antifúngica sinérgica: CIM 3.9 e 1.9 $\mu\text{g/mL}$.

Curiosamente, o notável desempenho antifúngico mostrado pelos NCs pode ser atribuído à força de interação do rGO/Ag com superfície da parede celular fúngica, com especificidade para alguns receptores, demonstrado pelo teste de microdiluição com suplementação de sorbitol a 0.8M. Além disso, as estruturas fúngicas apresentaram interferência a partir de 2 horas e 12 horas para as leveduras e dermatófitos, respectivamente. As leveduras tiveram inibição na formação de hifas, e os dermatófitos reduziram o tamanho do diâmetro das colônias. O efeito não tóxico *in vivo* pode ser devido a dispersão homogênea de Ag NPs na matriz de malhas do rGO, que protegem o hospedeiro contra danos celulares, apresentado pelo teste *in vivo* de *Galleria mellonella*.

Os achados contribuem para novas perspectivas terapêuticas para o controle de doenças fúngicas superficiais especialmente devido o amplo espectro de atividades dos materiais nanoparticularizados, como biocompatibilidade e baixa toxicidade.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

AĞBULUT, Ümit *et al.* Synthesis of graphene oxide nanoparticles and the influences of their usage as fuel additives on CI engine behaviors. *Energy*, v. 244, p. 122603, abr. 2022. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360544221028528>>.

ALIAMRADNI, Vahid; ABOLMAALI, Samira Sadat; BORANDEH, Sedigheh. Antifungal and antibacterial properties of graphene-based nanomaterials: A mini-review. *Journal of Nanostructures*, v. 9, n. 3, p. 402–413, 2019.

BEGUM, Jubeda *et al.* Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. *Journal of Basic Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 293–303, abr. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.201900675>>.

BHATTACHARJEE, Shovon *et al.* Graphene- and Nanoparticle-Embedded Antimicrobial and Biocompatible Cotton/Silk Fabrics for Protective Clothing. *ACS Applied Bio Materials*, v. 4, n. 8, p. 6175–6185, 2021.

C, Karthik *et al.* Green synthesized rGO-AgNP hybrid nanocomposite – An effective antibacterial adsorbent for photocatalytic removal of DB-14 dye from aqueous solution. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8, n. 1, p. 103577, fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103577>>.

CAIRES, Cynthia S.A. *et al.* Effective killing of bacteria under blue-light irradiation promoted by green synthesized silver nanoparticles loaded on reduced graphene oxide sheets. *Materials Science and Engineering: C*, v. 113, n. April, p. 110984, ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110984>>.

CHARELLI, Letícia Emiliano *et al.* Polymeric nanoparticles as therapeutic agents against coronavirus disease. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 24, n. 1, p. 12, 10 jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11051-022-05396-5>>.

CHEN, Juanni *et al.* Graphene Oxide-Silver Nanocomposite: Novel Agricultural

Antifungal Agent against *Fusarium graminearum* for Crop Disease Prevention. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 8, n. 36, p. 24057–24070, 14 set. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.6b05730>>.

CHEN, Long; LI, Zhi; CHEN, Mingguang. Facile production of silver-reduced graphene oxide nanocomposite with highly effective antibacterial performance. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, n. 3, p. 103160, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103160>>.

CHINNAPUN, Dutsadee. Virulence factors involved in pathogenicity of dermatophytes. *Walailak Journal of Science and Technology*, v. 12, n. 7, p. 573–580, 2015.

EL-SONBATY, Sawsan; KANDIL, Eman I.; HAROUN, Riham Abdel-Hamid. Assessment of the Antitumor Activity of Green Biosynthesized Zinc Nanoparticles as Therapeutic Agent Against Renal Cancer in Rats. *Biological Trace Element Research*, n. 0123456789, 26 jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12011-022-03126-5>>.

ELBASUNEY, Sherif *et al.* Promising antimicrobial and antibiofilm activities of reduced graphene oxide-metal oxide (RGO-NiO, RGO-AgO, and RGO-ZnO) nanocomposites. *RSC Advances*, v. 11, n. 42, p. 25961–25975, 2021. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=D1RA04542C>>.

FADIL, Yasemin *et al.* Synthesis of graphene-based polymeric nanocomposites using emulsion techniques. *Progress in Polymer Science*, v. 125, p. 101476, fev. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2021.101476>>.

FENNICHE, F. *et al.* Electrochemical Synthesis of Reduced Graphene Oxide–Wrapped Polyaniline Nanorods for Improved Photocatalytic and Antibacterial Activities. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, v. 32, n. 3, p. 1011–1025, 22 mar. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10904-021-02204-w>>.

GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A. Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. *Journal of Applied Microbiology*, v. 129, n. 2, p. 212–232, 26 ago. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.14611>>.

GRANINGER, Wolfgang; DIAB-ELSCHAHAWI, Magda; PRESTERL, Elisabeth. *Clinically Relevant Mycoses*. Cham: Springer International Publishing, 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-92300-0>>.

GUPTA, Aditya K.; VENKATARAMAN, Maanasa. Antifungal resistance in superficial mycoses. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 0, n. 0, p. 1–8, 30 jun. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09546634.2021.1942421>>.

HUMMERS, William S.; OFFEMAN, Richard E. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 80, n. 6, p. 1339–1339, mar. 1958.

HUQ, Md Amdadul *et al.* Green Synthesis and Potential Antibacterial Applications of Bioactive Silver Nanoparticles: A Review. *Polymers*, v. 14, n. 4, p. 742, 15 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4360/14/4/742>>.

IGNASIAK, Katarzyna; MAXWELL, Anthony. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Research Notes*, v. 10, n. 1, p. 428, dez. 2017.

JAWORSKI, Sławomir *et al.* Graphene Oxide-Based Nanocomposites Decorated with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent. *Nanoscale Research Letters*, v. 13, n. 1, p. 116, 23 dez. 2018. Disponível em: <<https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-018-2533-2>>.

KABLY, Benjamin *et al.* Antifungal Drugs TDM: Trends and Update. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 44, n. 1, p. 166–197, 1 fev. 2022. Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.1097/FTD.0000000000000952>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

KESHVARDOOSTCHOKAMI, Mina *et al.* Fabrication and Antibacterial Properties of Silver/Graphite Oxide/Chitosan and Silver/Reduced Graphene Oxide/Chitosan Nanocomposites. *JOM*, v. 72, n. 12, p. 4477–4485, 12 dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11837-020-04243-z>>.

KOSA, Samia A.; ZAHEER, Zoya. Biogenic fabrication of silver nanoparticles, oxidative dissolution and antimicrobial activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 26, n. 1, p. 101414, jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101414>>.

KURANTOWICZ, Natalia *et al.* Interaction of graphene family materials with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Nanoscale Research Letters*, v. 10, n. 1, p. 23, 28 dez. 2015. Disponível em: <<https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-015-0749-y>>.

LAVIN-LOPEZ, M.P. *et al.* Influence of the reduction strategy in the synthesis of reduced graphene oxide. *Advanced Powder Technology*, v. 28, n. 12, p. 3195–3203, dez. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.appt.2017.09.032>>.

LIPNER, Shari R.; SCHER, Richard K. Onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 80, n. 4, p. 835–851, abr. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962218321881>>.

MARTINEZ-ROSSI, Nilce M. *et al.* State-of-the-Art Dermatophyte Infections: Epidemiology Aspects, Pathophysiology, and Resistance Mechanisms. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 8, p. 629, 3 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2309-608X/7/8/629>>.

MISHRA, Monalisa; PANDA, Mrutyunjaya. Reactive oxygen species: the root cause of nanoparticle-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Free Radical Research*, v. 55, n. 8, p. 919–935, 3 ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10715762.2021.1914335>>.

MOCHIZUKI, Takashi *et al.* Guidelines for the management of dermatomycosis

(2019). *The Journal of Dermatology*, v. 47, n. 12, p. 1343–1373, 25 dez. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1346-8138.15618>>.

MOYA-ANDÉRICO, Laura *et al.* Utility of *Galleria mellonella* larvae for evaluating nanoparticle toxicology. *Chemosphere*, v. 266, p. 129235, mar. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653520334329>>.

MUHAJ, Fiorinda F. *et al.* Antimicrobials and Resistance Part II: Antifungals, Antivirals, and Antiparasitics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, fev. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2021.11.065>>.

OWAID, Mustafa Nadhim *et al.* Mycogenic fabrication of silver nanoparticles using Picoa, Pezizales, characterization and their antifungal activity. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, v. 17, n. August 2021, p. 100612, maio 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100612>>.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, p. 1445–1456, 2018.

PARVATHY, Subramanian *et al.* The structural, optical, antimicrobial and anticancer properties of biocompatible astaxanthin coated ZnO and CeO₂ nanoparticles. *Materials Letters*, v. 312, n. November 2021, p. 131669, abr. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2022.131669>>.

PAZIANI, Mario Henrique *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy with phenothiazinium photosensitizers in non-vertebrate model *Galleria mellonella* infected with *Fusarium keratoplasticum* and *Fusarium moniliforme*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 25, n. October 2018, p. 197–203, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.12.010>>.

PENSADO-LÓPEZ, Alba *et al.* Zebrafish Models for the Safety and Therapeutic Testing of Nanoparticles with a Focus on Macrophages. *Nanomaterials*, v. 11, n. 7, p. 1784, 9 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-4991/11/7/1784>>.

PEREIRA, Thais *et al.* Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 128, 27 nov. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2309-608X/4/4/128>>.

PERREAULT, François *et al.* Antimicrobial Properties of Graphene Oxide Nanosheets: Why Size Matters. *ACS Nano*, v. 9, n. 7, p. 7226–7236, 28 jul. 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.5b02067>>.

POZDNYAKOV, Alexander *et al.* Strong Antimicrobial Activity of Highly Stable Nanocomposite Containing AgNPs Based on Water-Soluble Triazole-Sulfonate Copolymer. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 1, p. 206, 16 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4923/14/1/206>>.

PRASAD, Karthika *et al.* Synergic bactericidal effects of reduced graphene oxide and silver nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1591, 8 dez. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01669-5>>.

QUINTEROS, M.A. *et al.* Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicology in Vitro*, v. 36, p. 216–223, out. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.007>>.

RIDZUAN, P. M. *et al.* Mini Review on Dermatomycosis. *Journal of Science and Mathematics Letters*, v. 8, n. 1, p. 6–15, 7 nov. 2019. Disponível em: <<https://ejournal.upsi.edu.my/index.php/JSML/article/view/2686/2065>>.

RODRIGUES, Marcelo Costa *et al.* Resistance of filamental fungi in opportunistic mycoses : literature review Resistência de fungos filamentosos em micoses oportunistas : revisão de literatura. v. 2022, p. 1–10, 2022.

SANTOS, Giselle C.de Oliveira *et al.* Candida infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–23, 2018.

SCRAVONI, Renan; GRZONA, Esteban. Impact of HIV infection in dermatomycosis . Cases and controls study. n. December, 2021.

SEDKI, Mohammed *et al.* Phytosynthesis of silver–reduced graphene oxide (Ag–RGO) nanocomposite with an enhanced antibacterial effect using *Potamogeton pectinatus* extract. *RSC Advances*, v. 5, n. 22, p. 17358–17365, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA13117G>>.

SENGUPTA, Iman *et al.* Bactericidal effect of graphene oxide and reduced graphene oxide: Influence of shape of bacteria. *Colloid and Interface Science Communications*, v. 28, n. December 2018, p. 60–68, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colcom.2018.12.001>>.

VASILEV, Krasimir *et al.* Tunable antibacterial coatings that support mammalian cell growth. *Nano Letters*, v. 10, n. 1, p. 202–207, 2010.

VIET, Pham Van *et al.* Silver nanoparticle loaded TiO₂ nanotubes with high photocatalytic and antibacterial activity synthesized by photoreduction method. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 352, p. 106–112, fev. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.10.051>>.

WHALEY, Sarah G. *et al.* Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. JAN, p. 1–12, 12 jan. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02173/full>>.

ZHOU, Shengnan *et al.* Mussel-inspired fabrication of cationic polymer modified rGO supported silver nanoparticles hybrid with robust antibacterial and catalytic reduction performance. *Applied Surface Science*, v. 506, n. November, p. 144655, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144655>>.